

論文要旨

「粒子状 β -リン酸三カルシウムにより誘導される免疫応答に関する研究」

人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻 田井祥子

リン酸カルシウムは、リン酸イオンのタイプやカルシウムとリン酸の比率によって、構造や物理化学的性質が多岐にわたり、健康・医療から工業まで幅広い分野で利用されている。特に生体適合性の高いハイドロキシアパタイトや β -リン酸三カルシウム (β -TCP) は、骨修復を補助する生体材料として広く臨床応用されている。しかし生体内で断片化したリン酸カルシウム化合物の粒子が、骨修復に不都合な炎症反応を引き起こすことが知られている。一方でこのような免疫応答の誘導は、感染症やがんの治療に有用である可能性がある。本研究では、 β -TCP の免疫系に対する作用とその機序を明らかにし、健康や医療の分野での新たな応用の可能性について検討することを目的とした。

研究には、化学合成の後に焼結した、粒子径 $5.373 \pm 0.342 \mu\text{m}$ (mean \pm standard deviation) の粒子状の β -TCP を用いた。初めに、生体内において β -TCP が免疫系に与える影響を検討した。マウス皮下に β -TCP を移植して周囲組織の病理学的解析を行ったところ、早期には好中球、後に組織球 (マクロファージ)、多核巨細胞、リンパ球など多数の免疫細胞が遊走されて集積し、炎症様の免疫応答が惹起された。また E.G7-OVA マウス腫瘍モデルを用いて、 β -TCP の作用を調べたところ、 β -TCP は腫瘍抗原投与による免疫応答 (抗腫瘍効果) を増強した。これらのことより、 β -TCP が生体内において免疫系を刺激、活性化することが明らかになり、さらにその作用は自然免疫を活性化するだけでなく、適応免疫応答を増強していることが示唆された。

次に自然免疫と適応免疫をつなぐ中心的な役割を担う、樹状細胞 (DC) とマクロファージ (MΦ) に対する β -TCP の影響を検討した。マウス骨髄細胞より分化誘導した DC および MΦ の培養系に β -TCP を添加して 24 時間刺激し、細胞表面の免疫関連分子の発現や、培養上清中に分泌されたサイトカインやケモカインの産生を解析した。DC と MΦ ともに培養開始数時間から β -TCP を貪食して細胞内に取り込む様子が観察され、抗原提示分子 MHC や、T 細胞活性化を促す共刺激分子の発現が亢進した。DC ではリンパ節への遊走に重要な CCR7 の発現量も上昇した。また両方の細胞において、CCL2、CCL3 および CXCL2 など、免疫細胞を遊走するケモカインの産生亢進が認められた。さらに DC ではエンドサイトーシス活性が低下し、機能的にも細胞の成熟が進んでいることが示された。これらのことより、 β -TCP が DC や MΦ の成熟活性化を促進することが明らかになった。

次に DC や MΦ において炎症刺激などによって活性化する、細胞質内蛋白複合体 NLRP3 インフラマソームに対する β -TCP の影響を検討した。マウス骨髄細胞より分化誘導した DC および MΦ、ヒトのマクロファージ THP-1 細胞を用い、LPS などによる一次刺激により pro-IL-1 β の合成を誘導した後に β -TCP を加えて刺激し、培養上清中に分泌された、インフラマソーム活性化の指標である IL-1 β の産生を測定した。また阻害剤によってインフラソーム活性化の誘導を阻害し、IL-1 β の産生を調べた。 β -TCP の刺激により、pro-IL-1 β のプロセッシングに必須の caspase-1 が活性化し、IL-1 β が分泌された。また caspase-1 の活性化や、細胞内カリウムイオンの流出、ファゴサイトーシス、ROS の産生など NLRP3 を活性化する危険シグナルを阻害すると、IL-1 β の分泌は抑制された。さらに NLRP3 インフラマソーム構成蛋白を欠損した THP-1 細胞においては、 β -TCP の刺激で IL-1 β はほとんど分泌されなかった。これらのことより、DC および MΦ において、 β -TCP が NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 β の分泌を誘導することが明らか

になった。

本研究によって、 β -TCP が自然免疫の抗原提示細胞である DC や M Φ の成熟活性化を促進し、NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こすこと、さらに自然免疫応答に引き続いて起こる適応免疫応答を増強することが明らかになった。 β -TCP は、骨補填剤として長い実績をもつ化合物であるが、免疫系の活性化を促進する新しい因子として、健康や医療の分野において応用されることが期待される。