



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, 曾爽
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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	朴 曾 爽
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 3 2 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/CD9-Costimulated, Naive T cells and TCR- Restimulated, Activated T Cells (Naive T 細胞のTCR/CD9 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 濱岡 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 CD9 分子に対する単クローン抗体と抗 TCR (抗 CD3) 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 CD3 分子と共に CD9 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 CD3 抗体と抗 CD9 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 CD3 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、CD3/CD9 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 CD3 抗体で刺激された ConA blast と同様に、CD9 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、CD9 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、CD9 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 CD9 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 CD9 副刺激による細胞死が惹起された。これらの結果より、CD9 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。