

学位論文題名

Analysis of CD28 cosignaling pathways

(CD28を介するシグナル伝達機構の解析)

学位論文内容の要旨

抗原が抗原提示細胞 (APC) によって T 細胞に提示されると、その抗原に特異的な T 細胞の増殖と機能細胞への分化が起こり、抗原特異的な各種の免疫応答が誘導される。この T 細胞の十分な活性化のためには、抗原特異的な T 細胞レセプター (TCR) を介するシグナルに加え、co-stimulatory 分子間の相互作用により伝えられる co-stimulatory シグナル (補助シグナル) が必要である。この補助シグナルを誘導する分子のなかでも最も重要だと考えられている CD28 分子は、APC 上の B7 分子群との相互作用により T 細胞に補助シグナルを伝達し、T 細胞の増殖、アポトーシスの抑制、サイトカインの産生など T 細胞の活性化とそれに続く機能発現に広くかかわっていることが明らかになっている。しかし、これら CD28 の多様な機能が、どのような T 細胞内のシグナル伝達経路を介して発現されるかということに関しては、よくわかっていない。そこで本研究では CD28 を介するシグナル伝達経路とそれにより発現される T 細胞の機能との関係を明らかにするために CD28 の細胞内領域に存在する、シグナル伝達に重要である可能性の高いアミノ酸残基に変異を導入した CD28 分子を作製した。そして、これらの変異 CD28 分子をヒト T 細胞株 Jurkat 及び CD28 欠損マウスに導入、発現させ、変異分子を発現した T 細胞の機能を検討した。

CD28 分子の細胞内領域には リン酸化により SH2 ドメインに認識される可能性のある チロシン 残基が4つ、SH3 ドメインに認識される可能性のある プロリンリッチモチーフ (PxxP モチーフ) が2ヶ所存在している。また、第一番目のチロシン 残基を含む YNMN モチーフには PI3-kinase と Grb-2 が結合することが明らかとなっている。そこでこれらのシグナル伝達に重要であると考えられるアミノ酸残基を変異または欠失させた遺伝子を作製し、どのアミノ酸が CD28 による IL-2 promoter の活性化に重要であるかをヒト T 細胞株 Jurkat を用い、検討した。

そのリン酸化により PI3-kinase と Grb-2 が結合し、CD28 によるシグナル伝達に重要であると考えられている189番目のチロシン 残基の置換体、Y189F は wild type CD28 の40%程度に活性が減少したが、まだ IL-2 promoter の活性化能を十分有していた。YNMN モチーフ内のアスパラギン残基の置換体、N191A は、CD28 の細胞内領域のほぼすべてを欠失させた変異体、TM と同程度まで活性が減少し、ほとんど活性を持っていないことが明らかとなった。一方、YNMN モチーフ内のメチオニン残基の置換体、M192Lはwild type CD28 とほぼ同等の活性を有していた。これまでの研究から PI3-Kinase は YxxM モチーフに、Grb-2 は YxNx モチーフに結合することが知られているので、Y189F には

PI3-Kinase、Grb-2 の両方が結合せず、N191A にはPI3-Kinaseが選択的に結合し、M192L には Grb-2 が選択的に結合することが予想される。これらのことは CD28 による IL-2 promoter の活性化には Grb-2 は重要な働きをしているが、PI3-kinase は必須ではないことを示唆している。驚いたことにN191A の結果から活性を持たないことが予想された YMNМモチーフの欠失体、YMNМ del は、Y189F とほぼ同等の活性を持っていた。以上の結果から、YMNМモチーフには IL-2 promoter の活性をポジティブに制御する因子とネガティブに制御する因子の二つが結合し、N191A にはネガティブに制御する因子のみが結合することが予想された。N191A にはPI3-K が実際に結合しうることが判明したので、この IL-2 promoter の活性をネガティブに制御する因子としては PI3-K が候補として考えられた。PI3-K が IL-2 promoter の活性をネガティブに制御するかどうかを検討するために、CD28 による IL-2 promoter の活性化に対する PI3-K の inhibitor、LY294002 の効果を調べたところ、inhibitor により IL-2 promoter の活性化の程度は増強された。さらに、活性化型のPI3-K を導入したところ、CD28 による IL-2 promoter の活性化は強く抑制された。以上の結果は、PI3-K が CD28 による IL-2 promoter の活性化をネガティブに制御している可能性を示唆している。

つぎにCD28 分子により伝達されるシグナルにおける189番目のチロシン残基の役割について詳細に検討するためにhuman CD2 promoter / enhancer の制御下で CD28 wild type、Y189F、TM をそれぞれ B6 CD28 ノックアウトマウスに発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

これらのトランスジェニックマウスから 得られた T 細胞の機能を解析するために、in vitro において T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、その増殖および IL-2 の産生を検討した。刺激開始から24h 後では B6と wild type のトランスジェニックマウスでは抗 CD28 抗体の濃度依存的に増殖反応の大きな増強が見られたが、Y189F のトランスジェニックマウスでは増強は見られるものの、かなり弱いものであった。48h 後での増殖反応は Y189F トランスジェニックマウスでも抗 CD28 抗体によって十分な増強が見られたが、wild type のトランスジェニックマウスよりも、その程度は弱かった。同様の刺激による T 細胞の IL-2 産生量を ELISA 法を用いて測定すると 24h 後ではY189F はほとんどIL-2 を産生しておらず、wild type と圧倒的な差が見られたが、48h、72h と時間が経つにつれ産生量が増大し、72h 後ではwild type と同等の量の IL-2 を産生することがわかった。

つぎに生体内の免疫応答におけるYMNМモチーフに存在するチロシン残基の重要性を検討するために各トランスジェニックマウスから 得られた脾臓細胞を (B6 x DBA/2)F1 マウスに移入し acute GVH 反応が誘導されるかどうかを調べた。その結果、Y189F トランスジェニックマウスの脾臓細胞を移入したマウスではTMトランスジェニックマウスの脾臓細胞を移入したマウスと同様に全く acute GVH 反応が誘導されなかった。以上の結果は、YMNМモチーフに存在するチロシン残基が、特に生体内における免疫応答においては、極めて重要な働きをしていることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 安 部 良 (東京理科大学)

副 査 助 教 授 松 本 健 一

副 査 講 師 山 下 俊 之

学 位 論 文 題 名

Analysis of CD28 cosignaling pathways

(CD28を介するシグナル伝達機構の解析)

生体内における免疫応答で中心的な役割を果たしている T 細胞の活性化のためには T 細胞レセプター (TCR) を介する抗原特異的なシグナルに加え、co-stimulatory 分子間の相互作用により伝えられる co-stimulatory シグナル

(補助シグナル) が必要である。この補助シグナルを誘導する分子の中で最も重要だと考えられている CD28 分子は、APC 上の B7 分子群との相互作用により T 細胞に補助シグナルを伝達し、T 細胞の増殖、アポトーシスの抑制、サイトカインの産生など T 細胞の活性化とそれに続く機能発現に広くかかわっていることが明らかとなっている。しかし、これら CD28 の多様な機能が、どのような T 細胞内のシグナル伝達経路を介して発現されるかということに関しては、いまだ不明な点が多い。本論文は、CD28 の細胞内領域に存在する、シグナル伝達に重要であるとされているアミノ酸を変異もしくは欠失させた CD28 分子を用いて、CD28 からの補助シグナルによる T 細胞の機能発現にどのような細胞内シグナルが関与しているかを明らかにし、しいては正常および病的な免疫応答における CD28 を介する補助シグナルの役割を解明することを目的としている。

第一章ではヒト T 細胞株 Jurkat を用いて、CD28 による IL-2 遺伝子の転写活性化に PI3-K の活性化がどのような役割を担っているかを詳細に検討している。CD28 の細胞内領域に存在する YMNМモチーフにはそのチロシン残基のリン酸化により PI3-kinase、Grb-2 といったシグナル伝達に重要であると考えられている分子が結合することが知られている。CD28 シグナルにおける PI3-kinase の役割についてはいくつかのグループにより報告があるが、統一的な見解は得られていない。本論文では CD28 の YMNМモチーフに点変異を導入し、PI3-kinase を結合するが Grb-2 が結合できないようにした変異 CD28 分子が、PI3-kinase、Grb-2 の両分子を結合できないような変異 CD28 分子に比べ IL-2 promoter の活性化能が低いことから、CD28 による IL-2 遺伝子の転写活性化を PI3-kinase が negative に調節している可能性を見いだした。さらに、PI3-kinase の inhibitor である LY294002 が CD28 依存性の IL-2 promoter 活性化を増強すること、また、活性化型の PI3-kinase の導入により CD28 依存性の IL-2 promoter 活性化が抑制されることを示し、PI3-kinase の

活性化が CD28 による IL-2 遺伝子の転写活性化に抑制的に働くことを明らかにした。これらの結果は、細胞増殖に対して正の調節因子と考えられている PI3-kinase が、ある局面では負の調節因子となりうる可能性を示した点で非常にユニークなものである。

第 2 章では、CD28 の YMNМモチーフのチロシン残基に点変異を導入した変異 CD28 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、primary T 細胞の CD28 補助シグナルにおける YMNМモチーフの役割について詳細に検討している。in vitro において、このトランスジェニックマウスから得られた T 細胞を抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激すると、刺激後の早い段階では変異 CD28 を発現する T 細胞は、野生型 CD28 を発現する T 細胞に比べ、増殖能および IL-2 の産生能は非常に劣っているが、時間が経過するにつれて野生型 CD28 を発現する T 細胞と同等のレベルになること、また、PMA と抗 CD28 抗体の組み合わせによる刺激では十分な時間が経過してもほとんど IL-2 を産生しないことを明らかにした。これらの結果は T 細胞への刺激の入り方や活性化の状態によって、この YMNМモチーフからのシグナルの重要性が変化することを示唆している。生理的な増殖能や機能分化能を保持している primary T 細胞を用いたこのような研究は国際的にも報告はなく、変異遺伝子トランスジェニックマウスの確立なくしてはできないユニークな研究である。さらに、この研究では in vivo での免疫応答における YMNМモチーフの役割について、acute GVH reaction の系を用いて検討している。変異 CD28 を発現するトランスジェニックマウスから得られた脾臓細胞を F1 マウスに移入しても acute GVH reaction が全く誘導されないことを示し、CD28 の YMNМモチーフを介するシグナルが生体内の免疫応答において非常に重要な働きをしていることを明らかにした。これらの結果は、in vivo での免疫応答にこのモチーフを介するシグナルが必須であることを示した点で非常に学問的価値が高い。

以上を持って、本論文は学位論文に十分値すると考えられる。