

Title	CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+ CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage
Author(s)	周, 旭宇
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42637">https://hdl.handle.net/11094/42637</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	しゅう きょく う 周 旭 宇
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 0 3 6 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	CD 5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage (CD5 副刺激は CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> 胸腺細胞における ERK MAP キナーゼ活性化シグナルを増強し、CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> 細胞への分化を支持する)
論文審査委員	(主査) 教 授 濱 岡 利 之  (副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 宮 坂 昌 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

CD 5 はすべての T 細胞に発現しており、末梢 T 細胞における活性化に際して副刺激分子として機能する。一方、CD 5 欠損マウス由来胸腺細胞では TCR 刺激による Ca<sup>2+</sup> 応答、増殖反応が wild-type マウスのそれより強く惹起されることより、CD 5 は胸腺細胞において TCR からのシグナルを negative に制御することが示唆された。ここで CD 5 からのシグナルが、果たして胸腺細胞の分化、生存等のすべての事象に negative な effect を与えているのかどうかという疑問が生じた。本研究は CD 5 による副刺激が胸腺細胞の機能動態にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

#### 【方法および成績】

BALB/c マウスの胸腺細胞を biotin 化した抗 CD 3 と抗 CD 5 抗体で処理し、Avidin を用いて架橋刺激を与えた。細胞を溶解後、可溶性蛋白画分を種々の signal 伝達分子の抗体で免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体でリン酸化状態の解析を行った。ERK MAP キナーゼ活性化は抗リン酸化 ERK 抗体で western blot により検出した。細胞内の Ca<sup>2+</sup> influx は Fura 2-AM で標識した細胞を用いて測定した。CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup> double positive (DP) 細胞は、抗 CD 8 mAb を用いて panning 又は positive selection により調製した。各細胞の表面抗原は FACS により解析した。

(1)胸腺細胞を抗 CD 3 / CD 5 抗体で共架橋すると、抗 CD 3 単独架橋に比し、LAT のチロシンリン酸化が増強した。(2)LAT がリン酸化すると、二つの branch の TCR シグナル経路が作動する。一つは LAT-PLC  $\gamma$ -Ca<sup>2+</sup> 応答経路である。CD 5 共架橋により PLC  $\gamma$  の LAT への結合が増強し、更に PLC  $\gamma$  のリン酸化が増強された。しかし PLC  $\gamma$  の活性化によって惹起される Ca<sup>2+</sup> influx は抑制された。(3)もう一方の LAT-Grb 2-Ras-ERK につながるシグナル経路では、CD 5 共架橋により Grb 2 の LAT への結合は増強し、更にその下流の ERK のリン酸化の亢進が誘導された。(4)ERK 活性化は CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup> (DP) 胸腺細胞から CD 4 single-positive (SP) 細胞への分化に重要であることが報告されている。CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup> (DP) 胸腺細胞は抗 CD 3 / CD 5 で共架橋された48時間後に、CD 4 lineage (CD 4<sup>int</sup>CD 8<sup>-</sup>CD 69<sup>+</sup>) の細胞に分化したことより、CD 5 は胸腺細胞の分化を positive に制御出来ることがわかった。(5)ERK の inhibitor PD98059は無刺激の DP 細胞には何ら影響を及ぼさなかった。一方、抗 CD 3 / CD 5 共架橋により分化を始めた DP 細胞の生存を著明に抑制した。(6)また、抗 CD 3 / CD 5 で共架橋すると Bcl-

2 の発現が抗 CD 3 抗体単独架橋に比べて増強したが、PD98059 処理によりこの増強は抑制された。従って胸腺細胞においては、CD 5 engagement は ERK への TCR シグナルを増強させ、ERK から更に Bcl-2 蛋白の誘導につながり、CD 4 へ分化途上の胸腺細胞の生存に貢献していると考えられる。

#### 【総括】

以上、胸腺細胞においても CD 5 共架橋により、末梢 T 細胞同様に LAT の強いチロシンリン酸化が誘導された。胸腺細胞の CD 5 は TCR signaling における  $Ca^{2+}$  応答を抑制するという negative regulator の側面を持つが、本研究により、同時に TCR signaling における ERK の活性化を増強し、これにより Bcl-2 蛋白の発現を増強し、胸腺細胞の DP から SP への分化を支持する重要な役割を有することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

CD 5 はすべての T 細胞に発現しており、末梢 T 細胞における活性化に際して副刺激分子として機能する。一方、CD 5 欠損マウス由来胸腺細胞では TCR 刺激による  $Ca^{2+}$  応答、増殖反応が wild-type マウスのそれより強く惹起されることより、CD 5 は胸腺細胞において TCR からのシグナルを negative に制御することが示唆された。本研究では、CD 5 による副刺激が胸腺細胞の機能動態にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

その結果、胸腺細胞においても CD 5 共架橋により、末梢 T 細胞同様に LAT の強いチロシンリン酸化が誘導された。胸腺細胞の CD 5 は末梢 T 細胞と異なり、結合した Cbl を介して、PLC  $\gamma$  の活性化を抑制し、 $Ca^{2+}$  応答を抑制することが明らかになった。一方、胸腺細胞に CD 5 副刺激を与えると、TCR signaling における ERK の活性化を増強した。ERK の活性化は胸腺細胞の CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>-</sup> (CD 4 SP) 細胞への分化に重要であることが示唆されているが、CD 5 副刺激によって、CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup> (DP) 細胞から CD 4 SP 細胞への分化を誘導することが明らかになった。ERK の活性化に続いて、Bcl-2 蛋白の発現が増強し、分化を始めた DP 細胞の生存が維持されることを明らかにした。

以上より、胸腺細胞の CD 5 は TCR signaling における  $Ca^{2+}$  の応答を抑制するという negative regulator の側面を持つが、同時に TCR signaling における ERK の活性化を増強し、胸腺細胞の DP から SP への分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究は胸腺細胞の DP から CD 4 SP への分化につい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。