

なレセプターとして働いており、真菌への免疫応答において役割を担っていることが示された。

6. DSS/LPS 刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生におよぼすリポソームの影響

(東京薬大・薬・薬物送達学)

河野 麻子、根岸 洋一、新楨 幸彦

【目的】炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、腸管粘膜免疫機構の破綻により管腔抗原に対する過剰な免疫反応が誘導され、持続性の炎症が惹起・進展すると考えられている。食事の欧米化やストレス、細菌感染、遺伝など、さまざまな要因が考えられているが、明らかな原因は不明であり、根本的な治療法は確立されていない。

我々はこれまで、phosphatidylserine (PS) を構成脂質とする負電荷リポソーム (PS-リポソーム) がマクロファージの機能を抑制し、TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を阻害することを明らかとしてきた。そこで我々は、炎症性サイトカインの過剰産生が指摘されている IBD に対して PS-リポソームの応用を企図した。本研究では炎症性腸炎モデル動物の作製に用いられる Dextran Sulfate Sodium (DSS) およびグラム陰性菌の外膜成分であるリポ多糖 (LPS) により刺激したマクロファージからの炎症性サイトカイン産生におよぼす PS-リポソームの影響について *in vitro* で検討を行った。

【方法】PS:PC:Chol=2:1:1, PC:Chol=3:1 (モル比) の脂質組成からなる PS-リポソームおよび PC-リポソームを vortexing 法で調製した。BALB/c マウス (♀、6~8 週齢) に 3% thioglycollate 1 mL を腹腔内投与し、4 日後に腹腔内浸潤マクロファージ (PEC) を採取し、96 well プレートに播種後、リポソーム (最終濃度 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、37°C、24 時間インキュベーションした。さらに、DSS (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、37°C、6 時間インキュベーション後、LPS (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、37°C、18 時間インキュベーションした。得られた培養上清中のサイトカインの濃度を sandwich ELISA 法により定量した。

【結果・考察】これまで我々は LPS 刺激によるマクロファージからの nitric oxide 産生や TNF- α 産生が PS-リポソームの前処理により顕著に抑制されることを報告してきた。これらの結果と同様、DSS/LPS 刺激により誘導される炎症性サイトカインである IL-1 β の産生は、負電荷である PS-リポソーム処理により著しく減少した。一方、中性電荷である PC-リポソーム処理においては IL-1 β 産生に変化は認められなかった。また、マクロファージからの IL-1 β 産生は LPS 単独処理に比べ、DSS と LPS の併用により顕著に増大した。PS-リポソームによるマクロファージの前処理により、サイトカインの産生が抑制されたことから、PS-リポソーム処理により、これらの

サイトカインの産生抑制因子の誘導が示唆されるが、詳細な抑制機構および腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* における PS-リポソームの効果については今後合わせて検討を加える予定である。

7. 眼腫瘍における免疫補助シグナル分子の発現と抗腫瘍免疫応答における役割について

(眼科学講座) 白井 嘉彦、馬 娟、奥貫 陽子
後藤 浩

(順天堂大学浦安病院眼科)

溝田 淳

【目的】眼腫瘍における代表的な cell line である網膜芽細胞腫細胞株 (Y-79) と脈絡膜悪性黒色腫細胞株 (92-1, OCM-1, OMM-1) を用いて免疫細胞が腫瘍細胞を認識し殺細胞効果を示すのに重要である主要組織適合抗原 (MHC)、補助シグナル分子の発現とその役割について検討する。

【方法】Y-79, 92-1, OCM-1, OMM-1 を IFN- γ の刺激あるなしで 48 時間培養し、MHC クラス I, MHC クラス II, CD80, CD86, CD40, B7H1, B7H2, B7DC, 4-1BBL の各種モノクローナル抗体を用い発現をフローサイトメトリーにて解析した。また CD40 に対するリコンビナント CD40L (rhCD40L) を用いて CD40/CD40L 経路における役割も検討した。

【結果】flow cytometry の結果、Y-79 は MHC クラス I と CD40 においては IFN- γ の刺激なしに恒常的に発現し、IFN- γ においてその発現は増強された。B7H1 においては IFN- γ の刺激により発現の誘導が認められた。92-1, OCM-1, OMM-1 は IFN- γ の刺激により、MHC クラス I の発現が増強し、B7H1 の発現が誘導された。放射線照射 (30 Gy) により OCM-1 では活性化補助シグナル分子の一つである CD40 の発現が選択的に誘導された。この CD40 の発現は IFN- γ の前処理により増強した。92-1 や OMM-1 においては放射線照射の有無にかかわらず、CD40 の発現はみられなかった。Y-79 に rhCD40L を *in vitro* に添加 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) したところ、IFN- γ 刺激があってもなくともコントロール抗体に比べて MHC-class I および ICAM-1 の発現がみとめられ、IFN- γ 刺激により MCP-1 が誘導された。

【考察】IFN- γ の刺激なしでは、CD40 以外の補助刺激分子の発現が認められないこと、また IFN- γ の刺激により他の T 細胞を活性化するような補助刺激分子は発現せず免疫回避機構を促進する B7H1 を発現することで免疫学的にこれらの眼腫瘍は悪性度が高い癌であることが示唆された。