

の探索を進めてゆく予定である。

5-②-1.

美白成分による自己免疫性白斑症誘発の作用機序の解明

(医学総合研究所)

○片平 泰弘、溝口 出、井上 楨也
長谷川英哲、善本 隆之

2013年に美白化粧品の有効成分でメラニン合成に重要なチロシナーゼの阻害剤ロドデノール(RD)による白斑発症が、社会問題になった。この原因は、RD自身がチロシナーゼにより代謝活性化され、酸化された毒性物質オルトキノンを生じ、活性酸素を産生し、メラノサイト特異的に細胞傷害を引き起こし、メラノサイトが減少・消失し白斑を発症したと考えられている。この時、皮膚病変部では、細胞傷害性CD8⁺T細胞などの浸潤が見られることや、発症のHLA依存性が高いこと、患部より離れた場所でも起こることなどより、自己免疫反応の誘導の関与も示唆されているが、その作用機序については不明の点が多い。

そこで、本研究では、RDによる白斑誘発には、RDがメラノサイトの細胞死を誘導し、DCを活性化し、CTLを誘導するという仮説を考えて、その作用機序の解明を試みた。そこで、まず、DCとしてヒト単球様細胞株THP-1を、メラノサイトとしてヒトメラノーマSK-MEL-37を用いて、いわゆるトランスウェルのインサートに3次元培養用のScaffold(足場材)内で培養したSK-MEL-37を入れ、その下に通常の2次元培養のTHP-1を入れる共培養系を開発した。この系に、上からRDを加えると、SK-MEL-37が存在すると、SK-MEL-37の細胞死の誘導と共に、THP-1の細胞表面上にDCの成熟化マーカーである共刺激分子CD86の発現増強を誘導することを見出した。この時、SK-MEL-37が無いとCD86発現増強が見られず、活性酸素種の除去剤である抗酸化剤N-アセチルシステイン処理によっても、CD86発現増強が抑制された。RDと同様に白斑誘発作用が知られているラズベリーケトンでも、同様に、SK-MEL-37存在下で、THP-1の細胞表面上にCD86発現増強が見られたが、白斑誘発作用がない美白成分アルブチニンやアスコルビン酸で

は、CD86発現増強は見られなかった。

以上の結果より、RDが、ハプテン様の分子として、メラノサイトに作用して細胞死を誘導すると、活性酸素種産生を介しDCの成熟化を誘導し、自己免疫性白斑症を誘発する可能性が示唆された。

5-②-2.

ヒトPD-1/PD-L1抗体のT細胞疲弊解除機能を評価する分子イメージングシステムの確立

(免疫学分野、熊本大学医学部呼吸器外科)

○西 航

(免疫学分野)

若松 英、豊田 博子、古畑 昌枝
塚本 昌子、町山 裕亮、西嶋 仁
横須賀 忠

(免疫学分野、慶應義塾大学医学部呼吸器内科)

竹原 朋宏

(熊本大学医学部呼吸器外科)

鈴木 実

T細胞の活性化にはT細胞受容体と副刺激受容体の両方からの活性化シグナルが必要となる。この副刺激受容体は活性化と抑制性に分けられ、後者を特に「免疫チェックポイント分子」と呼んでいる。近年、複数の免疫チェックポイント阻害薬が開発・臨床応用され免疫療法は標準治療の1つとなりつつある。なかでもヒトPD-1とそのリガンドの結合を阻害するヒト型抗PD-1(CD279)/PD-L1(B7-H1, CD274)抗体は、本邦でも現在5種類が承認されており、それぞれに一定の効果をj得ている。今回我々は、T細胞腫瘍株およびマウスプライマリーT細胞にヒトPD-1を導入し、ヒトPD-L1発現標的がん細胞、抗原提示細胞、および抗原提示人工脂質二重膜を用いて受容体をクロスリンクした時、さらにここにヒト型抗PD-1/PDL1抗体を添加し結合阻害した際のPD-1および下流のシグナル伝達分子を高解像分子イメージングならびに生化学的・生理学的な解析を行った。ヒトPD-1を導入したT細胞腫瘍株をヒトPD-L1発現標的がん細胞や抗原提示細胞と細胞-細胞接着させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてヒトPD-1とヒトPD-L1が2つの細胞接着面「免疫シナプス」に集まることを確認した。さらに、抗ヒトPD-L1モノクローナル抗体(MIH1)でこの接着

が阻害されることを確認した。同細胞を用いて ELISA 法による IL-2 測定を行い、ヒト PD-1 とヒト PD-L1 の結合により IL-2 産生が低下すること、これに上記抗ヒト PD-L1 モノクローナル抗体を加えることで IL-2 産生が回復することを明らかにした。これらによりヒト PD-1 においてもマウス PD-1 と同様に、免疫シナプス面においてリガンド依存的に「PD-1 マイクロクラスター」が形成され、T 細胞活性化を負に制御する可能性と、PD-1 マイクロクラスターを可視化することで T 細胞の活性化および抗 PD-1/PD-L1 抗体の機能評価ができる可能性が示唆された。今後は各種治療用抗体の T 細胞疲弊解除機能を直接的に比較し、最終的には今後新たに開発されるであろう治療用抗体の機能も評価可能なシステムを確立できればと考えている。

5-②-3.

肺動脈性肺高血圧症における Notch3 シグナル関連遺伝子の検討

(医学部医学科 4 年)

○清水 希来

(細胞生理学分野)

加藤 優子、谷藤 章太、横山 詩子

【背景・目的】 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺動脈圧が高度に上昇する疾患で、病態には炎症や細胞増殖などが関与する。近年、血管平滑筋に発現する notch receptor 3 (Notch3) の PAH への関与が注目されている。Notch3 は、抗炎症作用、細胞増殖抑制作用をもつ transforming growth factor beta 2 (TGFB2) や Delta/Notch-like epidermal growth factor-related receptor (DNER) と相互作用するが、PAH 病態における Notch3 を介した分子メカニズムは未解明である。本研究では PAH 患者の肺動脈平滑筋細胞を用いて、加圧および炎症による Notch3 とその関連分子の遺伝子発現変化を検討した。

【方法】 特発性肺高血圧症 (IPAH)、家族性肺高血圧症 (FPAH) および健常者から得た肺動脈平滑筋細胞を高圧力下または大気圧下にて培養し、PGE2、PGI2 刺激と無刺激を加えた。これら 18 種の細胞から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結果】 大気圧下における IPAH、FPAH の Notch3 の発現は健常者群に比べ 1.2 倍に増加しており、加

圧により Notch3 の発現量は 0.2 倍に減少していた。TGFB2 については、健常者群および IPAH、FPAH の全ての群で加圧により発現量は減少した (0.3 倍～0.4 倍)。DNER は健常者群で PGE2 投与による発現量の変化は生じなかったが、PAH 群では PGE2 投与により発現量は 358～378 倍に増加した。

【考察】 患者群の加圧下で TGFB2 が減少したことから、加圧下では抗炎症作用、細胞増殖抑制作用が減少していることが推察される。また、PAH 患者において DNER が非正規リガンドとして働くことで Notch3 シグナル亢進に寄与していることが示唆された。

5-②-4.

肺動脈性肺高血圧症における圧力のアポトーシスに及ぼす作用

(医学部医学科 4 年)

○奥村 祐輝

(細胞生理学分野)

加藤 優子、谷藤 章太、横山 詩子

【背景】 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺動脈圧の著明な上昇をきたす難治性疾患である。酸化ストレスによる肺動脈平滑筋細胞の増殖、抗アポトーシスの亢進により血管壁が肥厚し、内腔が狭窄して肺動脈圧が上昇するという病態基盤が提唱されている。近年、機序の異なる複数の治療薬が開発され予後が飛躍的に改善したが、治療に抵抗性を示す症例もあり、全く新しい機序の治療薬の開発が望まれている。

【目的】 独自に開発した加圧装置を用い、これまで不可能であった加圧下での培養をした患者由来細胞を用いて RNA シークエンシングをおこない、アポトーシスに関連する遺伝子を探索する。

【方法】 健常者と特発性 PAH、家族性 PAH 由来の肺動脈平滑筋細胞を使用し、それぞれ大気圧、高圧力下で培養し、RNA を抽出して RNA sequence による網羅的遺伝子発現解析をおこなった。

【結果】 健常者、特発性および家族性 PAH 患者由来の肺動脈平滑筋細胞の全てにおいて、大気圧下に比べ加圧下で、酸化ストレスを低減しアポトーシス抑制に関与する putative uncoupling protein 2 (UCP2) の遺伝子発現の亢進がみられた (健常者 3.2 倍、特