



Title	T細胞活性化におけるサイクロスボリンAの抑制機序の解析
Author(s)	水島, 由美子
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35302">https://hdl.handle.net/11094/35302</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	水 島 由 美 子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7651 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	T 細胞活性化におけるサイクロスボリン A の抑制機序の解析
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之 (副査) 教授 吉田 博 教授 遠山 正弥

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

サイクロスボリン A (CsA) はその卓越した免疫抑制効果により、近年最も効果的な免疫抑制剤として注目を浴びるようになってきた。CsA による主な免疫抑制効果は、T 細胞レセプター刺激後のリンホカインの産生が抑制されることよりもたらされ、それはリンホカイン mRNA 産生レベルで阻害されていることが明らかとなっている。従って、CsA の抑制機序を解明することは、T 細胞レセプター刺激からリンホカイン遺伝子発現に至る T 細胞活性化カスケードをより詳細に解明していく上で重要である。現在、T 細胞の刺激伝達において、polyphosphoinositides 代謝産物、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇とそれによるカルモジュリン (CaM) の活性化、 $\text{Ca}^{2+}$ -リン脂質依存性プロテインキナーゼ (C キナーゼ) の活性化の重要性が指摘されている。このような T 細胞活性化過程における諸反応に対し、CsA の作用点に関しては不明であり、今回、種々のアッセイ系で CsA の作用を解析した。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### I. CsA による IL2 産生の抑制

マウス脾細胞を ConA で刺激して 20 時間後の培養上清を採取し、CTL-L-2 培養液中に添加後 24 時間目の  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを IL2 活性とした。ConA 刺激で IL2 産生が認められたが、ConA と同時に CsA を添加すると、CsA の濃度依存性に IL2 産生が抑制され、83nM で完全に IL2 産生が認められなくなった。

##### II. T 細胞活性化初期過程における CsA の影響

1) ConA 刺激による inositolphosphates 産生に及ぼす CsA の影響：マウス胸腺細胞を  $[^3\text{H}]$ -

inositolでラベルし、ConA刺激の際のIP<sub>1</sub>、IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>の産生を調べた。それぞれの分離はBerrigeの方法に従った。ConA刺激10分のinositolphosphates産生に及ぼすCsAの効果を検討したところ、ほとんど影響が認められなかった。

2) CsAのCa<sup>2+</sup>-CaM依存性酵素活性への影響：ホスホジエステラーゼ(PDE)活性は、牛脳より調製したCaM及びPDEと、cAMPをインキュベートし得られた5'-AMPをc-atroxにより遊離Piとし、このPi量をAmes法により定量し求めた。この活性はCaM拮抗剤であるTFP、W-7存在下で阻害されたが、CsAは166μMまで活性に影響を与えたなかった。また、ミオシン軽鎖リン酸化酵素(MLCK)活性として、CaM及びニワトリ砂囊より調製したMLCK、MLCを[<sup>32</sup>P]ATPと共にインキュベートし、MLCのリン酸化を調べた。MLCK活性もPDEと同様、TFP、W-7により濃度依存性に抑制されたが、CsAを330μMまで添加しても抑制されなかった。

3) ConAレセプターのキャッピング及びそれに伴う細胞骨格関連蛋白質の再分布に対するCsAの効果：マウス脾細胞をナイロンウールを通過させ得られたT細胞をローダミン-ConAで刺激し、30分後、2.5%ホルムアルデヒドにて固定、0.1% TritonX-100処理をした。このキャップ形成細胞において、細胞骨格関連蛋白質(カルスペクチン、カルデスマン、トロポミオシン)の細胞内局在をFITCを用いた間接蛍光抗体法にて調べた。ConAキャップ形成及びそれに伴う細胞骨格関連蛋白質の再分布はCa<sup>2+</sup>-CaM依存性であり、TFPによって抑制された。しかし、CsAは影響を与えたなかった。

4) Cキナーゼ活性へのCsAの効果：ラット脳より調製したCキナーゼをH1-ヒストン、[<sup>32</sup>P]ATPと共にインキュベートし、dioleinあるいはTPA刺激の際のCキナーゼによるH1-ヒストンのリン酸化を調べた。CsAは230μMまでその活性を抑制しなかった。

### III. A23187とTPA刺激によるIL2産生におけるCsAの影響

T細胞を細胞内Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こすカルシウムイオノフォア(A23187)と、Cキナーゼを直接活性化すると考えられているTPAで同時に刺激するとIL2が産生される。そこでTPA+A23187と同時にCsAを添加すると、83nMでIL2産生が完全に抑制された。

#### [総括]

今回の結果から、CsAは、抗原によるT細胞レセプター刺激の代用となるConA刺激後細胞に引き起こされる諸反応、即ち、inositolphosphates産生、Ca<sup>2+</sup>-CaMの機能発現(Ca<sup>2+</sup>-CaM依存性酵素活性及びConAキャッピングとそれに伴う細胞骨格関連蛋白質の再分布)、さらにTPAやdioleinによるCキナーゼの活性化に影響を与えないことが明らかとなった。しかし、T細胞レセプター刺激をバイパスすると考えられているA23187+TPA刺激によるIL2産生をCsAは抑制した。従って、CsAはT細胞レセプター刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とそれによるCaMの機能発現、並びにCキナーゼの活性化以降の刺激伝達過程を阻害していることが強く示唆された。現時点において、レセプター刺激が細胞質から核内へと伝達される過程は未だ不明のままである。そのなかにあり、今回、CsAはその刺激伝達経路後半に影響を及ぼしていることが判明し、今後その作用点をさらに明らかにしていくこ

いくことは、興味深い問題であると考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

本研究では、T細胞レセプター刺激後のIL2産生を抑制する薬剤であるサイクロスボリンAの抑制機序を種々の系で解析した。その結果、サイクロスボリンAはT細胞レセプター刺激伝達初期で重要な役割を果たすといわれるinositolphosphatesの产生、 $\text{Ca}^{2+}$ —カルモジュリンによる酵素の活性化及び細胞骨格の制御、さらにプロテインキナーゼCの活性化を抑制しないことが明らかとなった。しかし、T細胞レセプターを介した刺激をバイパスすると考えられているTPAとカルシウムイオノフォアで刺激した際のIL2産生の系では、サイクロスボリンAは抑制することを見い出した。

従って、サイクロスボリンAが刺激伝達の初期過程には何ら作用せず、後期過程でその作用を発揮することを明らかにした本研究は、現在、T細胞レセプター刺激伝達経路の後半がいまだ不明である点を勘案すると、今後、T細胞活性化カスケードをさらに解明していくうえで有用な知見であり、学位論文として価値あるものと認められる。