

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	坂井 寛
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 TLR-MyD88-signaling blockades inhibit refractory B-1b cell immune responses to transplant-related glycan antigens (TLR-MyD88 シグナル阻害は治療抵抗性 B-1b 細胞の移植関連糖鎖抗原応答を抑制し得る)			
論文審査担当者			
主 査	教授	秀 道広	印
審査委員	教授	保田 朋波流	
審査委員	准教授	相方 浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>臓器移植において問題となる糖鎖抗原には, ABO 血液型不適合移植における血液型糖鎖抗原や, 将来的に臨床応用が期待される異種移植臓器に発現する糖鎖の一つである Gal<math>\alpha</math>1,3Gal<math>\beta</math>1,4GlcNAc (Gal) 糖鎖抗原などがある。これらの糖鎖に応答する B 細胞サブクラスは, Innate-like B 細胞と呼ばれる Marginal zone B 細胞や B-1 細胞で, B 細胞受容体 (BCR) を介して T 細胞非依存性に迅速に応答する。著者等の教室では, 血液型 A 型糖鎖抗原に応答する B-1 細胞は CD5<sup>+</sup>B-1a 細胞サブクラスに分類され, これは臨床で標準的に使用されるカルシニューリン阻害剤 (CNI) で抑制されることを報告してきた。一方で Gal 抗原応答性 B 細胞は CD5<sup>-</sup> B-1b 細胞フェノタイプを示し, これは CNI 抵抗性である。また, 病原微生物上の糖鎖抗原は, 自然免疫系細胞の toll-like receptor (TLR) を刺激することが知られ, B-1a/B-1b 細胞のどちらも TLR を有する。微生物糖鎖抗原による TLR を介した B 細胞活性効果はこれまでも注目されてきたが, 移植関連糖鎖抗原の TLR と BCR の相互作用やそのメカニズムは未だ不明である。また微生物糖鎖抗原に注目したこれまでの研究では, 感染症を対象疾患としている故, 活性化された B 細胞の抑制法については注目されていない。本研究では移植関連糖鎖抗原応答 B-1a/B-1b 細胞の TLR と BCR の相互作用やその細胞内分子メカニズムの解明, CNI 抵抗性の移植関連糖鎖応答 B-1b 細胞抑制法の開発を目的とし, <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> マウスモデルで検討したものである。</p> <p>著者等は, まず, <i>in vitro</i> B 細胞分化誘導モデルで, T 細胞非依存性 B 細胞サブクラス活性化メカニズムを解明した。野生型マウス脾 B 細胞の BCR を抗 IgM F(ab)<math>_2</math> により刺激すると CD5<sup>+</sup>B-1a 細胞へ分化する。このモデルに lipopolysaccharide (LPS) による TLR4 刺激を加えると CD5<sup>-</sup>B-1b 細胞へと分化した。CNI を投与すると, B-1a 細胞分化は抑制されたが, B-1b 細胞は CNI に抵抗性であった。次に TLR 下流シグナルに注目した。独立した 2 つの TLR4 下流シグナル経路のアダプター分子である MyD88 と TRIF をそれぞれ欠損 (KO) したマウスを用いて同様に <i>in vitro</i> モデルで検討した。TRIF-KO B 細胞を BCR 刺激とともに LPS で刺激すると (MyD88 シグナルのみ活性化), WT と同様に CD5<sup>-</sup>B-1b 細胞へ分化し CNI 抵抗性を示した。一方, MyD88-KO B 細胞では, LPS 投与/非投与に関わらず CD5<sup>+</sup>B-1a 細胞へ分化し, これは CNI で抑制された。すなわち, LPS 付加による B-1b 細胞分化, 及び CNI 抵抗性は TLR4-MyD88 シグナル依存性に誘導されることを明らかにした。またマウス B 細胞には TLR4 の他に TLR1/2/3/6/7/9 のサブクラスが発現しているが, MyD88 シグナル依存性の CNI 抵抗性 B-1b 細胞活性化は TRIF 依存性である TLR3 を除いた他の全てのサブクラス (TLR1/2/6/7/9) に一貫していることを明らかにした。</p> <p>更に, TLR 刺激が BCR 下流シグナルへ及ぼす影響と, CNI 抵抗性を誘導するメカニズムについて検討した。BCR-カルシニューリンの下流シグナル分子である NFATc1 や NF-<math>\kappa</math>B (p100/p52) は TLR 刺激で増強された。一方で MyD88-KO B 細胞ではこれらの増強は起こらなかった。つまり TLR-MyD88 シグナル刺激は BCR-カルシニューリン活性下流分子の NFATc1 を活性化するため, CNI に対して抵抗性を誘導すると考えられた。TLR 阻害剤による CNI 抵抗性 B-1b 細胞抑制効果について検討したところ, TLR 阻害剤</p>			

投与下では B 細胞は B-1a 細胞フェノタイプへと分化し、CNI との併用でこの分化は完全に抑制された。また、TLR 阻害剤は BCR 下流の NFATc1 および NK- $\kappa$ B (p100/p52) を抑制した。つまり、NFATc1 活性化により誘導された B-1b 細胞の CNI 抵抗性は、TLR 阻害剤により改善されることを *in vitro* モデルで証明した。血液型糖鎖抗原応答 *in vivo* マウスモデルでは、ヒト A 型赤血球刺激による A 型抗原応答性 B 細胞は、B-1a 細胞優位であったが、LPS の刺激を付加すると抗原特異的 B 細胞は B-1b 細胞優位に活性化され血清抗 A 型抗体の有意な上昇を認めた。B-1a 細胞優位の抗体産生は、CNI 投与により抑制されたが、LPS 刺激を加え B-1b 細胞優位に活性化された抗体産生は抑制されなかった。TLR 阻害剤と CNI の併用投与により B-1b 細胞は抑制された。さらに、異種 Gal 糖鎖抗原応答 *in vivo* マウスモデルでは、Gal-KO マウスに Gal 抗原を投与すると、Gal 抗原応答性 B-1b 細胞が活性化され、これらは CNI 単剤には抵抗性であった。前述の *in vitro* 実験で示されたように B-1b 細胞分化には TLR-MyD88 シグナルが必須であることより、Gal 糖鎖抗原は B 細胞上の TLR-MyD88 を刺激する可能性が示唆された。そこで、BCR / TLR-MyD88 をいずれも阻害することで、抗 Gal 抗体産生抑制効果を検討したところ、MyD88 阻害剤の併用投与は CNI 単剤に比較し、有意な抑制効果を認めた。この治療戦略を応用し、近年、血液悪性腫瘍に投与されている臨床薬剤を用い、新規 B 細胞抑制法の効果を同様のモデルで検証した。BCR 阻害は、BCR 経路の上流に必須のシグナル分子である Bruton's tyrosine kinase (BTK) 阻害剤を用いた。TLR-MyD88 阻害は histone deacetylase (HDAC) 阻害剤を用いた。これらの薬剤による BCR / MyD88 の阻害はほぼ完全に血清抗 Gal 抗体産生を抑制した。

以上の結果から、本論文は BCR / TLR-MyD88 の両経路を阻害することで、治療抵抗性の移植関連糖鎖抗原応答 B 細胞活性を克服する新たな治療戦略を提唱し、拒絶反応克服や異種移植の実現に繋がる可能性を示した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が坂井寛に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。