

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

CD26 を介したヒト T 細胞活性化機構の分子細胞生物学的解析

指導教官 森本幾夫教授

東京大学大学院

医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 大沼 圭

【緒言】

活性化 T 細胞の表面抗原として確立された CD26 は、それ自身が細胞外に DPPIV (dipeptidyl peptidase IV) と呼ばれるペプチド分解酵素活性を有するユニークな細胞表面分子である。その発現は広範囲で腎、肝、腸管等の上皮細胞などにも認められる。一方、末梢血リンパ球ではメモリー T 細胞上に発現されている。静止期 T 細胞上では CD26^{high} の集団が重要な役割をはたしていることが知られている。この集団は CD45RO を発現するメモリー T 細胞に属し、破傷風トキソイドのようなメモリー抗原に反応するほか、B 細胞の抗体産性を誘導し、MHC クラス 1 特異的なキラー T 細胞の誘導活性も持つ。さらに CD26 陽性 T 細胞は IL-2、IFN- γ などのサイトカインを分泌する Th1 型の細胞である。この細胞集団は血管内皮細胞間で最も強い遊走能を持ち、炎症部位への移動、集積を起こし炎症局所でも重要な役割を果たしている。ヒト CD26 遺伝子は 766 個のアミノ酸よりなる 110kDa の膜タンパク質をコードする。cDNA より推測される CD26 の構造は N 末側が細胞質内、C 末側が細胞外に存在する 2 型膜蛋白質である。細胞内領域のアミノ酸は 6 残基のみで、膜通過部分が 22 残基、細胞外部分が 738 アミノ酸と、そのほと

んどが細胞外に存在する。細胞外領域には C 末側に近い部分に Ser630 を活性中心としたセリンプロテアーゼの共通配列が含まれ、そのすぐ N 末側が Cysteine rich domain でこの部位には Adenosin deaminase (ADA)、コラーゲンなどとの結合部位が存在する。CD26 分子は、TCR からの抗原特異的な 1 次シグナルと、抗原提示細胞上のリガンドとその対応する T 細胞上の受容体との相互作用により生じる抗原非特異的な 2 次シグナルを生じて、T 細胞活性化を誘導する、いわゆる共刺激分子の一つである。

このように CD26 は T 細胞の活性化シグナル伝達機構に直接関与しているが、前述のごとく CD26 分子は細胞内に 6 個のアミノ酸しかなく、シグナル伝達のためには他のシグナル伝達分子の関与が必要とされる。これらの候補として森本らは mannose 6-phosphate / insulin-like growth receptor II (M6P/IGF-IIR) の関与を示したが、binding domain の検索や adaptor molecule の動員に関わる分子機構の解明はなされていない。また、私は、破傷風トキソイドのようなメモリー抗原による T 細胞増殖を可溶性 CD26 (rsCD26) が増強させ、この際、M6P/IGF-IIR を介して rsCD26 が単球に取り込まれ、CD86 の発現増加を誘導することを報告した。しかしながら、増殖増強を示さない DPPIV 欠質変異 rsCD26 (S630A) も単球に取り込まれ、これは M6P によって阻害され、また、破傷風トキソイド処理していない単球においても rsCD26 は取り込まれ、M6P によって阻害されるため、M6P/IGF-IIR を介した rsCD26 の取り込みは CD86 の発現増強には直接関与していない可能性が考えられる。M6P/IGF-IIR を介したシグナル伝達機構の詳細な解明も行われていない。さらに、CD26 分子を介した T 細胞共刺激は CD26 特異抗体を用いたものであり、いわゆる natural ligand の同定には至っておらず、CD26 を介した T 細胞とその他のエフェクター細胞との相互作用が、炎症局所においていかなる役割を果たしているのか、いまだ未解決である。そこで、本研究においては、CD26 陽性 T 細胞の機能を理解するために、T 細胞上の CD26 分子に注目し、CD26 がいかんして TCR からの活性化シグナルを誘導する共刺激分子としての役割を発揮するのかを細胞のラフトという場に注目し研究した。ついで、CD26 陽性 T 細胞が破傷風トキソイドなどのメモリー抗原に強く反応して活性化されることに注目し、破傷風トキソイド処理された APC との相互作用における CD26 分子の役割を分子生物学的に再検討した。

【方法・材料および結果】

CD26 遺伝子を安定に導入した Jurkat 細胞株 (J.CD26 細胞株) の細胞溶解液からサッカロース濃度勾配超遠心分離法によりラフト分画を分離して SDS-PAGE で展開後、ウエスタンプロット法により、CD26 がラフト分画に存在するかどうかを検討したところ、CD26 がラフト分画に存在することが示された。また、J.CD26 細胞株を CD26 抗体 (Ta1-FITC) とラフトのマーカ、GM1 ガングリオシドと結合する Cholera toxin B subunit (CTB) で染色すると共局在を認め、CD26 が細胞膜上のラフトに存在することが認められた。さらに、ヒト末梢血 T 細胞を CD26 抗体による CD26 のクロスリンクの有無により、ラフト内の CD26 タンパク量をウエスタンプロット法で検討したところ、CD26 抗体処理によってラフト分画の CD26 が増加していることが示された。また、CD26 抗体クロスリンクにより c-Cbl、ZAP70、ERK1/2、TCR とのチロシンリン酸化が認められるが、cytochalasin D でヒト末梢血 T 細胞を前処理してラフトを形成を阻害すると、これらのチロシンリン酸化は減弱することが示された。これらの結果から、T 細胞上の CD26 もラフトに存在し、クロスリンクにより多くの CD26 がラフトに動員され、ラフトの集合を介して刺激シグナルが伝達されることが示された。

次に、CD26 結合分子の探索と免疫学的意義の検討を行った。ヒト末梢血単核球 (PBMC) に Oregon green 標識した rsCD26 を添加したところ、CD14 陽性単球の 80% 以上に取り込まれていることがわかった。PBMC から単球を純化して rsCD26 を添加すると単球上の CD86 の発現増強を認めた。つぎに、CD26-ADA セファロースカラムに THP-1 細胞溶解液を通した抽出液を SDS-PAGE 後、銀染色で約 20-25kDa 付近に検出されたバンドを切り出して MALD-TOF MS で解析すると、caveolin-1 が新たな CD26 結合タンパクである可能性が示唆された。GST 融合 CD26 及び削除変異体、GST 融合 caveolin-1 及び削除変異体を用いた GST pull-down アッセイにより、caveolin-1 の 82-101 アミノ酸残基 (scaffolding domain) は CD26 の 201-211 アミノ酸残基 (caveolin-1 binding motif) を介して結合することが判明した。また、単球の caveolin-1 は破傷風トキソイド処理 12-24 時間後にその一部が細胞表面に露出することが明らかとなった。さらに、caveolin-1 は scaffolding domain で Tollip (Toll interacting protein) の C2 ドメインと結合していることが、免疫沈降法、免疫細胞化学、GST pull-down アッセイにより示された。そして、CD26 と結合した単球上の caveolin-1 はリン酸化

され、結合していた Tollip を解離し、IRAK のリン酸化が認められた。さらに、核タンパク抽出液の DNA 結合タンパクアッセイにより、CD26 で刺激された単球では NF- κ B が活性化されていることが判明し、ヒト CD86 プロモータ領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより、CD26-caveolin-1 の下流で CD86 転写活性をもたらすためには、CD86 プロモータ領域にある 2 つの NF- κ B 結合部位が必要であることが明らかとなった。

【考察】

本研究により、T 細胞上の CD26 はラフトに存在し、クロスリンクにより、より多くの CD26 がラフトに動員され、ラフトの集合を介して刺激シグナルが伝達されることが示された。さらに、CD26 陽性 T 細胞は破傷風トキソイドなどのメモリー抗原に強く反応して活性化されるが、これは破傷風トキソイドペプチドを提示する APC との接触面で CD26 と caveolin-1 の結合が関与しており、CD26 と結合した caveolin-1 はリン酸化されて Tollip-IRAK の相互作用により NF- κ B を活性化することで CD86 の転写活性を増強することが示された。また、T 細胞上の CD26 は、抗原提示細胞の caveolin-1 の結合によって集簇しラフトを介して活性化シグナルを伝達することが示唆された。従来、TCR の共刺激として CD28-CD86/CD80、CD40-CD154 のレセプター・リガンド相互作用が有名であるが、共刺激分子としての CD26 の詳細なレセプター・リガンド相互作用は不明であった。今回の結果から、CD26 結合分子として caveolin-1 が同定され、T 細胞・APC の共刺激を伝達するために CD26-caveolin-1 の相互作用が示された。本研究で明らかにした、CD26 陽性 T 細胞がメモリー抗原提示細胞と相互作用する分子機構は、合成ペプチドや抗体などの組み替えタンパクによる免疫寛容誘導療法への応用につながることを期待される。さらに CD26 抗体医薬への応用とともに、caveolin-1 結合部位である CD26 のポケット構造を標的とした薬物の合成により、抗原特異的な免疫反応の増強誘導するアゴニストや、アロ抗原特異的な免疫抑制や寛容誘導するアンタゴニストなどのへの実用化が期待される。また、rsCD26 などの組み替えタンパクによって特異免疫が増強することは、これら分子のがん樹状細胞療法やウイルスワクチンの免疫アジュバントとしての応用へと拡大できるであろう。