

CD40分子の信号伝達に重要な細胞内領域の解析

学位論文内容の要旨

CD40からの信号はB細胞の分化, 増殖, 免疫グロブリンクラススイッチ, 細胞凝集, アポトーシスの抑制などに重要な役割を演じている。CD40はNerve Growth Factor (NGF) /Tumor Necrosis Factor(TNF)レセプターファミリーに属し, その細胞内領域は62アミノ酸からなり, 信号伝達に関わるような酵素に類似する部分は存在しない。しかしFasやTNFレセプターI(TNFR1)の細胞内領域と相同性を示す領域が存在する。CD40の細胞内領域の欠損ミュータントや234番目のアミノ酸ポイントミューテーションを用いた解析では細胞内に信号を伝達できないことが報告されている。また, FasやTNFR1の細胞内保存領域も信号伝達に重要であり, FasリガンドやTNFの結合により細胞死の信号を伝達するため"Death Domain"と呼ばれる。B細胞を抗CD40抗体で刺激するとLynキナーゼやPI-3キナーゼの活性化をはじめ, 多くの細胞内タンパクのリン酸化が見られる。またAP-1, Nuclear-Factor-Kappa-B (NF-kB)等の転写因子も活性化される。さらに最近TNFレセプターファミリー結合分子としてクローニングされたTNF-Receptor-Family-Associating-Factor (TRAF) 2およびTRAF3がCD40の細胞内領域に結合し, それぞれNF-kBの活性化とCD23の発現増強に重要であることが報告された。

マウス未熟B細胞株WEHI231は細胞表面IgMの架橋によりアポトーシスに陥るが, この細胞死はCD40の共刺激により回避される。この実験モデルを用いて我々はCD40の信号伝達機構を詳細に解析するため, 細胞内領域を末端から約10アミノ酸ずつ欠損させた4つのヒトCD40のミュータントcDNAを構築し, WEHI231細胞株に形質導入した。それらの形質導入株を用いて解析した結果, (1) CD40の細胞内保存領域の10アミノ酸配列が抗IgM抗体で誘導されるWEHI231細胞のアポトーシスの回避に重要であることが判明した。(2) またこの領域は抗CD40抗体で誘導されるMAPキナーゼの活性化にも重要であり, (3) TRAF2とTRAF3の結合にもこの領域が必要であることが判明した。

CD40のシグナルはB細胞の表面IgM架橋によるアポトーシスをブロックすることが知られている。一方, 成熟B細胞株M12ではCD40刺激により増殖抑制を起し, CD40の細胞内領域の234番目のスレオニン (Thr²³⁴)がCD40刺激によるM12 (マウスB細胞株) 及びEL4 (マウス胸腺腫細胞株) での増殖抑制に重要であることが報告されている。同じマウスB細胞株であるM12とWEHI231でCD40刺激後の反応が異なるのは性質が異なるためと考えられるが, その差異が分化段階 (M12は成熟B細胞, WEHI231は未熟B細胞) の違いからくるものなのか, 何らかの遺伝子変異によるものなのかは明らかになっていない。また, 最近CD40の細胞内領域の17アミノ酸配列 (TIMct; PVQETLHGCQPVTQEDG)にTRAF2, TRAF3が結合でき

る事が報告された。加えてTRAF3のCD40への結合にはThr²³⁴が重要で、その結合がCD40刺激後のCD23発現増強に重要であることが報告されている。今回の実験でもTIMc tと9アミノ酸がオーバーラップする10アミノ酸配列がTRAF2とTRAF3の結合、MAPキナーゼ活性の増強、そしてIgM刺激で誘導される細胞死の抑制に重要な役割を担っていることが明らかになった。TIMc tには2つのスレオニン (Thr²³⁴, Thr²⁴²) が含まれており、それらのリン酸化がTRAF2, 3の結合に重要と考えられた。今回得られた結果からThr²⁴²を含むTIMc tのアミノ酸配列 (QPVTQEDGKE) は存在しなくてもTRAF2, 3は結合することができ、MAPキナーゼ活性化、細胞死の抑制などにつながる信号を伝達できることが直接証明された。また、最近His²³⁶以下の欠損型CD40分子はCD40刺激によるCH12LX細胞株のIgM分泌は誘導できるが、M12.4.1細胞株の細胞凝集と細胞表面分子の発現増強は誘導できないとの結果が示され、これらの結果はThr²³⁴とそれを含む下流の領域から少なくとも2つの信号伝達機構が存在することを示唆している。この事実に関し、CD40ノックアウトマウスに変異型ヒトCD40を再導入した系で、IgクラススイッチにはThr²³⁴が重要であり、IgMの分泌や増殖反応の一部はThr²⁰²以下のアミノ酸がなくても誘導できることも報告されている。さらに、TRAF5及びTRAF6がそれぞれThr²³⁴を含むCD40分子とThr²³⁴を含まないCD40分子に結合し、両者ともNF-kBの活性化に関与していることも報告された。これらの結果を考えあわせると今回我々が報告した10アミノ酸部分にはTRAF2, 3, 5が結合できることが示唆され、今回調べたCD40によるIgM依存性アポトーシス回避に関与している可能性が高い。また、TRAF6は10アミノ酸配列を持たないミュータントにも結合できることが示唆されるが、WEHI231細胞ではMAPキナーゼの活性化及びアポトーシスの回避が起こらないため、1) 今回用いたWEHI231細胞ではTRAF6単独でMAPキナーゼ活性化、細胞死の抑制などを誘導できないか、2) このWEHI231細胞にはTRAF6そのものが発現していないことが考えられる。

また、今回の実験よりCD40からの信号はIgM刺激で誘導される細胞死を抑制すると同時にIgM刺激で誘導されたJNK活性化の相加的増強をもたらすことが半明した。このことはJNK活性の相加的上昇が細胞死の抑制につながっている可能性を示唆しているのかもしれない。一方、ERK2もCD40刺激後に10アミノ酸配列を持つミュータントでは活性化し、持たないものでは活性化は認められないことから、CD40の信号伝達機構に含まれ、その経路は細胞内保存領域の10アミノ酸配列を経由していることが示された。しかしながら、ERK2はIgM単独刺激でもIgM, CD40の共刺激時と同程度の活性上昇を認めることから、CD40の信号による細胞死の抑制に関わっているとは考えにくい。

一方、CD40の信号は転写因子NF-kBの活性化を誘導し、その経路にはTRAF2が重要な働きをしていることが報告されている。また、NF-kBの活性がB細胞のアポトーシスを制御していることも示唆されている。以上のことを考え合わせるとCD40の細胞死抑制シグナルは細胞内領域の10アミノ酸配列 (APVQETLHGC) に結合するTRAF2, 3あるいはTRAF5等の他の分子によってJNKなど転写因子を活性化する経路を通じ、NF-kBやAP-1などを活性化することにより伝達されていることが推測される。

WEHI231細胞はIgM, CD40の刺激に対し、正常B細胞と同様にアポトーシス、細胞凝集、アポトーシスの回避を誘導できる。WEHI231細胞とマウス脾臓B細胞はIgM,

CD40の刺激に対してERK2が同じ活性化パターンを示すことが報告されているが、マウス脾臓B細胞ではERK2, JNKともにIgMの刺激でもCD40の刺激でも活性化することが報告されている。これらの結果と今回の結果を合わせて考えると、ERK2の活性化はWEHI231細胞, 正常B細胞ともそれぞれIgM, CD40刺激の両方で引き起こされる。一方、JNKに関してはWEHI231細胞と正常B細胞での活性化パターンが必ずしも同じではないことが示唆される。WEHI231細胞と正常B細胞での活性化パターンが異なる理由についてはWEHI231細胞は常に増殖を続けるリンフォーマであり、IgMやCD40刺激で働くカスケード中の分子の量や活性化の程度が正常B細胞とは異なっていることなどが考えられ、さらなる解析が待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

CD40分子の信号伝達に重要な細胞内領域の解析

CD40からの信号はB細胞の分化、増殖、免疫グロブリンクラススイッチ、細胞凝集、アポトーシスの抑制などに重要な役割を演じている。CD40はNerve growth factor (NGF)/tumor necrosis factor (TNF) レセプターファミリーに属し、その細胞内領域は62アミノ酸からなり、信号伝達に関わるような酵素に類似する部分は存在しない。しかし、FasやTNFレセプターI (TNFRI)の細胞内領域と相同性を示す領域が存在する。CD40の細胞内領域の欠損ミュータントや234番目のアミノ酸ポイントミューテーションを用いた解析では細胞内に信号を伝達出来ないことが報告されている。またFasやTNFRIの細胞内保存領域も信号伝達に重要であり、FasリガンドやTNFの結合により細胞死の信号を伝達するためdeath domainと呼ばれる。

マウス未熟B細胞株WEHI231は細胞表面IgMの架橋によりアポトーシスに陥るが、この細胞死はCD40の共刺激により回避される。この実験モデルを用いて申請者はCD40の信号伝達機構を詳細に解析するため、細胞内領域を末端から約10アミノ酸ずつ欠損させた4つのヒトCD40のミュータントcDNAを構築しWEHI231細胞株に形質導入した。解析の結果、1) CD40の細胞内保存領域の10アミノ酸配列が抗IgM抗体で誘導されるWEHI231細胞のアポトーシスの回避に重要であることが判明した。2) またこの領域は抗CD40抗体で誘導されるMAPキナーゼの活性化にも重要であり、3) TNF receptor family associating factor (TRAF) 2と3の結合にも重要であることが判明した。

これまでCD40の細胞内領域の17アミノ酸配列 (TIMct; PVQETLHGCQPVTQEDG)にTRAF2と3が結合し、TRAF3とCD40の結合にはCD40の細胞内領域234番目のスレオニン (Thr234) が重要であることが知られていた。TIMctと我々が報告した10アミノ酸配列は9個のアミノ酸が重複しており、TIMctには2個のスレオニン (Thr234とThr242) が含まれているが、今回の結果からTIMctのうちThr242を含むQPVTQEDGはTRAF2と3との結合に必要なこと、10アミノ酸配列がTRAF2と3との結合、アポトーシスの回避やMAPキナーゼの活性化につながる信号を伝達することが直接証明された。

一方、細胞死を抑制するCD40とIgMを介する共刺激によりJNK活性の相加的増強が認められることより、MAPキナーゼのうちJNK活性の相加的増強が細胞死の抑制に関

与することが示唆された。またERK2もJNKと同様にCD40の10アミノ酸配列をかいして活性化されるが、CD40単独刺激でも活性化され細胞死の抑制には関与していないと考えられた。

B細胞の分化、活性化を調節する分子としてCD40は中心的役割を演じており、CD40分子を介する信号伝達機序を明らかにすることはB細胞の分化、増殖機構を理解する上できわめて重要な情報を提供すると考えられる。

公開発表にあたって、副査の石橋教授より、今回の研究は未熟B細胞が成熟B細胞へ分化する過程を見ているのか、CD40とIgMを介する共刺激によりWEHI231は分化するか、遺伝子導入後の分子のオリエンテーションはどうなっているのか、キナーゼは量の変化を見たのか、活性の変化を見たのか、キナーゼ活性化のカイネテクスはどうか、西教授よりCD40の機能は多彩だがなぜ今回検討した3つの機能に注目したのか、4つのミュータントを作成したのに、多くの実験ではそのうち2つのミュータントしかつかっていないのはなぜか、実験方法としてアミノ酸の置換の実験と今回のようなdeletionの実験があるが、なぜdeletionの実験を選んだのか、又その利点と欠点はなにか、主査の上出よりWEHI231細胞を用いた理由はなにか等の質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をなした。

審査委員一同は、CD40を介する信号伝達の機序を明らかにした研究成果を高く評価し、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断した。