



Differential effect of DHEA on mitogen-induced proliferation of T and B lymphocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂倉, 雄二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/330

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	医博第 473号	学位授与年月日	平成18年 9月22日
氏名	坂倉雄二		
論文題目	Differential effect of DHEA on mitogen-induced proliferation of T and B lymphocytes (マイトジェンによる T および B リンパ球の増殖に対する DHEA の異なった効果)		

博士(医学) 坂倉雄二

論文題目

Differential effect of DHEA on mitogen-induced proliferation of T and B lymphocytes

(マイトジェンによるTおよびBリンパ球の増殖に対するDHEAの異なった効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は分泌量が思春期に増大してピークに達し、以降年齢と共に減少するといったユニークなステロイドホルモンである。また血中に高濃度に存在するホルモンであり、肥満、糖尿病、発癌、動脈硬化等に対して予防的な作用を及ぼすとの研究もあり臨床的意義が注目されている。DHEAは免疫反応を調節しているとされ、抗ウイルス作用や抗細菌作用を示すことが*in vivo*では報告されているが、DHEAの免疫直接作用か否かは不明である。今回我々はヒト末梢血単核球と純化されたヒトT細胞、B細胞を用いて、それらの細胞にDHEAはどのような影響を与えるかについて検討した。

〔材料及び方法〕

- (1) 健康体のドナーより全血採血し、Ficoll Hypaqueにて単核球に分離した。分離した単核球はmagnetic sorting法によりそれぞれT細胞、B細胞を分離した。
- (2) 分離した単核球 (2×10^5 cells/well) は96穴プレート中でRPMI 1640 medium中にT細胞マイトジェンであるphytohemagglutinin (PHA) やconcanavalin A (Con A)、B細胞マイトジェンであるpokeweed mitogen (PWM) やStaphylococcus aureus Cowan strain I (SAC) を添加し培養した。培養液中にDHEAをそれぞれ 10^{-5} ~ 10^{-8} M培養開始時に加えた。48時間で培養は終了するが、その18時間前に $0.5 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ thymidine を添加し、培養終了後に液体シンチレーションカウンターを用いてチミジンの取り込みを測定した。
- (3) 分離した単核球 (2×10^5 cells/well) はそれぞれ96穴プレート上でRPMI 1640 medium中にSACを添加し培養した。培養液中にDHEAをそれぞれ 10^{-5} ~ 10^{-8} M培養開始時に加えた。7日間培養し、その上清中のIgG、IgA、IgMをELISA法にて測定した。
- (4) DHEAをT細胞と同時に培養することで、androstenedione、testosterone、androstenediolなどの代謝産物に変化するかを確認するため、分離したT細胞 (2×10^5 cells/well) を、96穴プレートでRPMI 1640 medium中にDHEAを 10^{-6} M加え、48時間培養した。その上清を採取し、DHEAやその代謝産物の存在をliquid chromatography-tandem mass (LC-MS-MS) を用いて確認した。

〔結果〕

単核球をB細胞マイトジェンであるPWMで誘導させた時、DHEAを加えない場合 ($97.63 \pm 3.79\%$) と比べDHEAを 10^{-6} M ($110.46 \pm 5.84\%$, $p < 0.05$) と 10^{-7} M ($111.83 \pm 6.4\%$, $p < 0.05$) 加えた場合に増殖が有意に上昇した。SACで誘導した場合、どの濃度のDHEAを加えても増殖に有意の変化はなかった。IgG、IgA、IgM共にDHEA濃度にかかわらず、影響を与えなかった。

単核球をT細胞マイトジェンであるPHAで誘導させた場合、DHEAを加えない場合 ($99.73 \pm 3.31\%$) と比べ 10^{-5} MのDHEA存在下で増殖が有意に抑制した ($59.22 \pm 12.5\%$, $p < 0.05$)。Con Aで誘導させた場合も、DHEAを 10^{-5} M加えた場合に増殖が有意に抑制された ($76.24 \pm 6.55\%$, $p < 0.05$)。純化したT細胞をCon Aで

誘導させた場合も同様に、 10^{-5} MのDHEA存在下で増殖が有意に抑制した($53.53 \pm 16.90\%$, $p < 0.05$)。これらPHAとCon Aによる増殖反応で濃度依存性の抑制が存在した。T細胞をDHEAと同時に培養し、その上清中のステロイドをLC-MS-MSで確認した結果、androstenedione、testosterone、androstenediolなどのDHEAの代謝産物は確認できなかった。

〔考察〕

DHEAはandrogenの前駆体であるが、最近その生理作用が急速に解明され始め、免疫調節作用に関与していると言われている。本研究においてはB細胞に関して、一部の濃度のDHEAは増殖能を増強したが、有意なものは限定されていた。一方、DHEAはT細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、 10^{-5} MのDHEAではすべての系で有意に増殖が抑制された。さらに、T細胞とDHEAを2日間培養しても、代謝産物が検出されなかったことから、この抑制効果はandrostenedione、testosterone、androstenediolなどのDHEAの代謝産物による間接的な効果ではなく、DHEA自身による直接的な効果であることが示唆された。

〔結論〕

DHEAはT細胞の増殖を濃度依存性に抑制した。T細胞とDHEAを培養しても、DHEAが代謝されなかったことから、この抑制効果はDHEA自身によることが示唆された。一方、DHEAはB細胞の増殖を増強する傾向を示したが、抗体産生に関しては効果を示さなかった。以上よりDHEAは各種のリンパ球に対して異なった作用を示し、免疫関連疾患などにおいて免疫反応の調節に独自の作用を果たす可能性も考えられる。

論文審査の結果の要旨

Dehydroepiandrosterone (DHEA)は副腎から分泌される主要なステロイドホルモンである。DHEAの分泌量は思春期にピークに達し、以後加齢と共に減少する。また、肥満、糖尿病、発癌、動脈硬化などに対して予防効果を示すとの研究もあり、臨床的意義が注目されている。以上の理由から、現在一般的には抗加齢効果を期待してサプリメントとして用いられている。興味あることに、DHEAは免疫応答をも調節していることが明らかにされている。しかし、これらの報告は実験動物を用いた*in vivo*の結果であり、DHEAがヒトの免疫担当細胞に直接作用するかどうかは不明である。そこで、申請者らはヒト末梢単核球と純化したヒトTリンパ球、Bリンパ球を用いて、これらの細胞に与えるDHEAの影響について検討した。

方法と得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) 健康人の静脈血より、Ficoll-Hypaque比重遠心法で単核球を分離した。更に、抗体/磁気ビーズ法により、TおよびBリンパ球を分離した。
- (2) 単核球をBリンパ球マイトジェンであるpokeweed mitogen (PWM)で48時間刺激を行い、DHEAの増殖反応に与える影響を $[^3\text{H}]$ Thymidineの取り込みで検討した。その結果、DHEAは 10^{-6} M および 10^{-7} Mで有意に増殖を増強した。同様にBリンパ球を刺激する*Staphylococcus aureus* Cowan strain I (SAC)で増殖を誘導した場合には、DHEAはどの濃度でも影響を与えなかった。また、DHEAはSACで産生誘導されたIgG、IgA、IgM量に影響を与えなかった。
- (3) 単核球をTリンパ球マイトジェンであるphytohemagglutinin (PHA)またはconcanavalin A (ConA)で刺

激した場合、DHEAは 10^{-5} Mで有意に増殖を抑制した。

- (4) Tリンパ球を純化してから、ConAで刺激した場合も 10^{-5} MのDHEA存在下で有意に増殖が抑制された。
- (5) Tリンパ球をDHEAと共に48時間培養し、その上清中のステロイドをliquid chromatography-tandem mass (LC-MS-MS)で解析した結果、androstenedione、testosterone、androstenediolなどのDHEAの代謝産物は確認出来なかった。

以上より、申請者らは、DHEAの免疫応答に及ぼす影響に関して、Bリンパ球に与える影響は限定的なものであり、主にTリンパ球の増殖反応を濃度依存的に抑制することが主体であると考えた。また、DHEAとTリンパ球を培養しても、代謝産物が検出出来なかったことから、Tリンパ球に対する抑制効果はDHEA自身の直接的効果であると考えた。

審査委員会では、DHEAの免疫応答に与える影響をヒトTリンパ球およびBリンパ球を用いて*in vitro*で詳細に解析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) 実験に用いたDHEAの濃度の妥当性について
- 2) 実験に用いたDHEAの溶媒について
- 3) 分離したTおよびBリンパ球の純度について
- 4) DHEAは高濃度ではPWM刺激によるBリンパ球の増殖を抑制するか
- 5) DHEAのBリンパ球の増殖増強効果にPWM刺激とSAC刺激で差がある理由について
- 6) リンパ球の増殖を%コントロールで示した理由について
- 7) ConAによるTリンパ球増殖反応に単球/マクロファージは必要でないか
- 8) 純化したTリンパ球におけるCD4/CD8比を測定したか
- 9) Tリンパ球にDHEA受容体は存在するか、存在すればその局在は
- 10) 単球/マクロファージと培養した場合のDHEA代謝産物について

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 沖 隆