

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第35号

2013年9月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 25 年 9 月 21 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. 曹	佳 浩 [博士 (マネジメント)]	1
2. 圓 山	由 子 [博士 (情報通信工学)]	8
3. 万 木	肇 [博士 (生物工学)]	13

氏名（本籍）	万木 肇（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第16号
学位授与年月日	平成25年9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	「T細胞の活性化に伴うプロヒビチンの細胞表面への誘導と、Siglec-9との相互作用によるT細胞受容体を介したシグナル伝達の抑制」
論文審査委員	主 査 中田 博 教授
	副 査 福井 成行 教授
	〃 竹内 実 教授

論文内容の要旨

T細胞の活性化は抗原提示細胞の抗原提示により惹起され、誘導された活性化T細胞は細胞障害やサイトカインの産生等の免疫応答の中樞を担う。過剰な免疫応答は関節リウマチやSLE等の深刻な自己免疫疾患を引き起こすことから理解されるように、抗原提示時における免疫応答の調節は重要である。本研究では、先ず、抗原提示細胞に発現したSiglec-9の生物学的機能を検討する一環としてT細胞上でのトランスリガンドの探索を行った。Siglec-9は免疫細胞の中でも特に樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞に発現しているレクチンである。数種のT細胞系リンパ腫細胞株（Molt-3、Molt-4、CCRF-CEM及びJurkat細胞）を用いて、FACS解析を行ったところ、いずれの細胞にも可溶性Siglec-9の結合が認められた。さらに、これらの細胞の細胞表面タンパク質をビオチン標識し、細胞抽出液よりSiglec-9結合アガロースを用いてSiglec-9結合タンパク質を得た。SDS-PAGE後、ウェスタンブロッティングを行い、ビオチン化された細胞表面のタンパク質を検出した。その結果、全てのT細胞株で共通の28kDaと31kDaの細胞表面のタンパク質が検出された。さらに、質量分析及び免疫化学的な検証により、この2つのタンパク質はそれぞれprohibitin-1、prohibitin-2（以下それぞれPHB1、PHB2と表記する）であることが分かった。Siglec-9とPHBsの結合の性質を明らかにする目的で、過ヨウ素酸処理したMolt-3細胞より、上述した方法でSiglec-9結合タンパク質を検出したところ、同様に

PHB1 と PHB2 が検出された。さらに、Siglec-9 のシアル酸認識に必須である 120 番目のアルギニンをアラニンに置換した変異型 Siglec-9 及び、シアル酸認識領域を含む V-set 領域を欠く欠損型 Siglec-9 を調製し、それぞれの PHB 結合能を検討した。その結果、変異型及び欠損型 Siglec-9 は PHBs との結合活性を消失した。これらの結果から、両者の結合にシアル酸は関与しないが、PHBs のペプチド鎖上の陰性荷電と Arg¹²⁰ が相互作用しているものと考えられる。

また、抗 PHBs 抗体、抗 CD3 抗体あるいは PHB1 と特異的に結合するペプチドを用いて Jurkat 細胞表面におけるこれらの分子の分布を観察すると、PHBs は T 細胞受容体（以下 TCR と表記する）複合体の構成分子である CD3 と共局在し、細胞表面上で不均一に分布していた。Jurkat 細胞は、抗 CD3 抗体刺激により活性化され ERK のリン酸化に伴い、IL-2 を産生する。細胞表面に存在する PHBs の TCR シグナル伝達への関与を検討した。抗原提示のミミックとして抗 CD3 抗体の結合したビーズ、あるいは抗 PHBs 抗体や Siglec-9 の影響を検討する目的で、抗 CD3 抗体と抗 PHBs 抗体又は Siglec-9 の結合したビーズを用いた。抗 PHB1 抗体、抗 PHB2 抗体あるいは Siglec-9 の PHB への結合により、抗 CD3 抗体刺激により誘導された ERK のリン酸化が有意に抑制された。さらに、Jurkat 細胞の活性化に伴う IL-2 の産生も Siglec-9 により抑制された。PHB1 特異的 siRNA の導入により PHB1 低発現 Jurkat 細胞を作製した。抗 CD3 抗体刺激による同細胞の ERK のリン酸化に対する Siglec-9 の抑制効果はほとんど認められなくなったことから Siglec-9 と PHB1 の相互作用が ERK のリン酸化に寄与していることも分かった。

T 細胞株に加えて、ヒト末梢血 T 細胞及びマウス脾臓 T 細胞における PHBs の発現及び分布について検討した。いずれの T 細胞においても PHBs は PMA/イオノマイシンで活性化すると 24-72 時間にかけて PHBs の発現が誘導され、中でも細胞表面における発現が顕著であった。また、抗 CD3/CD28 抗体の刺激によっても、ヒト末梢血 T 細胞の細胞表面への PHBs の誘導が認められた。同細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズあるいは Siglec-9 と抗 CD3 抗体の結合したビーズで処理したところ、前者で見られた ERK1/2 のリン酸化の亢進は後者では消失した。また、上記のそれぞれのビーズ存在下でヒト末梢血 T 細胞を培養し、IFN- γ の ELISPOT アッセイを行うと、抗 CD3 抗体刺激により上昇した IFN- γ の産生は Siglec-9 により有意に抑制された。これらの結果は、PHBs と Siglec-9 の相互作用は T 細胞の活性化レベルを調節する新規な機構であると考えられ、免疫疾患への新たな応用が期待される。

論文審査結果の要旨

シグレックファミリーは、主に免疫系細胞に発現し、その多くが細胞質内に ITIM を持つことから、抑制性のシグナルを伝達することが予想されている。しかしながら、リガンドを含めた解析をおこない、生物学的意義が明らかにされた例はシグレックファミリーの内、数例である。加えて、従来の研究はシグレックが発現している細胞上のシスリガンドとの相互作用にともなう機能解析であり、トランスリガンドの解析は皆無といってよい。

抗原提示細胞は様々なシグレック分子を発現しているが、抗原提示時には T 細胞側の表面分子との相互作用が十分に予想された。抗原提示細胞と T 細胞表面の分子の相互作用については、多くの分子が明らかにされているが、レクチンを対象とした研究は無く、T 細胞側の分子が機能分子である場合は大きな展開が期待された。

数種の T 細胞株を用いて、抗原提示細胞上に発現されているシグレック 3、7、5、9 の組み換え体に結合する細胞表面分子を検索したところ、シグレック-9 について、数種の T 細胞株において共通の 2 分子が SDS-PAGE で検出された。質量分析の結果、プロヒビチン 1、2 であることが、明らかとなった。同タンパク質は主にミトコンドリアに存在することが知られており、細胞表面での検出は予想外であったが、複数の方法で細胞表面での局在を確認した。プロヒビチンへのシグレック-9 の結合は、シアリダーゼ処理によっても消失しなかったが、120Arg を Ala に変換したシグレック-9 では結合能を消失した。シグレックファミリーの中で糖鎖を介しない結合は、数例報告されている。ペプチド間の電荷による結合という解釈で間違いないと思われる。一方、T 細胞表面におけるプロヒビチンの発現は新知見であり、機能的解析は極めて興味深い課題である。マウス脾臓より調製した T 細胞では、プロヒビチンの細胞表面での発現は認められなかったが、PMA や抗 CD3 抗体により活性化した場合、刺激後、24 時間で細胞表面に発現されるようになり、48 時間でピークとなった。T 細胞の活性化に伴いこのような挙動を示す表面抗原には、CTLA4 や PD-1 が報告されており、いずれも、T 細胞の活性制御という視点より、免疫疾患に対応する標的分子として、臨床応用が実施されている。従って、本分子も同様の展開が期待される。このような展望のもと、本研究はプロヒビチンの機能解析に進んだ。T 細胞株での細胞表面におけるプロヒビチンは、CD3 分子と共局在することから、T 細胞のシグナル伝達に関与することが示唆された。T 細胞株である Jurkat 細胞を用いて、抗プロヒビチン抗体あるいはシグレック-9 存在下で抗 CD3 抗体により細胞を刺激した場合、シグナル伝達過程の ERK のリン酸化が著しく抑制されることを明確にした。また、cRaf のリン酸化についても同様の傾向が認められた。Jurkat 細胞においては、T 細胞シグナルの抑制による結果、IL-2 の産生も抑制されることが明らかとなった。また、ヒト末梢血由来 T 細胞についても、抗 CD3 抗体によりプロヒビチンが細胞表面に誘導され、誘導後はシグレック-9 により ERK のリン酸化が抑制された。さらに、IFN- γ の産生も抑制された。このように、本研究によって明らかにされた現象は、新規な標的分子による T 細胞の活性化制御という可能性をもった極めて興味深い内容となっている。本領域は免疫学と糖鎖生物学の境界領域の研究であり、双方の学問的及び技術的背景に精通した上での成果であり、故に独創性の高い内容となったことは高く評価できる。今後、臨床的応用に発展することが期待される。また、これらの成果は、既に英文誌 2 報にまとめられ、発表されていることも付け加えておく。

このように、本論文は学位に相応しい内容を持つものと判断される。加えて、公聴会においては、研究内容について発想から発見した新規な現象の分子生物学的背景を実験結果に基づいて理路整然と説明するとともに、多様な視点からの質疑応答にも十分に対応し、研究者として自立できる能力を示した。