

論文題目 CD26 分子を介した T 細胞の共刺激機構へのマンノース 6 リン酸/インスリン様成長因子 II 受容体の関与の検討

氏名 生 嶋 秀 人

【序論】

CD26 は最初 T 細胞表面抗原として報告され、その後、活性化された T 細胞に強く誘導されることから T 細胞活性化抗原として確立された分子である。CD26 は約 110kD の糖タンパク質であり、その細胞内領域のアミノ酸残基は 6 残基のみでそのほとんどを細胞外領域が占める。CD26 の細胞外領域は、アデノシンデアミナーゼやフィブロネクチン、コラーゲンと結合すること、また C 末端に近い領域はジペプチジルペプチダーゼ IV 活性をすることが知られている。CD26 分子の重要な機能として共刺激シグナル分子としての役割があり、CD26 と CD3 を固相化したモノクローナル抗体を用いて架橋すると、T 細胞の増殖やインターロイキン 2 (IL-2) の産生を誘導する。

CD26 は抗体によって架橋されるとインターナリゼーションされて細胞表面における発現が減少する。CD26 がインターナリゼーションされた細胞は、CD3 ζ や p56^{lck} などのシグナル伝達分子のチロシンリン酸化が増強されており、抗 CD3 抗体や抗 CD2 抗体の刺激に対する反応性も増強されていることから、インターナリゼーションは CD26 を介する T 細胞の共刺激に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、両者のメカニズムには不明の点が多い。

【研究目的】

CD26 はその細胞内領域が 6 アミノ酸残基しかなく、CD26 のシグナル伝達やインターナリゼーションには CD26 の細胞外領域と会合する分子が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、このような分子については明らかになっていない。本研究においては、新たな CD26 結合タンパク質の同定によって、CD26 の多彩な機能や CD26 を介した共刺激のメカニズムを明らかにする手がかりを得ることを目的とした。

【研究方法】

CD26 結合タンパク質の免疫沈降：細胞表面タンパク質をビオチン化により標識した細胞に、CD26 の細胞外領域部分（可溶性 CD26、sCD26）を結合させた。細胞を可溶化して抗 CD26 抗体を用いて sCD26 と CD26 結合タンパク質の複合体を免疫沈降し、電気泳動、PVDF 膜への転写の後、ストレプトアビジンを用いてビオチン化タンパク質を検出した。

CD26 結合タンパク質の精製及びアミノ酸配列の解析：免疫沈降の場合と同様に細胞に sCD26 を結合させた細胞から細胞膜画分を調製した。細胞膜画分を可溶化した後に sCD26 と CD26 結合タンパク質の複合体を免疫沈降した。電気泳動を行って CD26 結合タンパク質のバンドを切り出し、トリプシン分解の後、アミノ酸配列を決定した。

ファウエスタンプロットによる CD26 とマンノース 6 リン酸/インスリン様成長因子 II 受容体(M6P/IGFIIR)の結合の解析：CD26 を電気泳動して PVDF 膜に転写し、ウシ胎児血清から精製した M6P/IGFIIR を結合させた。結合した M6P/IGFIIR はウサギ抗 M6P/IGFIIR 抗体及び抗ウサギ IgG 抗体を用いて検出した。

抗 CD26 抗体を用いた架橋による CD26 の発現分布の変化およびインターナリゼーション：末梢血 T 細胞を抗 CD26 抗体とインキュベーションして CD26 を架橋し、インターナリゼーションさせた。CD26 と M6P/IGFIIR の発現分布の変化は免疫蛍光染色によって、CD26 のインターナリゼーションはフローサイトメトリーによって検討した。

抗 CD26 抗体による T 細胞の共刺激及び細胞の増殖の測定：末梢血 T 細胞を抗 CD3 抗体及び抗 CD26 抗体を接着させた 96 ウェルプレート上で培養して共刺激した。細胞の増殖は³H-チミジンの取り込みを測定することによって定量した。

【結果】

CD26 結合タンパク質の検索及び同定：sCD26 の細胞への結合をフローサイトメトリーにより検討した結果、ヒト細胞株である K562 細胞に sCD26 が結合することを見いだした。CD26 結合タンパク質を精製し、部分アミノ酸配列を決定したところ、得られた配列はマンノース 6 リン酸/インスリン様成長因子 II 受容体(M6P/IGFIIR)の配列と完全に一致した。さらにウサギ抗 M6P/IGFIIR 抗体を用いたウェスタンプロットによ

っても CD26 結合タンパク質が M6P/IGFIIR であることが確認された。

CD26 と M6P/IGFIIR の結合に対する CD26 の糖鎖中の M6P 残基の必要性の検討: sCD26 と抗 CD26 抗体を用いた免疫沈降の実験系で、マンノース 6 リン酸(M6P)の添加により CD26 と M6P/IGFIIR の結合が阻害された。さらに sCD26 をグリコシダーゼやホスファターゼによって処理し、M6P/IGFIIR との結合をファーウェスタンプロットで検討したところ結合の消失が観察された。これらの結果から CD26 と M6P/IGFIIR の結合は CD26 に付加された糖鎖中の M6P 残基を介した結合であると考えられた。

CD26 と M6P/IGFIIR の結合の生理的意義の検討: T 細胞に発現している CD26 の M6P 残基の有無を M6P/IGFIIR を用いたファーウェスタンプロットにより検討したところ、無刺激の T 細胞に発現している CD26 には M6P 残基は検出されなかったが、活性化 T 細胞の CD26 には M6P 残基が検出された。さらに免疫染色により T 細胞の CD26 と M6P/IGFIIR の発現分布を検討したところ、静止期の T 細胞膜上には M6P/IGFIIR の発現はほとんど認められなかったが、CD26 を架橋した細胞では CD26 に重なって M6P/IGFIIR の発現が認められ、架橋によって CD26 と M6P/IGFIIR の会合が誘導される可能性が示唆された。さらに CD26 の共刺激により増殖させた T 細胞は M6P による増殖の阻害が認められ、CD26 と M6P/IGFIIR の結合が CD26 による T 細胞の共刺激において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、フローサイトメーターを用いて、架橋による CD26 のインターナリゼーションが、M6P の添加によって阻害されることを確認した。

【考察と今後の展望】今回 CD26 の結合タンパク質として同定された M6P/IGFIIR は、CD26 の架橋によって T 細胞上でコロカリゼーションすることが免疫染色によって確認された。また、CD26 の共刺激による T 細胞の増殖が、M6P の添加によって阻害され、CD26 と M6P/IGFIIR の結合が CD26 による T 細胞の共刺激に何らかの役割を果たしていることが示唆された。一方、M6P による細胞増殖の阻害は部分的なものであったことから、M6P/IGFIIR に依存しない CD26 の共刺激シグナルの伝達様式も存在するものと推定される。M6P/IGFIIR は細胞内輸送に関与するタンパク質であることから、M6P/IGFIIR は CD26 の細胞内輸送を通じて共刺激シグナルの伝達に関与している可能性が考えられる。最近になって CD26 は架橋されることによってラフトに濃縮されること、またラフトの構造が CD26 を介する共刺激に必須であることが報告された。CD26 のラフトへの濃縮を M6P/IGFIIR が仲介する可能性や、M6P/IGFIIR がラフト内で CD26 と第三の分子の相互作用を仲介する可能性などが推測され、これらは今後の検討課題である。CD26 を架橋した T 細胞に M6P を加えることにより、細胞の増殖と CD26 のインターナリゼーションの両方が阻害されたことから、両者の間に密接な関係がある

と推測された。インターナリゼーションが共刺激に重要な役割を果たしているとすれば、インターナリゼーションされることによって CD26 が共刺激シグナルの伝達に重要な分子と結合する可能性が考えられる。共刺激シグナルの伝達の際に、インターナリゼーションを含めて CD26 の細胞内分布がどのように変化するか、また、それに伴って CD26 がどのような分子と相互作用するかについての詳細な解析は、CD26 分子の機能をさらに明らかにするばかりでなく、共刺激分子が T 細胞のシグナル伝達に關与する新しいメカニズムの知見を得ることにつながると考えられる。

【結論】本研究において、CD26 に結合するタンパク質としてマンノース 6 リン酸/インスリン様成長因子 II 受容体(M6P/IGF1R)を見出した。M6P/IGF1R は CD26 に付加された糖鎖中の M6P 残基を介して結合すると考えられた。T 細胞においては、活性化された細胞中の CD26 で M6P 残基が増加すること、また CD26 の架橋によって M6P/IGF1R が CD26 とコロカライゼーションすることを確認し、CD26 と M6P/IGF1R が会合していることが示唆された。さらに、CD26 を介した共刺激によって誘導される T 細胞の増殖が M6P によって阻害されたことから M6P/IGF1R が CD26 を介した T 細胞の共刺激に重要な役割を果たしていることが示唆された。M6P/IGF1R は細胞内輸送に關与する分子であることから、M6P/IGF1R が CD26 の細胞内輸送を通じて CD26 による T 細胞の共刺激に關与している可能性が推測された。架橋によって誘導される CD26 のインターナリゼーションが遊離 M6P の添加によって阻害され、インターナリゼーションが CD26 を介した共刺激に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。