

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大沼 圭

本研究は、ヒト・メモリーT 細胞において重要な役割を演じていると考えられる CD26/dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) の T 細胞活性化機構における分子細胞生物学的意義を明らかにするため、T 細胞における CD26 を介した共刺激の分子機構の解明、CD26 の結合分子の単離・精製、および、それらの機能解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 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、ウエスタンブロット法によって解析した結果、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) で染色し共焦点レーザー顕微鏡で検討した結果、CD26 は CTB 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示された。
2. 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ブ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 タンパク量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 などのチロシンリン酸化が認められるが、ラフト形成の阻害剤 cytochalasin D でヒト末梢血 T 細胞を前処理すると、これらのチロシンリン酸化は減弱することが示された。したがって、CD26 を介した T 細胞共刺激は、CD26 によるラフトの凝集を介して行われることが示された。
3. CD26 の細胞外領域を組み換えタンパクとして発現、精製し、Oregon green 標識した rsCD26 をプローブとして種々の細胞との結合性を検討したところ、ヒト末梢血中の CD14 陽性単球と単球系細胞株 THP-1 に結合することが示された。THP-1 細胞溶解液を用いて CD26-ADA セファロースカラムを通した抽出液を 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 で解析した結果、caveolin-1 が新たな CD26 結合タンパクであることが示された。さらに、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免疫共沈法により、caveolin-1 の 82-101 アミノ酸残基 (scaffolding domain) は CD26 の DPPIV 酵素活性のポケット構造部位 201-211 アミノ酸残基 (caveolin-1

binding motif) と 630 番目のセリン残基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示された。

4. 単球の caveolin-1 は Tollip と結合していることが免疫沈降法、免疫細胞化学的方法により示された。また、GST 融合 Tollip 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 アミノ酸残基は Tollip の 47-178 アミノ酸残基 C2 ドメインと結合していることが示された。さらに、組み換え CD26 タンパクを polystyrene microbeads にコートし、これを stimulator として破傷風トキソイドで処理された単球を刺激し、細胞溶解液から抗 caveolin-1 抗体で免疫沈降法により解析したところ、caveolin-1 はリン酸化され、結合していた Tollip を解離し、IRAK-1 のリン酸化が認められた。
5. 組み換え CD26 タンパクをコートした polystyrene microbeads にて、破傷風トキソイド処理された単球を刺激し、これらの細胞より得られた核タンパク抽出液を用いた 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た。さらに、ヒト CD86 プロモータ領域を利用したルシフェラーゼアッセイにより、CD26 によって刺激された 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。

以上、本論文は CD26 陽性メモリーT細胞において、CD26 が共刺激分子として機能するためには、細胞膜上の微小構造ラフトとの相互作用が必要であることを明らかにした。さらに、CD26 の新たな結合分子 caveolin-1 を同定し、それらの結合ドメインと、CD26 と caveolin-1 の結合によってもたらされる CD86 発現増強に至る単球内のシグナル伝達機構を明らかにした。本研究は、これまで未知に等しかった、CD26 陽性メモリーT細胞の分子生物学的な活性化機構を解明し、メモリー抗原に対するT細胞の免疫応答およびその後生じる炎症反応の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。