



Title	T細胞活性化におけるサイクロスポリン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	https://hdl.handle.net/11094/35302
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	みづ しま ゆみ こ 水 島 由 美 子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7 6 5 1 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ポリン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]

サイクロスポリン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によりもたらされ、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うえで重要である。現在、T細胞の刺激伝達において、polyphosphoinositides代謝産物、細胞内Ca²⁺濃度上昇とそれによるカルモジュリン (CaM) の活性化、Ca²⁺-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-2培養液中に添加後24時間目の³H-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 [³H]-

inositolでラベルし、ConA刺激の際の IP_1 , IP_2 , IP_3 , IP_4 の産生を調べた。それぞれの分離はBerridge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^{2+} -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166 μ Mまで活性に影響を与えなかった。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 $[^{32}P]$ 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330 μ M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細胞をロードミン-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(カルスベクチン, カルデスモン, 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^{2+} -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, $[^{32}P]$ 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230 μ M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^{2+} 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^{2+} -CaMの機能発現(Ca^{2+} -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^{2+} 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ポリンAの抑制機序を種々の系で解析した。その結果、サイクロスポリン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の産生、 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、サイクロスポリンAは抑制することを見出した。

従って、サイクロスポリン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。