

Flow cytometry を用いたヒト末梢血単核球内 WASP 分子の構造的・機能的解析に関する研究

学位論文内容の要旨

原発性免疫不全症； Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)の原因分子である WAS protein (WASP) は細胞骨格関連分子として、アクチン重合、シグナル伝達などに関与している。これまでの多くの *in vitro* 研究から WASP はリン酸化、脱リン酸化されること、その結晶構造のモデル解析から分子間結合により自己活性化抑制機能を有することが報告されている。しかし WAS 患者が示す多彩な臨床病態と WASP 分子の欠損との関連性は必ずしも明確に理解されていない。我々は、ヒト末梢血単核球細胞質内 WASP 分子を flow cytometry にて解析する系 (FCM-WASP) を確立し、WAS 患者やその保因者の診断、血液幹細胞移植後の病態解析等に利用してきた。またその過程において正常人単核球では WASP 陽性細胞が強弱二群に分かれることを見出した。本研究は、その WASP 陽性二群に属する細胞の性状を明らかにするとともに、二群を示す機序を解明し、さらには FCM-WASP を用いた WASP 分子の構造的、機能的な解析の可能性を検討したものである。

当初、我々は検出した正常人末梢血単核球中の FCM-WASP に現れるこの輝度の差異、すなわち WASP 弱陽性／強陽性は、細胞質内に含まれる WASP 分子の総抗原量の違いに由来するものと考えていた。しかし、二群の陽性が生じるのは抗 WASP 抗体として 3F3A5 を用いたときであり、抗 WASP 抗体 B-9 を用いたときは検出されないことから、その原因は総抗原量の違いだけではなく、3F3A5 の特異的な性質に由来する現象であると推測した。初めに我々は FCM-WASP で検出される強弱二群の陽性細胞群の組成について検索した。3F3A5 と細胞表面マーカーとの二重染色で検討した結果、CD4⁺、CD8⁺ に属する T 細胞では両群に属していたが、単球と CD20⁺ を示す B 細胞リネージは WASP 弱陽性に、CD56⁺ 陽性を示す NK 細胞リネージでは強陽性に属していた。両群に属していた CD4⁺、CD8⁺細胞をさらに三重染色で検討したところ、CD4⁺、CD8⁺細胞ともにナイーブ T cell を示す CD45RA⁺ のリネージは弱陽性群に、メモリー T cell を示す CD45RO⁺ のリネージは強陽性群に属することがわかった。一方、二群が検出される機序に関して、この現象が抗体の種類によっては再現されないことを検出した。

次に、フローサイト上で輝度の差異を認め、細胞の性状が類似していると思える二群、CD45RA⁺T cell (WASP 弱陽性) と CD45RO⁺T cell (WASP 強陽性) において抗原量の差異をウエスタン・ブロット法において比較、検討した。その結果、同じ細胞数の両集団の比較では、3F3A5 抗体を用いた場合、バンドの濃さに明らかな差を認めず、3F3A5 抗体に認識される蛋白量的には明らかな差がないことが示された。同様に、RT-PCR の結果により、両集団に

において WASP のメッセージレベルでの差異も認めることができなかった。

我々が今回使用した抗 WASP 抗体は 3F3A5 と B-9 の 2 種類である。これらのモノクローナル抗体は認識するエピトープに違いがあり、3F3A5 抗体は WASP 分子のエピトープ 202~302 を認識するのに対し、B-9 抗体はエピトープ 1~250 を認識する抗体である。我々は 3F3A5 と B-9 抗体を用いて、WASP の同時染色を試みたが、やはり 3F3A5 抗体でのみ強弱二群の陽性が生じ、B-9 ではそれらは認められなかった。

近年、WASP 分子が自己活性化抑制機構を有し、それが構造的な変化の結果によるという WASP 分子の結晶構造モデルの解析が報告されている。また、活性型 WASP は活性化ドメインである VCA ドメインが露出されており、逆に非活性型 WASP は、VCA ドメインが分子内相互作用によりマスクされた状態となっているというモデルが提唱されている。3F3A5 は WASP のエピトープ 202~302 を認識し、また VCA ドメインとの相互作用により活性化ドメインをマスクしている GBD/CRIB モチーフは WASP のアミノ酸 235~288 の部位に存在し、3F3A5 の認識部位と重なることなどから、3F3A5 が WASP の構造的変化を検出するという仮説が考えられた。FCM-WASP の特性を考慮すると、仮に 3F3A5 が WASP の構造的変化を検出し、フローサイトメトリーにてその構造的変化を認識することができているとすれば、各リネージでの FCM-WASP での WASP 陽性細胞の輝度の違いを説明しうると考えられた。末梢血単核球内の WASP において、その全てが活性型ないし非活性型の WASP ということは考えにくく、各サブセットにより、活性型 WASP と非活性型の WASP の比率、分布に差があることは容易に想像できる。我々はリネージごとに内在する活性型／非活性型の比率の差が、そのサブセットの WASP 陽性の輝度を決定していると考えている。加えて、T cell 活性化のシグナル伝達系において、WASP 分子が重要な役割を担うという *in vitro* での報告、また T cell 活性化刺激における WASP 分子の構造的変化を考えると、今回の二群の差は、3F3A5 が WASP 分子の構造的変化を検出した結果と考えて矛盾はない。

次に我々は、二群の陽性の成因を明らかにするため、末梢血単核球を PMA/ionomysine にて 4 時間刺激し、WASP を CD8、および T cell の活性化マーカーである CD69 を用いて 3 カラーにて染色し、FCM-WASP にて解析した。その結果、3F3A5 抗体を用いた場合に、4 時間という短時間で CD8⁺ のリネージに WASP 陽性細胞のパターンの変化を検出した。さらに、CD8⁺ のリネージをネガティブセレクションにより優位にした状態で同様に刺激したところ、3F3A5 抗体を使用したときのみ二群の陽性の検出をみた。これらの刺激前後での輝度の変化は、3F3A5 抗体が B-9 抗体には認識できない WASP の構造的変化を認識する可能性を示唆している。4 時間という短時間では刺激による WASP 合成が起こらないと考えられるため、今回の刺激条件では、WASP 抗原量の違いを検出しているとは考えにくい。したがってこれらの結果は、WASP の活性化が FCM-WASP により検出できることを示唆している。

以上のことから、正常人の PBMNCs を用いた FCM-WASP において生じる二群の陽性の出現機序として、その成因が 3F3A5 抗体に特異的なものであるということが判明した。また同様に、各リンパ球サブセットにおいて WASP 陽性細胞に輝度の差異を認める現象が、WASP の総抗原量の違いによるものではなく、WASP 分子の構造的変化を認識しうる 3F3A5 抗体に特異的な現象であることが示唆された。さらに T cell 活性化の系において、WASP 陽性細胞の染色パターンが変化するということから、FCM-WASP による WASP 分子の構造的・機能的解

析の可能性が示唆された。今後我々は、FCM-WASP による WASP 分子の活性化機能解析としての応用を考慮し、引き続き血液幹細胞移植後の病態解析等に FCM-WASP を使用していこうと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 有 賀 正 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

Flow cytometry を用いたヒト末梢血単核球内 WASP 分子の構造的・機能的解析に関する研究

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者に提出論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下のとおりである。

原発性免疫不全症； Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)の原因分子である WAS protein (WASP) は細胞骨格関連分子として、アクチン重合、シグナル伝達などに関与している。これまでの多くの *in vitro* 研究から WASP はリン酸化、脱リン酸化されること、その結晶構造のモデル解析から分子間結合により自己活性化抑制機能を有することが報告されている。しかし WAS 患者が示す多彩な臨床病態と WASP 分子の欠損との関連性は必ずしも明確に理解されていない。我々は、ヒト末梢血単核球細胞質内 WASP 分子を flow cytometry にて解析する系 (FCM-WASP) を確立し、WAS 患者やその保因者の診断、血液幹細胞移植後の病態解析等に利用してきた。またその過程において正常人単核球では WASP 陽性細胞が強弱二群に分かれることを見出した。本研究では二群が検出される機序の解明を目的とした。まず我々は WASP 弱陽性／強陽性それぞれの細胞集団が、どの細胞リネージに由来するものなのかを明らかにするため、細胞表面を T cell のマーカー；CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、さらには B cell のマーカー；CD20、NK cell のマーカー；CD56 にて染色し、FCM-WASP にてそれぞれのリネージの WASP 陽性細胞の輝度を解析した。その結果、リンパ球サブセットのうち CD56⁺は WASP 強陽性、単球と CD20⁺は弱陽性、CD4⁺および CD8⁺については強弱両群に属し、さらに検索の結果、共に CD45RA⁺では弱陽性、CD45RO⁺では強陽性となる傾向を認めた。一方、二群が検出される機序に関して、この現象が抗体の種類によっては再現されないことを検出した。それ

ぞれのリネージでの総抗原量の差異が FCM-WASP での輝度の差となっている可能性を考慮し、磁気ビーズにて純化した $CD3^+CD45RA^+$ 細胞（弱陽性）と $CD3^+CD45RO^+$ 細胞（強陽性）を用い、WASP 蛋白レベル、メッセージレベルの比較検討をおこなったが、両者に明らかな差は認められなかった。WASP にはその構造的変化に基づく活性化機構が知られている。FCM-WASP における染色パターンの変化が、WASP の構造的変化、すなわち活性化に関与しているとの考えから、*in vitro* における短時間でのリンパ球活性化の系において、抗 WASP 抗体 3F3A5 を用いた FCM-WASP にて解析した結果、 $CD8^+$ 細胞の染色パターンに活性化の前後で明らかな変化を認めた。加えて、 $CD8^+$ 細胞を磁気ビーズにて純化した後に同様の活性化刺激を加えた結果、3F3A5 抗体を用いたときのみに FCM-WASP の WASP 陽性細胞の輝度に染色パターンの変化を生じた。以上の結果より、抗 WASP 抗体 3F3A5 を用いた FCM-WASP での強弱陽性両群の違いが WASP 分子の量的な違いに基づくものではなく、構造的、機能的違いに基づくものである可能性が示唆された。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

- ①WAS の病態について
- ②抗 WASP 抗体の染色法について
- ③リンパ球と単球の分画について
- ④PMA および ionomysine による刺激について
- ⑤得られた結果における二峰性の意義と解釈について
- ⑥3F3A5 の特異的な性質と WASP 分子の変化について
- ⑦WASP の自己活性化抑制機構について
- ⑧3F3A5 と免疫不全との関係について
- ⑨WAS の T 細胞の機能について
- ⑩今後の展望について

などであり、これらの質問に対し申請者から適切かつ明快な回答が得られた。実験手技についても詳細を熟知していることが明らかになり、関連する分野について幅広い知識を有し、さらに本研究の発展を見据えた今後の展望が示された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。