

学位論文題名

Cytotoxic T Lymphocyte Associated Molecule-4 (CTLA-4)

分子を介する T細胞抑制性シグナルの分子生物学的解析

学位論文内容の要旨

T細胞活性化に伴って細胞膜上に発現されるCTLA-4は、抗原提示細胞上に発現しているリガンドであるB7-1およびB7-2と強い親和性で結合する。CTLA-4ノックアウトマウスにおいてはT細胞のポリクローナルな活性化がおこり、激しい炎症反応を生じて生後2~4週齢で死に至る。そのため、CTLA-4は末梢でのT細胞活性化の負のシグナルを伝達すると考えられている。そのシグナル伝達機構についてはおもにin vitroの系で精力的に研究が行われているが、未だあきらかになっていない。したがってこのシグナル伝達機構を分子生物学的な手法をもちいて明らかにすることを本研究の目的とした。

はじめに筆者はCTLA-4レセプターに直接会合する膜近傍のシグナル分子に注目した。CTLA-4の細胞内にはN末端から165アミノ酸、182番目アミノ酸の位置に2つのチロシン残基が存在し、それぞれ機能分子の会合に重要と思われるYVKMおよびYFIP配列を形づくっている。YVKM配列がチロシンリン酸化されるとSHP-2チロシンフォスファターゼがSH2結合部位を介してCTLA-4に会合することが明らかになっている。また、おなじYVKM配列がリン酸化されていない状態ではクラスリンアダプタータンパクであるAP-2がCTLA-4の細胞内ドメインに会合するため、エンドサイトーシスによりCTLA-4の膜発現が抑制され、リガンドからの刺激を受けることができない。そのため、YVKM配列のチロシンリン酸化はCTLA-4のシグナル伝達に必須であると思われる。しかしながら、CTLA-4に直接会合し、YVKM配列をチロシンリン酸化するチロシンキナーゼの本態はいまだ不明であった。筆者はリポフェクション法を用いた共発現法によってサイトカインレセプターの主要なシグナル伝達分子であるJAK2チロシンキナーゼがCTLA-4のYVKM配列を特異的にチロシンリン酸化することを明らかにした。また、JAK2は293T細胞株およびHUT78ヒトT細胞株でCTLA-4の細胞内のプロリンに富む特定の領域に恒常的に会合していることをカルボキシル末端欠失型CTLA-4を作製して明らかにした。インターフェロン γ 刺激により細胞内のJAK2を活性化させたところ、CTLA-4の細胞膜上への発現が上昇したことより、JAK2はサイトカイン刺激などによって活性化し、CTLA-4のYVKM配列をチロシンリン酸化することによりCTLA-4の細胞膜上への輸送を起し、CTLA-4のシグナル伝達に関わることが示唆された。

筆者は次にCTLA-4独特の抑制性シグナルを伝達する会合分子をT7ファージcDNAディスプレイ法をもちいて検索することを試み、マウス活性化脾臓細胞よりT7ファージcDNA

ライブラリーを構築した。CTLA-4の細胞内アミノ酸配列を模したペプチドのYVKM配列にあらかじめリン酸化を施したペプチドを標的としてこのファージライブラリーをスクリーニングしたところ、機能不明のEST(Expressed Sequence Tag)データベース登録配列を持ったクローンが非常に強く会合し、増幅された。この断片をプローブとして各臓器でのメッセンジャーRNA発現をノーザンブロットングで解析したところ、胸腺、リンパ節および脳で強い発現がみられ、この分子がCTLA-4のシグナル伝達に重要なはたらきをもっていることが示唆された。

さらに筆者はCTLA-4が影響をあたえる細胞内シグナル伝達カスケードについての解析を行った。CTLA-4はT細胞においてTCRの刺激下におけるJNK、ERKおよびNF κ Bといったシグナル経路を抑制することが知られている。しかしながら、これらのシグナル伝達経路はTCR刺激のみならず多くのサイトカインレセプター、アポトーシス刺激、ストレス刺激などを核に伝達するために広く用いられる共通の経路である。したがって、CTLA-4が他の刺激に関してもこれらのシグナル経路に干渉する可能性が考えられ、この点を明らかにするため、筆者は非T細胞であるNIH3T3細胞にCTLA-4を恒常的に導入した細胞を樹立し、この細胞を用いてサイトカイン刺激によるJNK、ERKおよびNF κ B経路の活性化にCTLA-4がどのように干渉するかをそれぞれの分子の活性化型特異的抗体を用いたウエスタンブロットによって解析した。CTLA-4発現細胞においてはTNF α 刺激時におけるJNK、ERKおよびNF κ B経路の活性化が有意に亢進していることがわかった。よってCTLA-4はこれらの経路にTCR非依存性に干渉し、必ずしも抑制的に働かずある条件下では活性化を促進することがわかった。T細胞の運命はTCRからの刺激のみならずサイトカイン、増殖因子、ストレスなどのシグナル伝達によって複雑に調節されており、CTLA-4はこれらのシグナル伝達経路に干渉することによってT細胞の活性化状態を調節する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Cytotoxic T Lymphocyte Associated Molecule-4 (CTLA-4)

分子を介する T 細胞抑制性シグナルの分子生物学的解析

T 細胞活性化に伴って細胞膜上に発現される CTLA-4 は抹消での T 細胞活性化の負のシグナルを伝達すると考えられている。そのシグナル伝達機構については未だあきらかになっていない。申請者はこのシグナル伝達機構を分子生物学的な手法をもちいて明らかにすることを目的とし、3 種の研究を行った。

第一に CTLA-4 の会合チロシンキナーゼを検索し、サイトカインレセプターのシグナルに必須である JAK2 が CTLA-4 の細胞内領域に恒常的に会合すること、JAK2 は CTLA-4 の細胞内領域に存在し、初期のシグナルに必須であると考えられているチロシン残基をリン酸化することを明らかにした。また、IFN γ による刺激後 CTLA-4 の細胞膜への発現量が上昇したことから、サイトカインレセプターの刺激による JAK2 の活性化は CTLA-4 のチロシンリン酸化とそれに伴う細胞膜への CTLA-4 の輸送を起すことが示唆された。第二に CTLA-4 独特の抑制性シグナルを伝達する新規の会合分子を T7 ファージ cDNA ディスプレイ法をもちいて検索することを試み、マウス活性化脾臓細胞より T7 ファージ cDNA ライブラリーを構築し、CTLA-4 の細胞内アミノ酸配列を模したペプチドに非常に強く会合し、増幅された未知のタンパク質をコードする遺伝子断片を単離した。第三に CTLA-4 が影響をあたえる細胞内シグナル伝達カスケードについての解析を行った。CTLA-4 は T 細胞において TCR の刺激下における JNK、ERK および NF κ B といったシグナル経路を抑制することが知られている。しかしながら、これらのシグナル伝達経路は多くの刺激を核に伝達するために広く用いられる共通の経路である。したがって、CTLA-4 が他の刺激に関してもこれらのシグナル経路に干渉する可能性が考えられ、この点を明らかにするため、申請者は非 T 細胞である NIH3T3 細胞に CTLA-4 を恒常的に導入した細胞を樹立し、この細胞を用いてサイトカイン刺激による JNK、ERK および NF κ B 経路の活性化に CTLA-4 がどのように干渉するかをそれぞれの分子の活性化型特異的抗体を用いたウエスタンブロットによって解析した。CTLA-4 発現細胞においては TNF α 刺激時における JNK、ERK および経路の活性化が有意に亢進していることがわかった。よって CTLA-4 はこれらの経路に TCR 非依存性に干渉し、必ずしも抑制的に働かずある条件下では活性化を促進するこ

とがわかった。T細胞の運命は TCR からの刺激のみならずサイトカイン、増殖因子、ストレスなどのシグナル伝達によって複雑に調節されており、CTLA-4 はこれらのシグナル伝達経路に干渉することによって T細胞の活性化状態を調節する可能性が示唆された。

公開発表において申請者は主に第一の研究成果についてスライドを用いて約 15 分にわたって発表した。その後副査の石橋教授からサイトカインレセプターと CTLA-4 の関係について質問があった。ついで同教授からプロリンに富む配列が CTLA-4 と JAK2 の会合に独特な会合の様式であるかどうかという質問があった。次に副査の小野江教授よりサイトカイン刺激による CTLA-4 の膜発現は JAK2 による CTLA-4 のリン酸化を直接介するものか、それを確かめるためにこれら必要な実験は何かという質問があった。最後に主査の上出教授より IFN γ レセプターが CTLA-4 の発現に影響するなら、IFN γ レセプター発現量の多い Th1 細胞と少ない Th2 細胞とでは CTLA-4 の発現に差があるかどうかという問いかけがあった。いずれの質問についても申請者は最新の文献や自らの実験データをもとに明確に回答した。

この論文は、従来の分子生物学的手法を用いて CTLA-4 シグナル伝達の初期イベントを明らかにした事で高く評価され、T7 フェージ cDNA ディスプレイ法や EST クローニングといった斬新な方法を導入した点など随所に申請者の工夫がみられる。この成果をもとに免疫系の維持に必須な CTLA-4 分子のシグナルがさらに明らかにされることが期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や習得単位などもあわせ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。