

# Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 戸舘, 亮人 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1659">http://hdl.handle.net/10271/1659</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 382号	学位授与年月日	平成16年 2月20日
氏名	戸 館 亮 人		
論文題目	Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells (Muramyl dipeptide-Lys はヒト樹状細胞の機能を増強する)		

博士 (医学) 戸 館 亮 人

## 論文題目

Muramyl dipeptide - Lys stimulates the function of human dendritic cells  
(Muramyl dipeptide - Lys はヒト樹状細胞の機能を増強する)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

Muramyl dipeptide (MDP) は細菌の細胞壁のペプチドグリカンのアジュバント活性を持つ細小構成単位で、感染症や腫瘍に対して生体の免疫力を高める強力なアジュバントとしての有用性が報告されている。MDPのアジュバント効果は免疫担当細胞に対する多様な生物学的作用によるものと考えられている。例えば、MDPは単球やマクロファージの貪食能を亢進させ、B細胞のMHC class II、CD40、ICAM-1等の発現を増強させることが報告されている。しかし、MDPが生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cell: DC) に対してどのように作用するかに関しては全くわかっていない。本研究では、MDPの誘導体のなかでも最も高い生物活性を示すアジュバントとして知られているMDP-Lys (L18) とヒト末梢血由来のDCを用いて、MDP-Lys (L18) がDCの表面分子の発現や、サイトカイン産生能、抗原提示能に与える影響について検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

2mMのL-グルタミン、10mMのHEPES、20  $\mu$ g/mlのゲンタマイシン、10%のFCS、IL-4 (1000U/ml)、GM-CSF (1000U/ml) を含むRPMI-1640を培地として用い、MDP-Lys (L18) は第一製薬社製を使用した。ヒト末梢血は健常人へパリン加全血より分離し、MACS (magnetic cell sorting) を用いた磁気ソートによってCD14陽性 (CD3<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>) 細胞を分離した後、 $2 \times 10^6$ /ml の濃度で37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。7日間培養後、浮遊細胞を回収、洗浄し、様々な濃度のMDP-Lys (L18) と共に72時間再び培養した。培養細胞は2カラー標識を行い、PE標識CD1a、CD83、CD40、CD80、CD86、FITC 標識HLA-DRを用い、EPICS Profile-IIフローサイトメーターで解析した。またR&DのELISAキットを使用して培養上清中のIL-6、IL-8、IL-10、IL-12 (p40)、TNF- $\alpha$  を測定した。allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) は、CD45RA 陽性T細胞とMDP-Lys (L18) で72時間培養したDCを2000 Radの放射線照射後に、10%の正常ヒトAB血清、10  $\mu$ g/mlのゲンタマイシン、25mMのHEPES、50  $\mu$ Mの2-メルカプトエタノールを加えたRPMI-1640で、37°C、5%CO<sub>2</sub> で4日間培養し、<sup>3</sup>Hチミジン (1  $\mu$  Ci) を16時間添加してその取込みを計数した。

### 〔結果〕

1. 7日間培養された細胞は99%以上がCD1aとHLA-DRを発現しており、phenotypic にDCに分化した。また、CD80、CD86、CD40を強発現していたが、CD83の発現は低かった。
2. 培養DCにMDP-Lys (L18) を添加したところ、CD80、CD83、CD86、CD40の発現を濃度依存性に増強させた。
3. サイトカイン産生では、MDP-Lys (L18) はTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 (p40) の産生を濃度依存性に増加させた。

4. allogeneic MLRでは、MDP-Lys(L18)添加によってDCの抗原提示能は著明に増強した。

[考察]

MDP-Lys(L18)がCD80、CD86、CD40、CD83等の表面抗原の発現を濃度依存性に増強することはDCを成熟させることを示唆している。さらにIL-6、IL-8、IL-12(p40)、TNF- $\alpha$ 等のサイトカイン産生の誘導は、MDP-Lys(L18)が生体内において直接DCからのサイトカイン産生を増加させることによって免疫応答を高めていると推察される。また、allogeneic MLRの結果から、MDP-Lys(L18)がDCの抗原提示能を著明に増強させることが示され、病原体や腫瘍などの非自己の抗原に対するinnate immunityの成立に必須のDCの機能を強めることが明らかとなった。

[結論]

MDP-Lys(L18)は、生体で最も重要な抗原提示細胞であるDCを活性化し、共刺激分子の発現の増強、サイトカインの産生を促し、そして抗原提示能を亢進させることによって、その強力なアジュバンド効果を発揮する可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

Muramyl dipeptide(MDP)は細菌細胞壁のペプチドグリカンの最小構成成分であり、アジュバンド効果を示すことが知られている。このMDPのアジュバンド効果は単球、マクロファージ、B細胞などの免疫担当細胞に対する多様な生物活性の増強によることが知られている。申請者らはMDP誘導体の中でも最も強いアジュバンド効果を示し、発熱などの副作用の少ないMDP-Lys(L18)を用いて、ヒト末梢血由来の強力な抗原提示細胞である樹状細胞(dendritic cell:DC)に与える影響を検討した。

申請者らは、ヒト末梢血より単クローン抗体のカクテルを用いた磁気ビーズによるネガティブセレクションにより、CD14陽性細胞(>98%)を分離した。その後、GM-CSFとIL-4の存在下で7日間培養し、更にMDP-Lys(L18)と共に72時間培養した。これらの細胞の表面抗原(CD1a、CD83、CD40、CD80、CD86、HLA-DR)の発現を2カラー標識により、フローサイトメーターで解析した。また、培養上清中の各種サイトカイン濃度をELISAにより測定した。リンパ球混合培養反応(mixed lymphocyte reaction:MLR)はCD45RA陽性T細胞を反応細胞、MDP-Lys(L18)で刺激し放射線照射したDCを刺激細胞として4日間培養し、 $^3\text{H}$ チミジンの取り込みで測定した。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) GM-CSFとIL-4で7日間培養して得られた細胞は99%以上CD1aとHLA-DRを発現しており、DCに分化していた。これらの細胞は補助刺激分子であるCD80、CD86、およびCD40を強発現していたが、CD83の発現は低く未熟DCと考えられた。
- (2) 表面抗原の発現誘導:MDP-Lys(L18)でこのDCを刺激したところ、CD80、CD83、CD86、CD40の発現が濃度依存的に増強した。
- (3) サイトカイン産生:MDP-Lys(L18)刺激によりDCはTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p40)の産生を濃度依存的に増強した。
- (4) MLR:MDP-Lys(L18)で刺激したDCはアロ CD45RA陽性T細胞の増殖性反応を著明に増強した。

以上より、申請者らはMDP-Lys(L18)がDCを成熟させ、同時に各種サイトカインを産生誘導させること、およびMLRの刺激能を増強することを証明した。MDP-Lys(L18)はこれらの機序により、アジュバント効果を発揮すると推察した。

審査委員会では、MDPの誘導体で特にアジュバント効果の強いMDP-Lys(L18)を用いて、T細胞に対する強力な抗原提示能を示すヒトDCに対する効果を詳細に検討した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) MDP-Lys(L18)構築の理論的根拠は
- 2) DCのヒト末梢血からの回収率について
- 3) GM-CSFとIL-4の存在下で誘導されるDCの種類は
- 4) 上記DCは未熟DCか
- 5) MLRの反応性T細胞にCD45RA<sup>+</sup>(ナイーブ)T細胞を使用した理由は
- 6) MDP-Lys(L18)で刺激したDCが2峰性のCD83 発現パターンを示す理由は
- 7) MDP-Lys(L18)刺激でDCがHLA-DRの発現増強を示さない理由は
- 8) MLRにおいて、コントロールとMDP-Lys(L18)刺激DC間で有意差はあるか
- 9) MDP-Lys(L18)によって誘導されるケモカインについて
- 10) MDP-Lys(L18)認識におけるTLR分子の関与は
- 11) NOD2によるMDP-Lys(L18)の認識機構について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	副査	瀧 川 雅 浩	副査	大 西 一 功
---------	----	---------	----	---------	----	---------