

# 論 文 要 旨

Induction of PIR-A/B<sup>+</sup> DCs in the in vitro inflammatory condition and their immunoregulatory function

(in vitro の炎症環境下における PIR-A/B 陽性樹状細胞の誘導と免疫調節機能)

関西医科大学内科学第三講座

(指導：岡崎 和一 教授)

松 井 芙 美

## 【研究目的】

周知のように、樹状細胞 (Dendritic cells: DCs) は周囲環境の病原微生物などを危険シグナル (danger signal) として認識し、獲得免疫応答を始動させる第一義的な抗原提示細胞である。しかしながら DCs はまた免疫応答の様々な局面において正負両方向に調節作用を行う細胞としても重要であることが知られている。我々はこれまで炎症性腸疾患モデルにおいて、炎症応答消退過程に免疫抑制活性を持つ PIR-A/B (paired Ig-like receptors-A/B) 陽性 conventional DCs (cDCs) が出現してくることを見出し、この DC サブセットが炎症性腸疾患の治癒に関与している可能性を示唆してきた。

実際、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎モデルマウスの大腸粘膜固有層に出現してくる PIR-A/B 陽性 cDCs は *in vitro* リンパ球混合培養応答 (Mixed Leucocyte Reaction : MLR) において抑制活性を示し、また *in vivo* においても DSS 誘導性大腸炎の炎症応答を抑制する活性を持つことがモデルマウスへの細胞移入の系により確認された。しかしながら、この制御性 PIR-A/B 陽性 cDCs がどのような環境下で出現してくるのか、その過程の詳細は不明であり、この点を解明することを目的として実験を行った。

## 【研究方法】

- 1) 正常無処置 (定常状態) マウス (C57BL/6、H-2<sup>b</sup>) より PIR-A/B 陰性 cDCs を FACS Aria にて単離し、*in vitro* において炎症応答類似環境下 (IL-1、IL-6、TNF $\alpha$  および LPS) に 24 時間培養した。なお DC の生存を維持するため全ての培養系に GM-CSF を添加した。
- 2) PIR-A/B 陽性 cDCs の出現は Flowcytometry により解析した。
- 3) 炎症応答類似環境下において出現してくる PIR-A/B 陽性 cDCs を FACS Aria にて単離し、マイクロアレイによる遺伝子解析後、着目した分子について RT-PCR および ELISA によりその発現を検討した。
- 4) 炎症応答類似環境下で培養した DC (PIR-A/B 陽性 cDCs を含む) の異系 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (BALB/c、H-2<sup>d</sup> より調製) 刺激細胞活性をリンパ球混合培養応答 (MLR) の系で検討し、合わせてその免疫抑制活性を解析した。
- 5) 免疫制御能を調べるため DSS 腸炎マウスに PIR-A/B 陽性 cDCs を移入し、3 日目でマウスを屠殺して病理学的検討を行った。
- 6) 潰瘍性大腸炎患者の大腸において PIR-A/B のヒト homologue と考えられる CD85d 分子の発現を免疫染色により検討した。

## 【結果】

- 1) DSS を 5 日間経口投与 (自然給水) し、大腸炎を誘発したマウスでは明らかに PIR-A/B 陽性 cDCs の出現が認められ、一方 DSS 非投与群では PIR-A/B 陽性 cDCs は検出されないことが確認された。
- 2) PIR-A/B 陰性 cDCs を炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF $\alpha$ ) 存在下で培養することにより PIR-A/B 陽性 cDCs の出現が認められるが、その頻度は

LPS 添加により増加した。

3) PIR-A/B 陽性 cDCs では炎症促進に働く HMGB1 の発現が低下しており、また抑制性サイトカインである IL-27 の産生が著明に増加していた。

4) MLR の系で検討したところ、炎症応答類似環境下で培養した DCs (PIR-A/B 陽性 cDCs を含む) の刺激細胞活性はコントロールの脾臓 DCs および GM-CSF のみで培養した DCs に比して低下しており、また脾臓 DCs により刺激された異系 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制することが判明した。さらに炎症応答類似環境下で培養し、FACS で単離した PIR-A/B 陽性 cDCs は刺激細胞活性の低下および MLR の抑制活性を持つことが確認された。また、抗 IL-27 抗体の添加により PIR-A/B 陽性 cDCs による抑制作用の低下が認められた。

5) DSS 誘発大腸炎マウスに、PIR-A/B 陽性 cDCs を移入したマウスでは、PIR-A/B 陰性 cDCs を移入したマウスや PBS を注入したマウスに比べ腸炎の程度が軽微であった。

6) 潰瘍性大腸炎患者の大腸では、大腸粘膜固有層に少数の CD85d 陽性の細胞が認められた。

#### 【考察】

炎症応答類似環境下において PIR-A/B 陰性 cDCs より PIR-A/B 陽性 cDCs が出現し、この DC サブセットは抑制機能を有することが示唆された。さらに PIR-A/B 陽性 cDCs は抑制性サイトカインである IL-27 を産生し、また抗 IL-27 抗体により抑制活性が中和されることから、PIR-A/B 陽性 cDCs による抑制作用は主に IL-27 によるものと考えられた。

潰瘍性大腸炎患者の大腸では、粘膜固有層に少数の CD85d 陽性細胞 (マウスの PIR-A/B 陽性細胞に対応) を認め、大腸ガン患者切除標本の正常粘膜組織にはこの細胞が認められなかったことから、ヒトにおいてもこの cDC サブセットが免疫制御を介して炎症反応の軽減・消退に関与する可能性があるかと推測される。