The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Differential Involvement of a Fas-CPP32-Like Protease Pathway in Apoptosis of TCR/CD 9-Costimulated, Naive T cells and TCR-Restimulated, Activated T Cells
Author(s)	朴, 曽奭
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41749
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

【27】

氏　　名	朴　曽　奭（ぼく　ずん　すく）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15232　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Differential Involvement of a Fas-CPP32-Like Protease Pathway in Apoptosis of TCR／CD 9 -Costimulated, Naive T cells and TCR-Restimulated, Activated T Cells （Naive T 細胞のTCR／CD 9 副刺激及び Activated T 細胞の TCR 再刺激に基づく細胞死における Fas-CPP32-Like Protease 経路関与の差異）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　濵岡　利之 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　審良　静男

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

T 細胞における細胞死として、不適当な T cell receptor（TCR）刺激により活性化された結果起こるアポトーシスと、反復的な TCR 刺激によってアポトーシスが誘導される activation induced cell death（AICD）が知られている。AICD では、Fas 分子と FasL の相互作用によって CPP32（caspase－3）を含む caspases が活性化されて細胞死が起こる。一方、不適当な TCR 刺激によるT細胞死では Fas が関与しないことが報告されていたが、caspases が関与するか否かは明らかではない。最近、当教室で樹立した CD 9 分子に対する単クローン抗体と抗 TCR（抗 CD 3）抗体でT細胞を共刺激した場合、T細胞は一旦は強く活性化されるが速かにアポトーシスに陥ること、即ち、不適当な TCR 刺激によるアポトーシスの誘導が明らかになった。そこで、本研究は CD 3 分子と共に CD 9 分子を刺激した場合に惹起されるアポトーシスに、Fas－FasL の相互作用が関与するか、且つ caspase 3 －like protease が働いているか否かを検討することを目的とした。

【方法】

マウスは C57BL／6、MRL－lpr および MRL－$^{+/+}$を用いた。T細胞は、マウスのリンパ節から、磁気ビーズを用いてB細胞と APC を除去することにより精製した。アポトーシスは、電気泳動による DNA の断片化の検出、あるいは PI 染色により解析した。T細胞を抗 CD 3 抗体と抗 CD 9 抗体により活性化した。又、T細胞を Con A 刺激後 IL－2 で維持して Con A blast を作成し、AICD は Con A blast を抗 CD 3 抗体で刺激して誘導した。caspase 3 の活性化は、蛍光標識基質（MCA－DEVDAPKdnp）を用いて、cell lysate 中の活性を測定した。

【成績】

まず、CD 3 ／CD 9 共刺激した場合に誘導されるアポトーシスに Fas－FasL 相互作用が関与するか否かについて検討した。抗 CD 3 抗体で刺激された ConA blast と同様に、CD 9 副刺激によって活性化されたT細胞は細胞表面上に Fas 分子を発現した。抗酸化剤 N－acetyl cysteine（NAC）は Fas の発現を抑制することが報告されているが、両T細胞集団共に NAC により Fas 発現が抑制された。Fas 発現減弱に伴い AICD は抑制された一方、CD 9 副刺激による細胞死は rescue されなかった。又、AICD は抗 FasL 抗体で抑制されたが、CD 9 副刺激による細胞死は rescue されなかった。更に、Fas mutant の lpr マウスを用いて、Fas－FasL 相互作用が CD 9 副刺激による細胞死に関与するか否かを検討したところ、lpr マウスでも CD 9 副刺激による細胞死が惹起された。これらの結果より、CD 9 副

刺激による細胞死ではFas－FasL相互作用が関与しないことが明らかになった。

Fas分子からの細胞死ではcaspase 3－like proteaseが関与することによりDNA断片化が起こって細胞死に至る。CD 9副刺激における細胞死でもcaspase 3－like proteaseが活性化されるか否かを蛍光標識したcaspase 3 substrateを用いて検討した。その結果、Fasからの細胞内signalが伝達されるAICDではcaspase 3－like proteaseの活性化を認めたが、CD 9副刺激による細胞死ではその活性化は検出されなかった。

更にcaspase阻害剤であるZVAD－fmk、BD－fmkを用いてCD 9副刺激およびAICDによる細胞死がrescueされるか否かを検討した。その結果、CD 9副刺激による細胞死、AICD共に両方のcaspase阻害剤で抑制され、両系の細胞死におけるcysteine proteaseの関与が明らかになった。

【総括】

CD 9副刺激による細胞死では、AICDの場合と異なりFas－FasL相互作用が関与しなかった。また、CD 9副刺激による細胞死ではcaspase 3－like proteaseが活性化されなかったが、caspase阻害剤であるZVAD－fmk、BD－fmkで細胞死が抑制された。これらのことからCD 9副刺激による細胞死では、AICDで働いているcaspase以外の未知のcysteine proteaseによってアポトーシスが誘導されていること、即ち新しいT細胞死の経路の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

T細胞における細胞死として、不適当なT cell receptor（TCR）刺激により活性化された結果起こるアポトーシスと、反復的なTCR刺激によってアポトーシスが誘導されるactivation induced cell death（AICD）が知られている。AICDでは、Fas分子とFasLの相互作用によってCPP32（caspase－3）を含むcaspasesが活性化されて細胞死が起こる。一方、不適当なTCR刺激によるT細胞死ではFasが関与しないことが報告されていたが、caspasesが関与するか否かは明らかではない。当教室で樹立したCD 9分子に対する単クローン抗体と抗TCR（抗CD 3）抗体でT細胞を共刺激した場合、T細胞は一旦は強く活性化されるが速かにアポトーシスに陥ること、即ち、不適当なTCR刺激によるアポトーシスの誘導が明らかになった。そこで、本研究はCD 3分子と共にCD 9分子を刺激した場合に惹起されるアポトーシスに、Fas－FasLの相互作用が関与するか、且つcaspase 3－like proteaseが働いているか否かを検討した。その結果、CD 9副刺激による細胞死では、AICDの場合と異なりFas－FasL相互作用が関与しなかった。また、CD 9副刺激による細胞死ではcaspase 3－like proteaseが活性化されなかったが、caspase阻害剤であるZVAD－fmk、BD－fmkで細胞死が抑制された。本研究はCD 9副刺激による細胞死では、AICDで働くcaspase 3は関与しないが、それとは異なる未知のcysteine protease（caspase）によって細胞死が起こること、即ち、新しいT細胞死のメカニズムを明らかにした。

以上、本研究はT細胞における新しいT細胞死経路の存在を示唆することによって生物学的に重要な知見を提供するものであり、学位の授与に値すると考えられる。