

論文内容の要旨

論文題目

TRAF6 による IL-2 シグナル伝達の負の制御機構

氏名 茂木秀彦

【背景】

TRAF6 欠損マウスは自己免疫疾患により末梢組織に炎症が認められる。また TRAF6 欠損マウスのリンパ球を移植した野生型マウスでも同様に末梢組織に炎症が起こり、同時に活性化した T 細胞の増加が見られる。これは TRAF6 欠損により T 細胞が活性化状態になり、それが自己免疫疾患の一因であることを示唆する。また TCR 刺激による活性化により T 細胞中の TRAF6 が発現上昇することが報告されている。

以上より TRAF6 が T 細胞中で T 細胞活性を制御している可能性が考えられる。

またこれまでに T 細胞における TRAF6 の機能に関する報告として、TRAF6 は TCR 刺激による NF- κ B の活性化を正に制御するという報告や、TRAF6 は TCR シグナルにおいて PI3K、Akt を負に制御するという報告がある。

しかし、T 細胞における TRAF6 の詳細な機能解明は未だなされていない。

【目的】

T 細胞における TRAF6 の機能とその分子メカニズムを詳細に解明する。

【結果】

① ; TRAF6 は T 細胞内で負の制御因子として機能している。

野生型マウス、TRAF6 欠損マウスそれぞれの T 細胞に TCR 刺激を加えると、野生型マウスに比べ、TRAF6 欠損マウスで有意な増殖の亢進が認められた。また T 細胞の増殖に必要なサイトカインである IL-2 の産生も同様に TRAF6 欠損マウスで優位な亢進が認められた。またこの IL-2 産生亢進は mRNA でも認められた。

そのため IL-2 産生に関与することが知られている転写因子(NF- κ B、AP-1、NFAT)の解析を行った。その結果、TCR 刺激による NF- κ B の活性化、NFATc1 の発現は野生型マウス、TRAF6 欠損マウスで差は認められなかったが、AP-1 の活性化が TRAF6 欠損マウスで有意に亢進していることが認められた。また AP-1 は c-Fos、c-Jun などの二量体で構成されているため c-Fos、c-Jun の核内の発現を検討した。その結果 c-Jun の発現に差は認められなかったが、c-Fos の発現が TRAF6 欠損マウスで亢進していた。

以上の結果より、TRAF6 は T 細胞内で負の制御因子として機能していると考えられる。

TRAF6 欠損マウスで見られる増殖亢進のメカニズムは以下のモデルが考えられる。

TCR 刺激→核内 c-Fos 発現亢進→AP-1 活性化亢進→IL-2 産生亢進→増殖亢進

② : TRAF6 は IL-2 シグナル上で負の制御因子として機能している。

T 細胞は TCR 刺激により IL-2 を産生し、産生された IL-2 はオートクライン的に自身の IL-2 受容体(IL-2R)に作用することで増殖が誘導されると考えられている。またオートクライン IL-2 による IL-2 刺激が IL-2 産生に関与するという報告もある。そこで、IL-2 中和抗体存在下で TCR 刺激を行うことで、T 細胞から産生される IL-2 を中和し、IL-2 刺激が入らない状態し、その時の IL-2 の mRNA を野生型マウス、TRAF6 欠損マウスで比較した。その結果 IL-2 中和抗体存在下での IL-2 の mRNA は野生型マウスと TRAF6 欠損マウスで同程度に減少していた。この結果は TRAF6 が IL-2 シグナル中で負の制御因子として機能している可能性を示唆している。

そこで野生型マウス、TRAF6 欠損マウスそれぞれの IL-2 シグナルを検討すると、TRAF6 欠損マウスで c-Fos の発現を誘導すると考えられている Erk の活性化亢進が認められた。これらの結果から TRAF6 は IL-2 シグナル中で負の制御因子として機能していると考えられる。

③ : マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を用いたIL-2シグナルの検討

TRAF6欠損マウスは野生型マウスに比べてT細胞の活性化が認められている。そのため、上記のマウスT細胞を用いた系では元々の活性化状態が違う細胞を比べている可能性があり、IL-2シグナルにおけるTRAF6の詳細な機能解明は難しいと考えた。この問題を解決するには、マウスT細胞以外の細胞を用いた系でIL-2シグナルの検討を行う必要がある。そこ

で、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を用いたIL-2シグナル検討系を確立した。これは野生型MEFとTRAF6欠損MEFにIL-2R α β γ を発現させ、IL-2刺激を加えることで、IL-2シグナルを検討するモデルである。

このモデルにおいても、野生型MEFに比べ、TRAF6欠損MEFでErkの活性化の亢進が認められた。

次にTRAF6欠損MEFにTRAF6を戻したMEFを構築し、TRAF6欠損MEFとIL-2シグナルを比較した。その結果、TRAF6を戻したTRAF6欠損MEFに比べ、TRAF6欠損MEFでErkの活性化の亢進が認められた。またErkの下流であるc-Fosの発現もTRAF6欠損MEFで亢進が認められた。

また野生型MEFにTRAF6を過剰発現させたMEFと野生型MEFのIL-2シグナルを比較すると、TRAF6を過剰発現させた野生型MEFでErkの活性化の減弱が認められた。

これらの結果からMEFを用いたIL-2シグナル検討系においてもTRAF6はIL-2シグナルにおいて負の制御因子であることが確認された。

④ : IL-2R β に TRAF6 は結合する。

IL-2 のレセプターである IL-2R は IL-2R α , β , γ の三量体で構成されている。IL-2R を調べると IL-2R β 上に TRAF6 結合配列があり、更に TRAF6 結合配列は様々な種で高度に保存されていることを発見した。また IL-2R β と TRAF6 が IL-2R β 上の TRAF6 結合配列依存的に結合することを実験的に確かめた。

⑤ : TRAF6はIL2R β 結合依存的にIL-2シグナルを制御している。

上記の結果からIL-2シグナルにおけるTRAF6の負の制御機能はIL-2R β 結合依存的に起きているのかを確かめるため以下の実験を行った。

IL-2R β のTRAF6結合配列に部分変異を入れ、TRAF6と結合できないIL-2R β を発現させたMEFを構築し、正常なIL-2R β を発現させたMEFとIL-2シグナルの比較を行った。

その結果、正常なIL-2R β を発現させたMEFに比べ、TRAF6結合配列に部分変異をいれたIL-2R β を発現させたMEFでErkの活性化の亢進、c-Fosの発現の亢進が認められた。

そのため、IL-2シグナルにおいてTRAF6はIL-2R β との結合依存的にIL-2シグナルを制御していることが示唆された。

⑥ : TRAF6はIL-2シグナルにおいてJak1の活性化を制御している。

IL-2シグナルにおいてErkの活性化は上流のJak1の活性化によっておこると考えられている。またIL-2R β 上のJak1の結合部位はTRAF6結合部位と非常に近傍にあることが報告されており、更にこれまでの結果からTRAF6はIL-2R β 結合依存的にIL-2シグナルを制御していることが分かっている。以上よりIL-2シグナルにおいてTRAF6はJak1の活性化に影響を与えている可能性が考えられる。

そこで、前述のMEFの系を用いてJak1の活性化の検討を行った。

TRAF6欠損MEFにTRAF6を戻したMEFとTRAF6欠損MEFを比較すると、TRAF6欠損MEFでJak1の活性化の亢進が認められた。またTRAF6結合配列に部分変異をいれたIL-2R β を発現させたMEFと正常はIL-2R β を発現させたMEFを比較すると、TRAF6結合配列に部分変異を入れたIL-2R β を発現させたMEFでJak1活性化の亢進が認められた。

この結果からTRAF6はIL-2シグナルにおいてJak1活性化を負に制御し、更にそれはIL-2R β 結合依存的に起こることが分かった。

【まとめ】

上記の結果のようにTRAF6はIL-2シグナルを負に制御しており、そのメカニズムとしてTRAF6がJak1活性を負に制御していることが考えられる。

現在TRAF6がどのようにJak1活性を制御しているかの解明を進めている。