

分担研究報告書

樹状細胞における膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 に関する研究

研究分担者：白土 基明 九州大学大学院病態制御内科学 助教

研究要旨

樹状細胞は強力な抗原提示能を有しており、悪性腫瘍に対する免疫療法への応用が試みられている。しかし、その貪食から抗原提示までのメカニズムは未知の部分が多い。我々はマクロファージに発現が報告されている膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 が樹状細胞においても、特に貪食の盛んな未熟な段階に高発現していることを見いだした。

A. 研究目的

樹状細胞は感染免疫・腫瘍免疫において T 細胞に抗原を提示する重要な役割を持っている。われわれは膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 の樹状細胞での発現と機能につき解明する。

B. 研究方法

健常人末梢血より CD14 陽性細胞を磁気ビーズにて単離し、GM-CSF、IL-4 を添加して培養し未熟樹状細胞を誘導した。その後、TNF- α を加えてさらに培養し、成熟樹状細胞を誘導した。それぞれの Perforin-2 蛋白、mRNA をそれぞれ Western blot、RT-PCR にて検討した。

また、Perforin-2 に対する miRNA を組込んだベクターを作成し樹状細胞に導入し Perforin-2 の発現を低下させて抗原提示への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

健常人からの採血の際は文書で説明し同意を得た。

C. 研究結果

健常人末梢血より CD14 陽性単球分画を単離し、GM-CSF、IL-4 による刺激下に 7 日間培養し得られた細胞は形態的、表面マーカー上、未熟樹状細胞と考えられた。さらに TNF- α を加えて 2 日間培養を続けると、成熟樹状細胞となった。Perforin-2 蛋白の発現は未熟樹状細胞で高まり、成熟するとやや低下した。しかし mRNA の発現は単球分画が最も高く、次第に低下した。

Perforin-2 に対する siRNA ベクター（GFP 遺伝子を含む）を作成し、Nucleofector にて未熟

樹状細胞に導入を試みた。GFP 陽性率による導入効率に 10%～40%とばらつきが見られた。

D. 考察

健常人末梢血単球分画より誘導した樹状細胞において、Perforin-2 が発現していることを確認できた。蛋白レベルでは未熟樹状細胞において高発現であり、貪食過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。蛋白発現と mRNA レベルが相関しておらず、転写後調節の関与が考えられた。

樹状細胞への遺伝子導入は可能であったが、効率にばらつきが見られ、改良の余地がある。また、今後 mRNA レベルで抑制されていることを確認する予定である。

E. 結論

樹状細胞に膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 が発現していることを確認した。未熟樹状細胞に高発現することより貪食と抗原プロセッシングに関与している可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし