

博士（医学）合田千穂

学位論文題名

Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells

(IL-32のT細胞の活性化誘導細胞死への関与)

学位論文内容の要旨

Natural Killer cell transcript 4 (以下 NK4) は、活性化 NK 細胞から得た cDNA ライブライアリにおいて発現が増強している転写物として同定された。その遺伝子は染色体 16 番に存在し、4 つのアイソフォームが報告されている。最近、IL-18、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-12 のような炎症性サイトカイン刺激によって、NK4 はある種の細胞株で誘導され、さらに単球系細胞株において、細胞外から作用して tumor necrosis factor (以下 TNF)、MIP-2、IL-8 の産生を誘導することが示された。これらの知見から NK4 は IL-32 と再命名された。しかしながら、IL-32 の生物学的活性は依然として不明な点が多く、IL-32 は細胞内で働くのか細胞外で働くのかも未だ議論のあるところである。今回我々は、IL-32 の細胞内における機能を検討したので報告する。

(1) IL-32 は T 細胞と NK 細胞で誘導される

我々はまず、プライマリーの T 細胞と NK 細胞、B 細胞における IL-32 の発現を調べた。その結果、活性化したヒト T 細胞と NK 細胞において IL-32 の発現増強がみられたが、B 細胞を IL-4 と抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体刺激しても強い発現誘導はみられなかった。

(2) 活性化 T 細胞においてはアイソフォームのうち IL-32 β が優位に発現していた

次に活性化 T 細胞においてどのアイソフォームが主に発現しているかを RT-PCR により調べたところ、67% が IL-32 β であった。このときわれわれは、新規アイソフォームとして IL-32 ϵ と IL-32 δ を同定した。さらにウサギポリクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、タンパク質レベルでも活性化 T 細胞と NK 細胞で発現誘導されるのは IL-32 β であることが確認された。

(3) activation-induced cell death (AICD) を起こしている T 細胞では IL-32 が特異的に発現している

T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激すると AICD を誘導することが知られている。T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激した後 TUNEL アッセイを行い、IL-32 の発現フローサイトメトリーで調べたところ、IL-32 発現と TUNEL シグナルに相関が認められた。また、同様に IL-32 発現は活性化カスパーゼ 3 シグナルとともに相関を認めた。

(4) HeLa 細胞において IL-32 はアポトーシスを誘導した

HeLa Tet-Off/IL-32 細胞を作製し、アポトーシスを評価した。テトラサイクリン除去により IL-32 発現を誘導すると TUNEL 陽性細胞が増える一方、この状態で RNAi で IL-32 をノックダウンすると TUNEL 陽性細胞が減少した。

(5) T 細胞では IL-32 は細胞内で機能している

活性化 T 細胞の細胞溶解液と培養上清を継続的にウエスタンブロッティングでみたところ、培

養 72 時間で培養上清に IL-32 シグナルを認めた。しかし 72 時間後には本来細胞質に存在する GAPDH も上清に多くなっていた。これらの結果から培養上清に検出された IL-32 は積極的に分泌されたものではなく、アポトーシスにより細胞質から漏出した可能性が示唆された。

以上より、活性化 T 細胞において誘導される IL-32 のアイソフォームを同定すると共に、細胞質におけるアポトーシス誘導という新たな生物学的機能を見出した。

学位論文審査の要旨

主査教授 小野江和則

副査教授 大野重昭

主査教授 畠山鎮次

学位論文題名

Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells
(IL-32のT細胞の活性化誘導細胞死への関与)

本研究の内容は、(1)活性化T細胞、NK細胞で主に誘導されるIL-32のアイソフォームはIL-32 β であり、このIL-32 β は細胞内タンパク質であること、また、(2)HeLa細胞においてIL-32の強制発現によりアポトーシスが誘導され、T細胞におけるTCR刺激によるIL-32の発現とアポトーシス誘導は相關していたこと、以上より、IL-32は細胞内で作用して、T細胞におけるAIKDの機序に関与していると考えられる、という発表であった。

質疑応答は、最初に副査の畠山鎮次教授から①IL-32 β が分泌されていないとする根拠について。(回答)シグナルシーケンスを持っていないこと、上清と細胞溶解液のウエスタンブロッティングの結果および、免疫染色の結果から細胞内タンパク質であると考える。②IL-32はT細胞・NK細胞以外の細胞では発現していないのか。(回答)ユビキタスに他の組織や細胞でもみられる。③アポトーシスの経路のどこで働いているか。(回答)現段階では不明。④疾患との関連について。(回答)先の免疫学会でリウマチ患者の滑膜で発現の亢進がみられたと報告があったが、まだ疾患については調べていない。以上4つの質問とその回答があった。最後に今後眼疾患でも調べてみるよう提言があった。次に副査の大野重昭教授との間では以下の質疑と応答があった。①細胞内で働いているとするとインターロイキンという命名についてどう思うか。

(回答)他施設においてリコンビナントIL-32タンパク質を肺癌細胞株であるA549などの上皮系細胞に細胞外から作用させてTNFの分泌がみられているため、分泌タンパク質であることを否定するのは難しいが、今回の実験ではIL-32 γ は β にスプライシングされることや、C末にHisタグをつけたIL-32 γ を強制発現させて上清を免疫沈降しても発現がみられなかつたことから、上清に分泌されていないのに“インターロイキン”という名称は違和感がある。②眼における発現部位は。(回答)免疫組織染色では眼のいずれの組織にもみられたが、角膜上皮でも輪部幹細胞にはみられず、中央の細胞にみられ、水晶体上皮は中央で発現が少なく、赤道部の細胞にみられたことから、増殖する細胞よりは分化した細胞に発現していると考えている。③IL-32を増強するまたは抑制する薬剤などの有無について。(回答)薬剤はいまのところ増強するものも抑制するものも見つかっていないが、上皮系細胞においてIL-18、IL-1 β 、IL-12、IFN- γ により発現が誘導されることが報告されている。最後に眼疾患においてアポトーシスが関連している疾患はベーチェット病をはじめとして多数あることから、眼疾患におけるIL-32の発現について今後研究をすすめるよう提言があった。最後に主査の小野江和則教授から①IL-32新規アイソフォームである ϵ 、 ζ については機能解析を行っているか。(回答)行っていない。②NKT細胞では発現しているか(回答)調べていない。についての質問とその回答があった。また、方法論において、経路の違う刺激を行っているが、機能を探っていく上で刺激はそろえるべきであるという提言があった。

本研究は、IL-32のT細胞における局在と新たな機能解析を解明した点で高く評価され、今後様々な組織および疾患におけるIL-32の役割が検討され、臨床において病態の解明や治療への応用が期待される。

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取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。