

Title	Dynamic regulation of T cells via core fucosylation is a novel mechanism involved in the onset of inflammatory bowel disease
Author(s)	藤井, 宏修
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55777
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏 名 (藤 井 宏 修)	
論文題名	Dynamic regulation of T cells via core fucosylation is a novel mechanism involved in the onset of inflammatory bowel disease (コアフコースを介したT細胞の活性化制御による炎症性腸疾患の発症機構)
論文内容の要旨	
[背 景 ・ 目 的]	
<p>炎症性腸疾患 (IBD; Inflammatory Bowel Disease) とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、腸管に慢性・再発性に炎症を引き起こす原因不明の難病であり、免疫学的な異常が関与していると考えられている。近年 IBD と糖鎖に関する報告が多数されており、これまで先行研究により、IgG のガラクトース欠損が IBD の病態を示すバイオマーカーになることを見出し (Am J Gastroenterol. 2008) た。そして私は博士前期課程の研究として、その糖鎖構造変化が B 細胞とマクロファージの相互作用を介して腸炎発症に影響を及ぼす機序を明らかにした (Gastroenterology. 2012)。近年免疫や腸管における感染防御とフコースとの関連が着目されている。数あるフコースの結合様式の中で、N 型糖鎖の根元の N-アセチルグルコサミンに付加されるフコースをコアフコースといい、α 1-6 フコース転移酵素 (Fut8) のみがコアフコースの付加に関わることが知られている。コアフコースは免疫と非常に関係が深い糖鎖であることが近年報告されているが、その詳細については不明な点が多い。以上の背景から、腸管炎症におけるコアフコースの病態生理学的意義に関して検討することを本研究の目的とした。</p>	
[方 法]	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 野生型 (WT) マウスに対して、T 細胞を介した腸炎モデルである TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid) 腸炎を作成し、腸炎時の免疫細胞のコアフコースがどのように変化するかを検討した。 2. クローン病 (Crohn's Disease, CD) 患者の生検組織において、腸管炎症部・非炎症部における <i>FUT8</i> の遺伝子発現を定量 RT-PCR にて、また CD3 陽性 T 細胞のコアフコース発現を免疫組織化学染色によって検討した。 3. WT マウス、Fut8 KO マウスに TNBS 腸炎を作成し、腸炎の程度を比較検討した。さらに、WT マウスおよび Fut8 KO マウス由来のナイーブ T 細胞を Rag2 KO マウスに移入する腸炎モデルを作成し、コアフコースが T 細胞に与える影響を検討した。 4. WT、Fut8 KO マウスの脾細胞より CD4 陽性 T 細胞を分離し、T 細胞を活性化させる刺激である、抗 CD3/28 抗体を用いた刺激を行い、細胞増殖・シグナル伝達・サイトカイン産生に関して検討した。 	
[結 果]	
<p>WT マウスに TNBS 腸炎を誘導させると脾細胞単核球のコアフコースが劇的に増加した。詳細な検討の結果、脾細胞単核球の中でも特に CD4 陽性 T 細胞のコアフコースが増加していることがわかった。また、実際の CD 患者の生検組織において、非炎症部に比べて炎症部において <i>FUT8</i> の遺伝子発現が有意に亢進し、炎症部において CD3 陽性 T 細胞のコアフコースが増加していることもわかった。以上のことから腸管炎症が起こると T 細胞のコアフコースが増加することがわかった。</p> <p>腸管炎症時の T 細胞におけるコアフコースの増加が、どのような生物学的意義を持つのかをさらに検討するために、WT マウス、Fut8 KO マウスに TNBS 腸炎を誘導し、腸炎の度合いを比較検討した。すると Fut8 KO マウスでは WT マウスに比べ体重減少率が低く、組織学的炎症所見も軽微であり、炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていた。<i>In vivo</i> においてより T 細胞特異的な反応を見るために、続いて WT マウス、Fut8 KO マウスより採取したナイーブ T 細胞を Rag2 KO マウスに移入し、腸炎の程度を比較検討した。WT マウス由来の T 細胞を移入したマウスに比べて、Fut8</p>	

KO マウス由来の T 細胞を移入した群において体重減少率が低く、腸炎が軽減されていることがわかった。そこで、WT、Fut8 KO マウスより CD4 陽性 T 細胞を分離し、抗 CD3/28 抗体刺激を行ったところ、WT マウス由来の T 細胞に比べ、Fut8 KO マウス由来の T 細胞は細胞増殖や p38・JNK のリン酸化、NF- κ B の核内移行が有意に抑制されていた。また Th1 型サイトカイン (IL-2・IFN- γ)・Th2 型サイトカイン (IL-4・IL-13・IL-10) の産生が共に有意に低下していた。以上の結果より、Fut8 KO マウス由来の T 細胞において活性化が低下していることが明らかとなった。

さらに、Fut8 KO マウスの T 細胞において活性化が低下するメカニズムを明らかにするために、T 細胞の活性化に重要とされている raft と呼ばれる細胞表面上に存在するコンパートメントに着目して検討を行った。その結果、WT マウス由来の T 細胞は活性化されると TCR (T cell receptor) 関連分子が raft へと移行するが、Fut8 KO マウス由来の T 細胞は T 細胞活性化時の raft への TCR 関連分子の移行が低下していた。

[考 察]

今回の検討により Fut8 KO マウス由来の T 細胞は活性化が低下しており、その結果 T 細胞を介した腸炎が抑制されることが示された。さらに、Fut8 KO マウス由来の T 細胞において活性化が低下するメカニズムとして、TCR 関連分子の raft への移行が低下していることが明らかとなった。糖鎖はタンパク質の輸送を規定していることが知られており、我々の研究室において、肝細胞中のフコシル化タンパク質が選択的に胆管へと輸送されることを見出している (J Biol Chem. 2006)。また、raft に豊富に存在する GPI アンカー型のタンパク質の糖鎖が変わることにより、タンパク質の輸送が変わるという報告もある (Cell. 2009)。以上より、Fut8 KO マウス由来の T 細胞において、TCR 関連タンパク質のコアフコースが欠損することにより、T 細胞刺激時の TCR 関連タンパク質の raft への移行が障害され、その結果 T 細胞の活性化が低下したのではないかと考えられる。コアフコースは、その構造上問題から疎水性が高い糖鎖と言える。Raft は非常に脂質に富んだ疎水性の分画であることから、Fut8 KO マウス由来の T 細胞においてコアフコースを欠損した TCR 関連タンパク質が親水性に傾くことにより、raft への移行が障害されている可能性がある。まさにこの現象が、Fut8 KO マウス T 細胞の活性化低下をきたすメカニズムの 1 つと考えられる。患者検体を用いた検討において、CD 患者の腸管炎症局所において T 細胞のコアフコースが増加しており、コアフコースを介した T 細胞の免疫制御は実際のヒトの疾患でも証明された。IBD を完治させる治療法は確立されていない現代医療の中で、コアフコースは新たな治療の標的になるかもしれない。

[結 論]

炎症性腸疾患で増加する T 細胞上のコアフコースは TCR シグナル活性化を介して腸炎発症に関与する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤 井 宏 修)		
	(職)	氏 名
論文審査担 当者	主 査	教授 三善 英知
	副 査	教授 山本 浩文
	副 査	寄附講座教授 尾路 祐介

論文審査の結果の要旨

本研究は、難病である炎症性腸疾患と糖鎖の関係性を、コアフコースとT細胞の関係性に着目し検討した糖鎖疾患生物学の基礎的な研究である。論文の概要は下記の通りである。

炎症性腸疾患 (IBD; Inflammatory Bowel Disease) とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、腸管に慢性・再発性に炎症を引き起こす原因不明の難病であり、免疫学的な異常が関与していると考えられている。近年 IBD と糖鎖に関する報告が多数されており、近年免疫や腸管における感染防御とフコースとの関連が着目されている。数あるフコースの結合様式の中で、N型糖鎖の根元の N-アセチルグルコサミンに付加されるフコースをコアフコースといい、 α 1-6 フコース転移酵素 (Fut8) のみがコアフコースの付加に関わることが知られている。コアフコースは免疫と非常に関係が深い糖鎖であることが近年報告されているが、その詳細については不明な点が多い。以上の背景から、腸管炎症におけるコアフコースの病態生理学的意義に関して検討した。

WT マウスに TNBS 腸炎を誘導させると脾細胞単核球のコアフコースが劇的に増加した。詳細な検討の結果、脾細胞単核球の中でも特に CD4 陽性 T 細胞のコアフコースが増加していることがわかった。また、実際の CD 患者の生検組織において、非炎症部に比べて炎症部において *FUT8* の遺伝子発現が有意に亢進し、炎症部において CD3 陽性 T 細胞のコアフコースが増加していることもわかった。以上のことから腸管炎症が起こると T 細胞のコアフコースが増加することがわかった。腸管炎症時の T 細胞におけるコアフコースの増加が、どのような生物学的意義を持つのかをさらに検討するために、WT マウス、Fut8 KO マウスに TNBS 腸炎を誘導し、腸炎の度合いを比較検討した。すると Fut8 KO マウスでは WT マウスに比べて体重減少率が低く、組織学的炎症所見も軽微であり、炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていた。In vivo においてより T 細胞特異的な反応を見るために、続いて WT マウス、Fut8 KO マウスより採取したナイーブ T 細胞を Rag2 KO マウスに移入し、腸炎の程度を比較検討した。WT マウス由来の T 細胞を移入したマウスに比べて、Fut8 KO マウス由来の T 細胞を移入した群において体重減少率が低く、腸炎が軽減されていることがわかった。そこで、WT、Fut8 KO マウスより CD4 陽性 T 細胞を分離し、抗 CD3/28 抗体刺激を行ったところ、WT マウス由来の T 細胞に比べ、Fut8 KO マウス由来の T 細胞は細胞増殖や p38・JNK のリン酸化、NF- κ B の核内移行が有意に抑制されていた。また Th1 型サイトカイン (IL-2・IFN- γ)・Th2 型サイトカイン (IL-4・IL-13・IL-10) の産生が共に有意に低下していた。以上の結果より、Fut8 KO マウス由来の T 細胞において活性化が低下していることが明らかとなった。

さらに、Fut8 KO マウスの T 細胞において活性化が低下するメカニズムを明らかにするために、T 細胞の活性化に重要とされている raft と呼ばれる細胞表面上に存在するコンパートメントに着目して検討を行った。その結果、WT マウス由来の T 細胞は活性化されると TCR (T cell receptor) 関連分子が raft へと移行するが、Fut8 KO マウス由来の T 細胞は T 細胞活性化時の raft への TCR 関連分子の移行が低下していた。

本研究により Fut8 KO マウス由来の T 細胞は活性化が低下しており、その結果 T 細胞を介した腸炎が抑制されることが示された。さらに、Fut8 KO マウス由来の T 細胞において活性化が低下するメカニズムとして、TCR 関連分子の raft への移行が低下していることが明らかとなった。患者検体を用いた検討において、CD 患者の腸管炎症局所において T 細胞のコアコースが増加しており、コアコースを介した T 細胞の免疫制御は実際のヒトの疾患でも証明された。IBD を完治させる治療法は確立されていない現代医療の中で、コアコースは新たな治療の標的になる可能性がある。

以上のように本研究の科学的価値は高く、学位授与に値する内容であると認める。