

論文の内容の要旨

論文題目 微生物由来免疫抑制剤の作用と細胞内情報伝達機構に関する研究

氏名 川 染 秀 樹

免疫抑制剤シクロスポリン A (CsA)、FK506、およびラパマイシン(Rap)はともに微生物由来の抗生物質で臓器移植時の拒絶反応を抑制できる。さらに CsA と FK506 は臓器移植以外の応用、例えばアトピー性皮膚炎やリウマチなど免疫反応が異常に亢進した病態への治療に使われ、現在の医療に必要不可欠となってきた。しかしこれら免疫抑制剤の作用機構に加え副作用を起こす機構についても不明な点が多い。より特異性が高く作用の強い、しかも副作用の少ない薬剤が臨床応用の現場では求められている。そこで本研究は、新規免疫抑制剤の開発へ応用することを目的に、微生物由来免疫抑制剤の作用機構を細胞内シグナル伝達の観点から検討した。

上述の免疫抑制剤の作用は T 細胞を中心に検討がなされてきた。CsA と FK506 はそれぞれシクロフィリン(CyP)および FK506-binding protein(FKBP)に結合してカルシニューリンを阻害し、その下流に位置する転写因子 NF-AT を阻害して IL-2 の産生を抑制する。一方、Rap も FKBP に結合するがカルシニューリンは阻害せずに、mammalian Target of Rapamycin (mTOR)を阻害して、IL-2 による細胞増殖を抑制する。これらの事実を基にして、本研究では以下の3つの方向から研究を行った。(1) CsA と FK506 がアレルギー疾患の治療にも応用が広がっているため、T リンパ球以外での作用機序の検討が必要と考えられ、アレルギー疾患の発症に重要な働きをするマスト細胞(肥満細胞)に対するこれら免疫抑制剤の作用を調べた。(2) Rap の作用については、標的分子のひとつである p70 S6 キナーゼ (p70^{s6k})のノックアウト細胞を作製

し、p70^{s6k}を介する反応と介さない反応を明確にした。(3) アミノ酸（特にグルタミン）の免疫賦活作用に着目し、アミノ酸と Rap の作用機構の異同について検討した。

最初に、アレルギー反応に重要な役割を果たすマスト細胞からの TNF- α の産生機構に注目し、高親和性 Fc ϵ レセプター(Fc ϵ RI)と Stem Cell Factor レセプター(SCFR)の相互作用および免疫抑制剤の作用について検討した。マスト細胞は表面の Fc ϵ RI に IgE を結合し、さらに IgE が抗原を認識してレセプターが二量化すると、ヒスタミンやアラキドン酸、TNF- α などのサイトカインを放出する。また、マスト細胞は SCFR も発現している。SCF や SCFR を欠くマウスがマスト細胞を持たないことや細胞培養の研究から、SCF はマスト細胞の分化と増殖に必須の分子であると考えられている。マウスマスト細胞株 MC/9 を用いて、抗卵白アルブミン(OVA)マウス IgE で処理した後、OVA を添加すると TNF- α が産生された。この時 SCF を同時に添加すると TNF- α の産生が増強された。Fc ϵ RI を介する TNF- α 産生には c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が関与するとされる報告があるため、JNK 活性を測定した。IgE-OVA あるいは SCF を、それぞれ単独で処理すると JNK は活性化された。さらにこれらの同時刺激ではより強く JNK が活性化された。JNK 活性化の機序を調べるために CsA と FK506 さらに phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)阻害剤ウォルトマニンの影響を調べた。Fc ϵ RI を介する JNK の活性化は CsA、FK506、およびウォルトマニンで抑制されたが、SCFR を介する活性化は抑制されなかった(図1)。これらの結果は、抗原刺激によるマスト細胞の TNF- α 産生が SCF による JNK の活性化を通じて増強されることを示している。さらに、CsA と FK506 は Fc ϵ RI を介する JNK 活性化を阻害するが、SCF による活性化を阻害しなかったため、2つのレセプターは異なる経路を通じて JNK を活性化して TNF- α を産生させることを示し、SCFR からのシグナル経路が新規免疫抑制剤開発のための新たな標的となる可能性を示した。

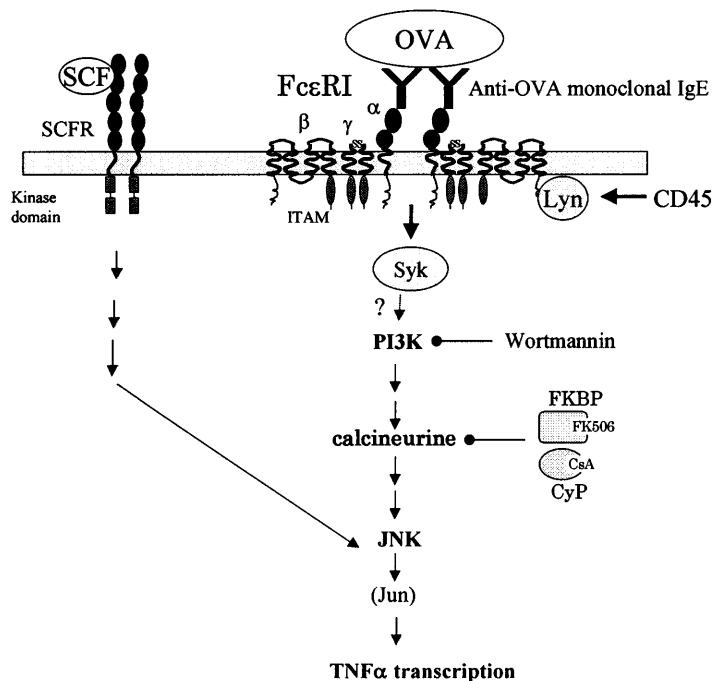


図1 MC/9細胞の情報伝達機構

次に、Rap の作用における p70^{s6k} の役割を調べるために、p70^{s6k} のノックアウト細胞を作製して検討した。Rap は FKBP と結合し、プロテインキナーゼ mTOR を阻害する。mTOR の下流には p70^{s6k} と eIF-4E binding protein(4E-BP1)があり、Rap 処理で両者は脱リン酸化される。4E-BP1 は脱リン酸化されると、eIF-4E (eukaryotic initiation factor-4E)に結合して eIF-4F 複合体の形成を阻害し、キャップ依存性の翻訳開始を阻害する。また Rap はリボソームタンパク質などをコードする 5'末端に特殊な構造を持つ遺伝子(5'TOP mRNA)の翻訳を特異的に抑制して、G1/S 期の移行を阻害するとされてきた。しかし、p70^{s6k} のノックアウト細胞(-/-細胞)は、速度は遅いが増殖でき、また Rap による細胞増殖抑制作用も野生型細胞(+/+細胞)と同程度であり、4E-BP1 のリン酸化にも影響は認められなかった。したがって Rap による細胞増殖抑制作用と 4E-BP1 の制御に p70^{s6k} は必須ではないことを明らかにした。一方、リボソーム S6 タンパク質のリン酸化は -/-細胞では観察されなかった。このことは S6 タンパク質が生体内で p70^{s6k} の基質であることを示している。さらに細胞の翻訳活性を測定したところ、-/-細胞では+/+細胞で見られるような Rap による 5'TOP mRNA に特異的な翻訳抑制は見られず、抑制の程度は+/+細胞や-/-細胞での Non-5' TOP mRNA の翻訳抑制と同程度であった。これらの結果から、mTOR の下流には、p70^{s6k} と S6 タンパク質のリン酸化を介してリボソーム等のタンパク質合成に関わる分子の翻訳を制御する経路が存在することが示唆された。p70^{s6k} は Rap のもつ細胞増殖抑制作用や 4E-BP1 の脱リン酸化への関与の可能性は低く、S6 タンパク質のリン酸化を介してリボソーム等の翻訳制御に必要な分子であることを明らかにした。

第三は、グルタミンに免疫賦活作用が知られ、またアミノ酸枯渇時の自食作用に S6 タンパク質リン酸化の関与が注目されていることから、培養液中のアミノ酸濃度と mTOR を介するシグナル経路との関係について検討した。ヒト T 細胞リンフォーマ、ジャーカット細胞の培養液のアミノ酸を除去すると、わずか 30 分で p70^{s6k} 活性は消滅した。一方、枯渇後にアミノ酸を再添加すると急速に p70^{s6k} は活性化された。4E-BP1 のリン酸化も同様の挙動を示した。アミノ酸による p70^{s6k} の活性化は Rap で抑制され、Rap 耐性 mTOR 導入細胞では Rap による抑制は認められなかった。つまり、アミノ酸による p70^{s6k} 活性制御も mTOR を介していることを明らかにした。次に mTOR がアミノ酸濃度を検出する機構を調べるために、アミノ酸トランスポーターと tRNA に着目し、これらに対する阻害剤を用いて検討した。細胞膜上には基質に対する特異性の異なるアミノ酸トランスポーターが存在するが、いずれの阻害剤もアミノ酸添加による p70^{s6k} 活性化を抑制したため、特定のトランスポーターがアミノ酸を検出しているとは考えられなかった。一方、アミノアシル tRNA シンセターゼの阻害剤であるアミノアルコールを添加したところ、アミノ酸枯渇と同様に p70^{s6k} 活性の減少が認められた。さらにヒスチジル tRNA シンセターゼ温度感受性変異株を、高温で培養してヒスチジル tRNA シンセターゼ活性を下げると p70^{s6k} 活性が阻害され、ヒスチジンの添加で回復した。以上の結果から、細胞培養液中のアミノ酸を枯渇させるとデアシル化 tRNA を介して、Rap 添加時と同様に mTOR を介するシグナルが抑制されることが明らかになった。細胞培養液中のアミノ酸のうちグルタミン濃度が最も高

く、グルタミンの免疫賦活作用が mTOR を介するシグナルで説明できる可能性を示唆するものである。

ロックアウト細胞を用いた実験とアミノ酸制御試験の結果を図 2 にまとめた。増殖因子やインスリン刺激により mTOR を介して p70^{s6k} の活性化と 4E-BP1 のリン酸化が起こる。Rap-FKBP 複合体は mTOR に結合して活性を阻害する。p70^{s6k} はリボソーム S6 タンパク質をリン酸化し、リボソーム等の翻訳機構分子の合成を活性化する。一方、4E-BP1 がリン酸化されるとキャップ依存性の全般的な mRNA の翻訳が開始される。細胞内に取り込まれたアミノ酸はアシル化 tRNA となり、タンパク質合成の材料となる。アミノ酸が枯渇すると材料不足によるタンパク質合成阻害に加え、デアシル化 tRNA の増加による mTOR 阻害というシグナルを介してタンパク質合成を阻害する。この作用を体全体で見ると、高血糖により誘導されるインスリン刺激以外に、アミノ酸という栄養でも mTOR や p70^{s6k}、4E-BP1 が活性化されることを本研究で初めて明らかにした。mTOR はグルコースとアミノ酸という二大栄養素の状態をシグナルとして受け取る重要な分子であるといえる。

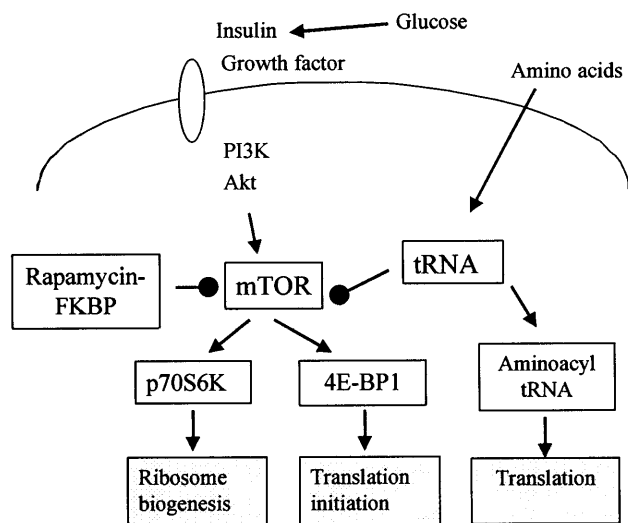


図 2 アミノ酸による mTOR の調節

本研究の成果をまとめると、CsA と FK506 が抗原刺激によるマスト細胞からの TNF- α 産生の活性化経路を阻害したため、これら薬剤がアレルギー疾患に有効と考えられる新たな作用機序を示した。しかし SCF が TNF- α 産生を増強し、このシグナル経路には上記薬剤の効果が認められなかったため、マスト細胞における SCF の新しい役割を示すと同時に、さらに有効な抗アレルギー剤開発の可能性を示した。また Rap は p70^{s6k} と 4E-BP1 を介するそれぞれ独立した経路でタンパク質合成を制御していること、さらにアミノ酸が tRNA を介して同経路を制御していることを明らかにした。これは動物細胞において、アミノ酸枯渇時に単に材料不足によりタンパク質合成が停止するのではなく、細胞が積極的にアミノ酸濃度を検出して、余分なタンパク質合成を素早く制御していることを示している。さらに臨床的には、免疫反応におけるアミノ酸の重要性とアミノ酸製剤による免疫制御の可能性を示すものである。細胞内シグナル伝達の観点からの検討により新しい免疫抑制剤開発は可能と考えられ、今後、生体反応の理解とともに創薬への指針のひとつとなることを期待したい。