

Title	Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN- $\gamma$ production induced by IL-12 alone or together with IL-18
Author(s)	杉本, 直俊
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43888">https://hdl.handle.net/11094/43888</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	杉本直俊
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17636 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN- $\gamma$ production induced by IL-12 alone or together with IL-18 (IL-12 又は [IL-12+IL-18] 共刺激による T 細胞増殖及び IFN- $\gamma$ 産生誘導における JAK2 と TYK2 の役割の差異)
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

IL-12 の生物活性には①増殖応答、②IFN- $\gamma$  産生の二つがある。IFN- $\gamma$  産生は、IL-12 単独でも誘導されるが、IL-18 との共刺激によって著明に増強される。その相乗効果機構の一つとして、以前に我々は、IL-12 刺激により活性化される STAT4 と、IL-18 により活性化される AP-1 が協調して働く事を報告してきた。IL-12 レセプターが刺激されると、二つの JAK キナーゼ (TYK2 と JAK2) が活性化され、JAK-STAT 経路を通して生物活性を発現する。しかしそれぞれの JAK キナーゼがどの STAT を活性化して T 細胞の増殖応答、IFN- $\gamma$  発現に関与するかは不明であった。そこで本研究では、TYK2 と JAK2 それぞれに対する選択的阻害剤を用いて、T 細胞増殖および IFN- $\gamma$  発現に至るシグナル伝達を解析した。

#### 【方法】

細胞は IL-12、IL-18 に反応できるマウス Th1 クローン 2D6 を用いた。TYK2、JAK2 それぞれに対する選択的阻害剤として Tyrphostin A1 と B42 を用いた。IL-12 誘導性増殖応答は $^3\text{H}$ -TdR uptake を用いた。IFN- $\gamma$  産生の定量には ELISA 法を用いた。各転写因子の DNA への結合は EMSA により検討した。遺伝子活性化能については、マウス IFN- $\gamma$  プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターを用いて解析した。

#### 【成績】

(1)2D6 は、IL-12 刺激により STAT4、STAT5 のリン酸化を強く発現する。TYK2 阻害剤 Tyrphostin A1 (以下 A1) は STAT4 の、JAK2 阻害剤 Tyrphostin B42 (以下 B42) は STAT5 のリン酸化をそれぞれ選択的に阻害した。以上より TYK2 は STAT4 を、JAK2 は STAT5 をそれぞれ活性化する事が示唆された。(2)IL-12 誘導性増殖応答は、A1 では高濃度でも阻害されなかったが、B42 は濃度依存的に増殖応答を阻害した。一般的に細胞増殖に関係しているといわれる *c-myc* の発現も、B42 で選択的に阻害された。即ち、B42 は IL-12 誘導性 STAT5 活性化、*c-myc* 発現誘導を選択的に阻害する事により 2D6 細胞の増殖を抑制する事が示唆された。(3)IL-12 単独刺激誘導性 IFN- $\gamma$  産生は、B42 投与群では阻害されなかったが、A1 により濃度依存的にその産生が阻害された。また、[IL-12+IL-18] 共刺激における相乗的な IFN- $\gamma$  産生も A1 により選択的に阻害された。しかし A1 は、IL-18 誘導性の JNK 活性化に対す

る阻害作用を示さなかった。このことより、A1 は IL-18 シグナルではなく、IL-12 シグナルに作用して [12+18] の相乗的な IFN- $\gamma$  産生を阻害したと考えられた。(4) [12+18] 共刺激による相乗的な IFN- $\gamma$  産生のメカニズムとして、以前に我々は「IL-18 によって活性化される AP-1 は IFN- $\gamma$  転写因子として最重要である。しかし、その AP-1 binding activity の増強には、AP-1 の main component である c-Jun のリン酸化だけでは不十分であり、IL-12 によって活性化される STAT4 との会合が必須である。」ことを報告してきた。そこで今回、[12+18] 共刺激により上昇した AP-1 binding activity に対する各阻害剤の効果を EMSA により検討した。すると [12+18] 共刺激でのみ認められた高い AP-1 binding activity は、A1 処理により選択的に阻害された。(5)次に [IL-12+IL-18] 共刺激による相乗的な IFN- $\gamma$  プロモーターの転写活性に対する各阻害剤の効果を Reporter gene assay 法を用いて検討した。すると、[12+18] 共刺激による相乗的な IFN- $\gamma$  プロモーターの転写活性化は、A1 処理により著明に阻害された。これらのことより、A1 は [12+18] により誘導される AP-1 binding activity の上昇を阻害し、その結果として、相乗的な IFN- $\gamma$  転写活性化をも抑制する事が示唆された。(6)Primary activated T cell を用いた実験でも、2D6 と同様、[IL-12+IL-18] 共刺激により上昇した AP-1 binding activity は A1 投与で選択的に阻害された。

#### 【総括】

IL-12 シグナルにおいて、①JAK2 は STAT5 を活性化し、c-Myc を誘導することにより増殖応答に関与すること、②TYK2 は STAT4 を活性化し、IL-12 単独及び [IL-12+IL-18] 共刺激による IFN- $\gamma$  産生に寄与することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

IL-12 の生物活性には増殖応答、IFN- $\gamma$  産生の二つがある。IFN- $\gamma$  産生は IL-12 単独でも誘導されるが、IL-18 との共刺激によって著明に増強される。IL-12 刺激により二つの JAK キナーゼ (TYK2 と JAK2) が活性化されるが、それらの IL-12 の生物活性発現への関与のメカニズムは不明であった。そこで本研究では、TYK2 と JAK2 それぞれに対する阻害剤を用いて、T 細胞増殖および IFN- $\gamma$  発現に至るシグナル伝達について検討し、以下の結果を得た。

(1)JAK2 阻害剤は IL-12 刺激誘導性 T 細胞増殖応答と共に、c-Myc 発現及び STAT5 リン酸化を抑制した。(2)逆に IL-12 誘導性 IFN- $\gamma$  産生、STAT4 リン酸化は TYK2 阻害剤により抑制された。(3)IL-18 は AP-1 を誘導し高レベルの IFN- $\gamma$  遺伝子プロモーター活性を示すが、これには c-Jun と IL-12 によって活性化された STAT4 との会合が必須である。TYK2 阻害剤は STAT4 リン酸化を阻害することによって [IL-12+IL-18] 共刺激による相乗的な IFN- $\gamma$  プロモーター活性化をも抑制した。

以上より、本研究は IL-12 の生物活性における JAK2 と TYK2 の役割分担を明らかにするという重要な知見を提供するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。