

Title	ヒトBリンパ球特異抗原CD40のシグナル伝達に必要な細胞質内領域の同定
Author(s)	改正, 恒康
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37105
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	かい 改	しょう 正	つね 恒	やす 康
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9083	号	
学位授与の日付	平成2年3月24日			
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒトBリンパ球特異抗原CD40のシグナル伝達に必須な 細胞質内領域の同定			
論文審査委員	(主査) 教授	岸本 忠三		
	(副査) 教授	濱岡 利之		教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

〔目的〕

ヒトリンパ球抗原CD40は、B細胞上に発現されている分子量45kDaの糖タンパクである。抗CD40モノクローナル抗体は、抗IgM抗体あるいはTPAにより活性化された正常B細胞の増殖を著しく促進することから、CD40は、B細胞特異的な増殖シグナルの受容体である可能性が示唆されている。また、遺伝子クローニングより推定されるアミノ酸の一次構造上、細胞質内領域にチロジキナーゼ活性ドメインを持たない増殖シグナルの受容体のカテゴリーに属することが明らかとなっている。CD40を介するシグナル伝達機構を解明するため、我々は、ヒトCD40を膜面上に発現するマウスB細胞株を確立し抗CD40抗体による増殖反応を解析した。さらに、*in vitro mutagenesis*により細胞質内領域を修飾したCD40 cDNAを用いて、増殖シグナル伝達に必須の細胞質内領域の同定を試みた。

〔方法ならびに結果〕

(1) ヒトCD40を膜面上に発現するマウス細胞株の樹立：発現ベクターに組み込まれたCD40 cDNAをネオマイシン耐性遺伝子pSV2neoと共に、マウスBリンパ腫由来細胞株M12，あるいは、マウス胸腺腫由来細胞株EL-4に電気穿孔法により導入した。G418耐性細胞を抗CD40抗体で染色し、FACSを用いたsortingにより、ヒトCD40を膜面上に安定に発現するクローンを確立した。

(2) CD40陽性マウス細胞株の機能的解析：CD40陽性M12(K2C3)と親株(M12)を、抗CD40抗体あるいはTPAの存在下、非存在下にて96穴プレート中で、3日間培養した。最後の3時間に³H-TdRを添加し、そのとり込みを液体シンチレーションカウンタにて測定した。ヒト正常B細胞とは対照的に、

K2C3の増殖は、抗CD40抗体により阻害された。阻害活性は、12.5 ng/mlより認められ、正常B細胞の増殖を促進する濃度にはほぼ相当した。TPAの共存下にて、増殖は90%以上阻害された。親株の増殖は、抗体、TPAにより阻害を受けず、この増殖阻害はCD40を介したシグナルによるものであることが明らかとなった。また、CD40陽性EL-4の増殖も、抗体、TPAにより同様に阻害され、B細胞とT細胞に共通なシグナル伝達機構が存在する可能性が示唆された。さらに、抗体のトランスフェクタントに対する刺激効果が、正常B細胞のそれを反映している可能性を検討するため、CD40分子のリン酸化を比較した。扁桃腺由来B細胞とK2C3をTPAの存在下、非存在下にて³²P-正リン酸でラベルしたのち可溶化し、抗CD40抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGEによる解析を行った。

両者において、CD40分子はTPAの非存在下でリン酸化されており、そのリン酸化はTPAの存在化に増強されることが明らかとなり、トランスフェクタントにおいて、正常B細胞でのシグナル伝達のメカニズムが反映されている可能性が示唆された。

(3) CD40のシグナル伝達に必須の細胞質内領域の同定：CD40は、細胞質内領域62個のアミノ酸を含む257個のアミノ酸より構成される。シグナル伝達に必須の領域を同定するため、202番目、または233番目以降のアミノ酸を欠失させるCD40 cDNA、また細胞質内領域の7個のセリン、スレオニンのうち6個、さらに1個のシステインをグリシンまたはアラニンに変異させるCD40 cDNAを、*in vitro* mutagenesisにより作成した。先程と同様に、以上の変異CD40を発現するM12を確立し、抗体による増殖能を解析した。すると、202番目及び233番目以降のC末端アミノ酸を欠損したCD40、また234番目のスレオニンがアラニンに変異したCD40を発現するM12では、抗体による増殖阻害も、TPAとの相加効果も認められなくなった。他の変異CD40を発現するM12では、正常CD40を発現するM12と同様に、抗体、TPAによる増殖阻害が認められた。これらのことより、CD40を介する増殖シグナル伝達に、234番目のスレオニンを含む領域が必須であることが明らかとなった。

〔総括〕

ヒトCD40を発現するマウス細胞株は、抗CD40抗体により、正常B細胞と異なり、増殖を阻害された。しかし、この系は、抗体の有効濃度、TPAとの相加効果、及びCD40分子のリン酸化の挙動より、正常B細胞におけるCD40を介したシグナル伝達機構を反映していると考えられる。種々の変異CD40を発現させたマウスB細胞株の増殖反応を解析することにより、233番目のグルタミン酸以降の細胞質内領域、特に234番目のスレオニンを含む領域がCD40のシグナル伝達に必須であることが明らかとなった。この部位の機能は現在明らかではないが、CD40はチロシンキナーゼドメインを持たない増殖シグナル受容体の伝達機構を解析するうえで、有用なモデルとなると考えられる。

論文の審査結果の要旨

ヒトBリンパ球抗原CD40は、B細胞特異的な増殖シグナルの受容体であることが示唆されている。また、CD40は、遺伝子クローニングより推定されるアミノ酸の一次構造上、細胞質内領域にチロジンキナーゼ活性ドメインを持たないことも明らかとなっている。

我々は、本研究により、まず、ヒトCD40を発現させたマウスB細胞株トランスフェクタントの増殖が抗CD40抗体により阻害されることを示し、この系が、正常ヒトB細胞のCD40を介したシグナル伝達機構を反映していることを明らかにした。さらに、この系を利用することにより、細胞質内の単一のアミノ酸スレオニンがシグナル伝達に必須であることを証明した。以上の知見は、他のチロジンキナーゼ活性ドメインを持たない増殖因子受容体のシグナル伝達機構を解明する上でも、有用な情報を提供すると考えられる。

ゆえに、本論文は、学位論文として価値あるものと考えられる。