

## 学位論文審査の結果の要旨

令和 4 年 11 月 18 日

審査委員	主 査	平野勝也		
	副主査	門脇則光		
	副主査	山本 融		
願 出 者	専攻	医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)
	学籍 番号	18D718	氏名	高尾 健二郎
論 文 題 目	Immunomodulatory effects of D-allose on cytokine production by plasmacytoid dendritic cells			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	
<p>〔 要 旨 〕</p> <p>【背景と目的】 D-アロースは、自然界にごく微量に存在する単糖のグループ「希少糖」に分類され、多くの生理的機能を発揮することが解明されてきた。例えば、活性酸素の産生抑制、高血圧の発症抑制、神経変性疾患や虚血性疾患などの治療への応用、癌細胞の増殖抑制作用などが知られている。その一方で、希少糖の免疫反応への影響については、ほとんど未解明であった。我々は自然免疫を担う樹状細胞 (Dendritic cell, DC) の機能を明らかにする研究を行っている。DCは、微生物成分で活性化されると種々のサイトカインを産生し、同時に抗原提示を行うことで、T細胞の活性化つまり獲得免疫を始動する。本研究では、マウス樹状細胞のサイトカイン産生に及ぼすD-アロースの効果について検討した。</p> <p>【材料・方法】 マウス骨髓細胞を、Flt-3リガンドを含む培地でin vitro培養し、骨髓由来樹状細胞を分化誘導した。この樹状細胞に含まれている形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) と、通常型樹状細胞 (conventional dendritic cell, cDC) をそれぞれ分画し、D-アロースを含む培地中で、Toll-like receptor 7 (TLR7) あるいはTLR9リガンド刺激を行った。刺激24時間後の培養上清に含まれるサイトカイン濃度をELISAで測定した。また、マウス脾臓および骨髓からpDCを分取し、D-アロース存在下でのサイトカイン産生を測定した。続いて、D-アロースを含む培地中での樹状細胞への蛍光標識CpG DNAの取り込みを、フローサイトメトリー解析した。さらに、pDCをTLR7あるいはTLR9リガンドで刺激し、細胞内シグナル伝達分子の活性化についてウエスタンブロット解析した。</p> <p>【結果】 D-アロースを含む培地中で、TLR7リガンドの一本鎖RNA (polyU)、あるいはTLR9リガンドのCpG DNAでpDCを刺激すると、interferon-<math>\alpha</math> (IFN-<math>\alpha</math>) およびinterleukine-12 (IL-12p40) 生産が、対照</p>				

のD-グルコースを含む培地と比べて著しく減少した。一方、低分子型TLR7リガンドのイミダゾキノリン、またはグアノシンアナログでpDCを刺激しても、これらのサイトカイン産生は減弱しなかった。pDCと異なり、CpG DNAで刺激したcDCのサイトカイン産生 (IL-12p40とtumor necrosis factor- $\alpha$ ) は、D-アロースを含む培地中でも減弱しなかった。D-アロースによるpDCのサイトカイン産生抑制は、pDCの細胞死誘導が原因ではなく、また、CpG DNAのエンドサイトーシス阻害によるものでもなかった。

polyUまたはCpG DNA刺激を行ったpDCの細胞内シグナル伝達分子のリン酸化について調べた結果、D-アロース存在下ではErk1/2、JNK/SAPK、p38 MAPKを含むMAPKファミリーのリン酸化が、対照のD-グルコース存在下と比較して減弱していた。一方、イミダゾキノリン刺激によるMAPKファミリーのリン酸化は、D-アロース存在下でも減弱していなかった。

#### 【考察】

今回の結果から、D-アロースは、polyUまたはCpG DNAでpDCを刺激した場合にみられるサイトカイン産生を選択的に抑制する免疫調整能を有することが明らかになった。D-アロースによるpDCのサイトカイン産生抑制メカニズムを解析するために、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化を評価した結果、polyUまたはCpG DNA刺激によるMAPKファミリーのリン酸化が、D-アロース存在下で抑制されることが明らかとなった。pDCのサイトカイン産生誘導には、MAPKシグナルの活性化が重要であることも示された。pDCによるI型IFN産生は、抗ウイルス免疫だけでなく、自己免疫疾患の発症にも関与している。今回の結果から、pDCによる過剰なサイトカイン産生が関与する自己免疫疾患の病態解明や、D-アロースを用いる新しい治療手段の開発が期待される。

本研究に関する学位審論文査委員会は令和4年11月14日に行われた。

以下に示す様々な質疑応答が行われ、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. 培地に使用したDグルコースやDアロースの濃度はどのような根拠で決めたのか？  
→グルコース含有RPMI1640のグルコース濃度が0.2%である。グルコースフリーのRPMI1640にDアロースの濃度が0.2%になるように調整して培養に使用した。
2. 骨髄由来の樹状細胞と脾臓由来の樹状細胞でサイトカインの産生量が違うが役割の違いは？  
→骨髄由来樹状細胞はリンパの流れに乗って全身を循環し、抗原を捕捉しリンパ節に移動し抗原提示細胞として働いている。脾臓由来樹状細胞は移動能を持たずリンパ組織内に留まり、組織の中のみで抗原提示細胞として働いている。
3. TLR7刺激リガンドの違いは？  
→イミダゾキノリンであるR848やGardiquimod、グアノシン類自体であるLoxoribineは低分子化合物であり、polyUは高分子化合物である。TLR7はそれぞれのリガンドと結合し2量体を形成する。2量体の界面に位置する第一部位に低分子化合物が位置し、リング型構造の凹面の第二結合部にpolyUが位置する。
4. レセプターとリガンドに直接Dアロースが作用しているのか？  
→現在、作用機序は不明である。
5. 細胞内シグナル伝達のリン酸化に対する作用の違いは何か？  
→サイトカインの上流に関与していると考えられる。
6. 臨床的に使用するためにはどのように使用するのか？  
→抗癌剤と併用することで抗腫瘍効果は増強されることが分かっている。免疫反応としては自己免疫疾患の原因となるI型IFNの過剰産生を抑制し、症状の寛容を目指す。
7. 統計学的な解析はしていないのか？エラーバーはどのように表示したのか？  
→本実験の統計的解析はしていない。エラーバーはELISAの3回の標準偏差を示したものである。
8. TLR9刺激リガンドとして使用したD19とODN1668の違いは？  
D19はCpGのtypeAでありpDCsを刺激した場合は炎症性サイトカインと大量のI型IFNの両方の産生が誘導される。ODN1668はCpGのtypeBであり刺激をした場合は炎症性サイトカイン産生が優位に誘導され、I型IFNの産生の誘導が乏しい。
9. DアロースがMAPキナーゼファミリーのリン酸化を抑制しているが、サイトカイン産生経路のどこに作用し、サイトカイン産生が抑制されているのか？

- IFN $\alpha$ の上流であるIRF7やIL12の上流のNF $\kappa$ Bp65のリン酸化抑制の有無は確認できなかった。MAPキナーゼファミリーのリン酸化が間接的にサイトカイン産生に関与していると考えている。
10. Dアロースはアルドースであるが、他の希少糖アルドースでは調べていないのか？  
→他の希少糖アルドースでは調べていない。他はDアルロース、Lアルロース、Dフルクトースのみ。
11. 人のpDCではやっていないのか？  
→セルラインPMDCを使用した。サイトカイン産生量が少なくELISA測定ができなかった。
12. In vivoでは、マウスに有効なDアロースの濃度は分かっているのか？  
→腹腔内投与にて400mg/kgおよび4g/kg投与し、サイトカイン産生抑制効果を測定したが有効な測定データは得られなかった。
13. サイトカイン産生抑制はDアロースの効果なのかグルコースを減らした効果なのか？  
→グルコースを含まない飢餓状態でTLR7/9刺激をしてもサイトカイン産生の低下は見られなかった。グルコースを減らしてもサイトカイン産生が抑制されないと考える。Dアロースによる効果と考えられる。
14. Dアロースによりグルコースの代謝が抑えられているのではないのか？  
→Dアロースとグルコースを同時に投与した実験を行っていないので分からない。
15. Dアロースはどのようにして細胞内に取り込まれるのか？  
→グルコーストランスポーターを介していると考えている。
16. IFN $\alpha$ やIL12の上流シグナルのリン酸化抑制の有無を調べたのか？  
→IRF7やNF $\kappa$ B、IKK $\alpha$ のリン酸化をwesternblotにて調べたが、結果が得られなかった。
17. WesternBlotにおける工夫は？実験回数？  
→照射時間を数秒から20分まで実施した。各抗体について10回実施した。
18. WesternblotにてNF $\kappa$ Bp65の0minにてバンドが見えるが、他に差がでそうな抗体はなかったのか？  
→抗体濃度や照射時間を変更したが、0minでバンドが消えなかった。他の抗体では有効な結果が得られなかった。
19. In vivoではどのような実験をしたのか？炎症モデルマウスを用いたのか？  
→B6JマウスにDアロースまたはグルコースを腹腔内投与し、同時にODN1668またはpolyUを静脈内投与し、1hr、3hr、6hr後に採血し、血清中のサイトカインをELISA測定した。
20. この研究の動機は  
→口腔外科領域に自己免疫疾患としてシェーグレン症候群があり、病態にI型IFN $\alpha$ が関与しているとの報告がある。また香川大学が研究開発している希少糖を用いて、シェーグレン症候群に対する新たな病態の解明や治療法の開発を目指すためである。
21. 統計学的な解析は必要ではなかったのか？  
→統計的解析をすればより研究結果の信頼度を得られと思う。
22. 単糖なしで刺激したのか？  
→グルコースを含まない飢餓状態でTLR7/9刺激をした。その際にサイトカイン産生低下はなかった。
23. Cellbiocabilityの評価について、polyU刺激時に細胞死が起きてないと評価した理由は？  
→polyU刺激15hr後の細胞と、刺激前の細胞をフローサイトメトリー解析にて比較し、細胞の生存率が大きく減少していないことからpolyU刺激により細胞死が起こっていないと考えた。
24. 細胞内へのTLRリガンドの取り込みを解析した結果について細胞表面についた蛍光物質Cy5を見ているのではないのか？

→フローサイトメトリー解析前に、トリパンブルーにて細胞表面の蛍光標識を消している。

25. トリパンブルーの手法はよく使われているが、どのようなメカニズムなのか？  
→分からない、論文より手法を参考にした。

26. TLR7刺激のR848のWesterblotでシグナルが最も強いのはなぜか？  
→明らかな理由は分からないが、MAPキナーゼファミリーにおいてはR848によるシグナル伝達が優位に行われていると考える。

27. Dアロースに細胞内シグナル伝達においてリガンド特異的な効果があるのか？  
→TLR7リガンドにおいて、低分子化合物であるR848と高分子化合物であるpolyUの結合部位が異なるので、その点に関して特異的な効果があるかもしれないと考える。メカニズムの解明は今後の課題である。

28. サイトカイン産生とMAPキナーゼファミリーのリン酸化はパラレルな反応と思うがこれらがサイトカイン産生の上流にあることを証明するためにはどのような実験が必要か？  
→MAPキナーゼインヒビターを用いてTLR7/9刺激によるpDCからのサイトカイン産生が抑制されるかを測定することが必要である。

本論文は、樹状細胞の免疫機能に対する希少糖Dアロースの免疫調整機能に関する研究である。Dアロース存在下における樹状細胞からのサイトカイン産生を測定し、分析することで形質細胞様樹状細胞においてTLR7/9刺激によるIFN $\alpha$ およびIL-12p40の産生が抑制されることを示した。Dアロースの生物学的活性を利用し、pDCによるI型IFNの産生を調整することで、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群といった自己免疫疾患の病態の解明や新しい治療法の解明につながる点において意義がある。

本審査委員会では審査委員全員一致して博士（医学）論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications 第 卷, 第 号		
(公表予定) 掲載年月	Available online 17 August 2022	出版社(等)名	ELSEVIER

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。