

Title	ヘルパーT細胞の活性化・分化におけるPKA経路の役割
Author(s)	常世田, 好司
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43350
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	常世田好司
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16960 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	ヘルパーT細胞の活性化・分化における PKA 経路の役割
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 土井 健史

論文内容の要旨

近年免疫系、神経系の両系が、共通の情報伝達物質、またその受容体を介して、それぞれの系だけでなく系相互間で情報を伝達しあっていることがわかってきている。その1つとして神経ペプチドは、神経系、内分泌系、免疫系間の情報伝達を調節する重要な役割を果たしている。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は37アミノ酸からなる神経ペプチドで、中枢神経系や末梢神経系で発現し、強力な血管弛緩作用を持つことが知られている。また CGRP とその受容体は神経組織の他に胸腺や脾臓などのリンパ組織に分布していることが報告されている。CGRP は胸腺細胞の生存やマイトジェンで刺激した脾細胞の増殖能活性化を阻害することが知られている。CGRP は受容体の下流シグナルとしてGタンパク質を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、さらに PKA の活性化を誘導する。また免疫系においてヘルパーT細胞はサイトカイン産生パターンから Th1、Th2の2つに分けられる。Th1細胞は IL-2、IFN γ を産生し、移植片拒絶反応や自己免疫疾患などに関与し、Th2細胞は IL-4、IL-5を産生し、寄生虫感染やアレルギー反応に関与している。

本研究の目的の1つは PKA を活性化させると考えられる CGRP がヘルパーT細胞の活性化や分化にどのような影響を及ぼすのかについてである。もう1つはヘルパーT細胞の活性化で上昇する PKA 活性が、ヘルパーT細胞の活性化や分化においてどのような役割を持っているかについてである。これら2つのアプローチにより検討することでヘルパーT細胞における PKA の役割を解明しようと試みた。

まず CGRP 刺激がヘルパーT細胞からのサイトカイン産生にどのような効果を持つのかを調べるため、IL-2や IL-4、IFN γ の産生量の変化について検討した。ヘルパーT細胞を抗 CD3抗体のみ、または抗 CD3抗体と抗 CD28抗体で刺激した結果、CD3単独刺激では CGRP は1nM という低濃度でも各サイトカイン産生をすべて抑制したが、CD28からの刺激が入ることによって IL-2や IFN γ の産生パターンは CD3単独刺激時と同様に抑制傾向にあったが、IL-4産生は促進していた。このことから CD28からの補助刺激の存在が CGRP による IL-4産生への効果を大きく決めていることがわかった。CD28からの補助刺激が生体内での活性化をより正確に反映していることから、生体内において CGRP がこのようなサイトカイン産生の特異性を持って作用していることがわかった。

CGRP 受容体の下流シグナル伝達因子として最も有名なものに cAMP の産生がある。そこで cAMP の膜透過性アナログである dibutyryl-cAMP が CGRP と同様に IL-4産生に作用するのかを検討したところ、容量依存的に IL-4産生が CD3単独刺激では抑制、CD3/CD28共刺激では促進されることがわかった。このことから CGRP 受容体の下流シ

グナルとして cAMP の活性化が IL-4 産生の制御に重要であることがわかった。次に CD3/CD28 共刺激が、CGRP 添加による細胞内 cAMP 濃度の上昇をどのように変化させるのかについて調べた。その結果、CGRP 刺激だけでなく、CD3/CD28 共刺激においても同様に cAMP の産生が認められた。また CD3/CD28 と CGRP の両方で刺激すると、cAMP 産生量は相加的に上昇した。この現象は、cAMP のターゲットである PKA の活性化についても同様であった。

そこで CD3/CD28 共刺激時の PKA の活性化を阻害することによって IL-4 産生に何か影響を及ぼすのか検討した。その結果、CD3 刺激時には阻害剤の効果は見られないが CD3/CD28 共刺激時には阻害剤で顕著な抑制が見られた。この結果より CD3/CD28 共刺激時における cAMP-PKA 経路の活性化は、IL-4 産生促進において非常に重要な要因であることがわかった。

次にヘルパー T 細胞内のシグナル伝達経路において PKA から IL-4 産生までの過程を解析した。CD28 を高発現させた Jurkat 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより T 細胞活性化に関与するシグナル伝達経路の活性を調べた。その結果、IL-4 産生パターンと同様に CD3/CD28 共刺激時に cAMP による顕著な活性化が認められた伝達分子は NF-AT であった。また CD3 刺激時は PKA 阻害剤を添加しても NF-AT の活性に変化は認められないが、CD3/CD28 共刺激時において PKA を阻害すると NF-AT の活性は抑制された。以上の結果より、cAMP-PKA 経路の下流に NF-AT が存在していることがわかった。IL-4 産生には NF-AT の活性化が非常に重要であり依存性も高いことが知られている。このことから cAMP-PKA 経路により活性化された NF-AT によって IL-4 産生の増強が見られたと考えられる。

次に IL-4 産生を促進させる cAMP 産生が Th1/Th2 分化に関わっていないか検討した。その結果、CD3 刺激に比べて CD3/CD28 共刺激の方が約 5 倍 Th2 に分化している割合が高くなっていった。この CD3/CD28 共刺激に PKA 阻害剤、H89 を添加すると Th2 分化が大きく抑制され、CGRP を添加すると Th2 分化は有意に促進された。

結論として、1 つ目はヘルパー T 細胞の活性化において CGRP もしくは cAMP は IL-4 産生を CD3 単独刺激時には抑制させたが、CD3/CD28 共刺激時には cAMP-PKA-NF-AT という経路を介して促進させた。また 2 つ目として、CD3/CD28 共刺激による Th2 分化の促進も cAMP-PKA 経路の活性化を介していて、cAMP を産生させる CGRP はさらに Th2 分化を促進させることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

近年免疫系と神経系が、共通の情報伝達物質やその受容体を介して、相互に関係しあうことがわかってきた。中でも神経ペプチドは、神経系と免疫系間の情報伝達を調節する分子として興味を持たれている。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は中枢神経系や末梢神経系に発現し、強力な血管弛緩作用を持つ。また CGRP とその受容体は神経組織の他に胸腺や脾臓などのリンパ組織に分布していることが報告されている。CGRP はリンパ球の増殖・活性化を阻害することが知られているがその詳細は明らかではない。そこで T 細胞活性化における CGRP の生物活性について検討した。

- (1) T 細胞を抗 CD 3 抗体、または抗 CD 3 /CD28 抗体で刺激したところ、CGRP は前者では種々サイトカイン産生を抑制したが、後者では IL-4 産生を著明に促進した。
- (2) CGRP 受容体の下流シグナルとして cAMP 産生がある。dbcAMP は、容量依存的に IL-4 産生を CD 3 単独刺激では抑制、CD 3 /CD28 共刺激では促進した。
- (3) CGRP 刺激だけでなく、CD 3 /CD28 共刺激でも細胞内 cAMP 濃度は上昇した。
- (4) この現象は、cAMP のターゲットである PKA の活性化でも確認できた。
- (5) PKA 阻害剤は、CD 3 /CD28 共刺激時の IL-4 産生を抑制した。
- (6) CD28 を高発現させた Jurkat 細胞を用いた luciferase assay で、CD 3 /CD28 共刺激時には NF-AT が活性化され、また PKA 阻害剤は NF-AT 活性を抑制した。
- (7) CD 3 /CD28 共刺激時に CGRP を添加すると Th 2 分化は有意に促進され、PKA 阻害剤を添加すると Th 2 分化が

大きく抑制された。すなわち、cAMP-PKA 経路の下流に NF-AT が存在していることがわかった。

IL-4産生には NF-AT の活性化が非常に重要であり依存性も高いことが知られている。以上の結果を総合して、CGRP-cAMP-PKA 経路により活性化された NF-AT によって IL-4産生の増強が誘導されたと考えられる。これらの成果は、T細胞活性化における cAMP-PKA 経路の重要性を明らかにしただけでなく、気管支喘息を始めとした種々のアレルギー性疾患の発症と増悪が、免疫系のみならず神経ペプチドによって調節される可能性を分子レベルで明らかにしたものであり、新しい医薬品開発に貴重な貢献をすと思われ、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。