

## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第735号	氏名	曾我泰裕
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子	
	副査氏名	波多野豊	
	副査氏名	河波英克	
論文題目			
<p>Lipid Mediator Palmitoylethanolamide (PEA) inhibits pathogenic T cell differentiation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>  (脂質メディエーターパルミトイルエタノールアミド (PEA) は、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で病原性 T 細胞の分化を阻害する)</p>			
論文掲載雑誌名			
Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨			
<p>パルミトイルエタノールアミド (PEA) は抗炎症作用を持つ脂質メディエーターであり、自己免疫疾患やアレルギー性疾患の治療薬として注目されている。本研究では、PEA が獲得免疫系における T 細胞分化に与える影響を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> モデルを用いて解析した。</p> <p>脾臓由来のナイーブ T 細胞を用いた実験において、PEA は炎症性 T 細胞 (Th1、Th2、Th17) の分化を有意に抑制し、これらの細胞が産生する炎症性サイトカイン (IFN-<math>\gamma</math>、IL-5、IL-17A) の発現を低下させた。一方、制御性 T 細胞 (Treg) の分化やその主要な転写因子である Foxp3、さらに産生する IL-10 には影響を与えなかった。また、TCR 刺激による T 細胞活性化や細胞増殖にも影響を与えないことが明らかとなった。</p> <p>さらに、Toxoplasma gondii 感染マウスモデルでは、PEA 投与により IFN-<math>\gamma</math> 産生が抑制され、生存率が低下したが、IFN-<math>\gamma</math> 欠損マウスでは PEA 投与の有無にかかわらず生存率に差は認められなかった。一方、アレルギー性鼻炎モデルでは、PEA が Th2 応答を抑制し、血中の IL-4 産生細胞および抗原特異的 IgE の値を低下させるとともに、症状であるくしゃみおよび鼻かき行動を有意に減少させた。</p> <p>以上の結果より、PEA は炎症性 T 細胞分化を選択的に抑制する一方で、制御性 T 細胞分化には影響を与えないことが明らかとなった。本研究は、PEA が自己免疫疾患やアレルギー性疾患に対する治療応用の可能性を示す重要な知見を提供するものである。</p> <p>本研究は、PEA が獲得免疫系において炎症性 T 細胞の分化を選択的に抑制し、その治療応用の可能性を示唆する重要な知見を提供した。</p> <p>以上より、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第735号	氏名	曾我泰裕
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子	
	副査氏名	波多野豊	
	副査氏名	伊波英克	 印
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. パルミトイルエタノールアミド (PEA) はどの受容体を介して機能しているのか？ また、T細胞にはPPAR<math>\alpha</math>受容体の発現は認めるのか？</li> <li>2. PEAは体内で産生されるのか？そのメカニズムは？</li> <li>3. 既報における自己免疫疾患やアレルギー疾患でのT細胞分化のメカニズムは？</li> <li>4. C57BL/6およびBALB/cマウスを選んだ理由は何か？</li> <li>5. 使用したマウス週齢を8~16週とした理由は？</li> <li>6. <i>in vitro</i> experiment でのDMSO濃度は？また、DMSO単独添加での細胞への影響は？</li> <li>7. Murine helper T cell line 68-41 を選択した理由とこのcell lineの特性は？</li> <li>8. トキソプラズマを感染させる際、Vero cellを用いる利点について説明せよ。</li> <li>9. Fig 1でPEAがTh1分化を最も抑制する点について考察は？</li> <li>10. master transcription factorsの解析で、GATA3やIL-4発現の有意差がないが、Th2分化への作用は？</li> <li>11. PEAがTreg細胞分化に影響を与えなかったことはどう考察するか？</li> <li>12. PEAの選択的Th分化抑制の臨床意義や類似の作用を持つ分子は存在するか？</li> <li>13. トキソプラズマやアレルギー鼻炎モデルでのPPAR<math>\alpha</math>発現変動、PEA投与による影響は？</li> <li>14. 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおけるPEA低下の機序は何か？他の自己免疫性疾患においてもPEA低下が観察されているのか？</li> <li>15. 高病原性Th17と従来型のTh17細胞の違いについて説明せよ。</li> <li>16. マウスのくしゃみや鼻擦りの回数のカウント方法について説明せよ。</li> <li>17. 本研究の鼻炎モデルにおいて、PEA投与は鼻炎症状を改善させているにも関わらず、末梢血の好酸球数は影響されていない。その解釈や意義は？局所の好酸球数についてのデータはあるか？</li> <li>18. 気管支過敏症モデルや多発性硬化症モデルに対するPEAの効果を示した既報の研究において、その効果はPPAR<math>\alpha</math>依存性であったのか非依存性であったのか？</li> <li>19. SLE患者においてもPEAの減少は観察されるか？</li> <li>20. PEAの疼痛抑制効果と免疫系の抑制に共通の機序(サイトカインやその受容体)は働いているか。</li> <li>21. 既存のPPAR<math>\alpha</math>アゴニストとPEAの化学構造に類似性は認められるか。</li> <li>22. Fig. 3のCD4分化抑制実験をSLEモデルのPBLでも評価したか？</li> <li>23. Fig. 4, トキソプラズマ感染実験でPEA投与群の生存率が低下した最も重要な機序は？</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。 よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 曾 我 泰 裕

## 論 文 題 目

Lipid Mediator Palmitoylethanolamide (PEA) inhibits pathogenic T cell differentiation  
*in vitro* and *in vivo*

(脂質メディエーターパルミトイルエタノールアミド (PEA) は、*in vitro* および *in vivo*  
で病原性 T 細胞の分化を阻害する)

## 要 旨

ア. 緒言 (目的)

パルミトイルエタノールアミド (PEA) は、抗炎症作用を有する脂質メディエーターの一種で様々な疾患に対する治療薬として近年注目されている。我々はこれまでに PEA の自然免疫細胞に対する炎症応答の阻害効果を報告してきたが、獲得免疫細胞に対する作用はいまだ不明である。そこで PEA が直接 T 細胞に与える影響について *in vitro* および *in vivo* 実験によって解析した。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む)

①マウスの脾臓からナイーブ T 細胞を単離し、*in vitro* で各ヘルパー T (Th) 細胞へ分化させ、PEA が分化に与える影響をフローサイトメトリーおよび ELISA で解析した。

②CD4+T 細胞を単離し、TCR 刺激による T 細胞の活性化に PEA が与える影響を解析した。

③ナイーブ T 細胞を単離し、*in vitro* で各 Th 細胞へ分化させ、細胞分化に重要なマスター転写因子や各種サイトカインの発現に PEA が与える影響を real-time PCR で解析した。

④C57BL/6 WT および IFN- $\gamma$  KO マウスに *Toxoplasma gondii* ME49 株を感染させ Th1 応答を誘導したり、BALB/c WT マウスに OVA 抗原を免疫して Th2 応答のアレルギー性鼻炎モデルを誘導したりして、それら病態における PEA の影響を生体レベルで解析した。

#### ウ. 結果

①PEA は Th1、Th2、Th17 細胞への分化を有意に抑制したが、炎症抑制に働く制御性 T (Treg) 細胞分化には影響しなかった。また Th1、Th2、Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-5、IL-17A は PEA により有意に低下した一方で、Treg 細胞が産生する IL-10 には影響しなかった。

②PEA は TCR 刺激による T 細胞活性化マーカー CD25、CD69 の発現および IL-2 の産生、さらには細胞増殖に影響しなかった。

③Th1、Th17 細胞のマスター転写因子 Tbet、RoR $\gamma$ t は PEA により有意に低下し、Th2 細胞のマスター転写因子 GATA3 は低下傾向を示した。一方 Treg 細胞のマスター転写因子 Foxp3 には影響しなかった。また IFN- $\gamma$ 、IL-17A は PEA により mRNA レベルで有意に低下し、IL-4 は低下傾向を示した。一方で TGF- $\beta$  には影響しなかった。

④*Toxoplasma* を感染させた WT マウスにおいて PEA 投与は、IFN- $\gamma$  産生を有意に低下させ、生存率を有意に低下させた。一方、IFN- $\gamma$  KO マウスでは PEA 投与の有無に関わらずに生存率に差はみられず低値を示した。アレルギー性鼻炎マウスにおいて PEA 投与は、血液中の IL-4 産生細胞の割合と抗原特異的 IgE の値を低下させ、くしゃみと鼻かきの回数を有意に減少させた。

#### エ. 考察

PEA は TCR 刺激による活性化には影響せず、各 Th 細胞分化に必要な転写因子を抑制したことから、TCR 応答ではなく Th 分化に関わるサイトカインへの応答に影響を与えると考えられた。しかし、PEA による T 細胞分化抑制の作用機序はいまだ不明な点も多く、今後の課題である。

#### オ. 結語 (まとめ)

PEA は Th1、Th2、Th17 細胞分化を抑制し Treg 細胞分化は抑制しないことから、自己免疫疾患やアレルギー性疾患に対する治療応用の可能性を示す。