



INHIBITION OF TYROSINE PHOSPHORYLATION PREVENTS IFN- γ -INDUCED HLA-DR MOLECULE EXPRESSION

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 龍, 慶子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1423

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 146号	学位授与年月日	平成 5年 3月 9日
氏名	龍 慶子		
論文題目	INHIBITION OF TYROSINE PHOSPHORYLATION PREVENTS IFN- γ -INDUCED HLA-DR MOLECULE EXPRESSION (インターフェロン(IFN)- γ による HLA-DR 抗原分子の発現誘導はチロシンリン酸化を阻害することにより抑制される)		

医学博士 龍 慶 子

論文題目

INHIBITION OF TYROSINE PHOSPHORYLATION PREVENTS IFN- γ -INDUCED
HLA-DR MOLECULE EXPRESSION

(インターフェロン (IFN)- γ による HLA-DR 抗原分子の発現誘導はチロシンリン酸化を
阻害することにより抑制される)

論文の内容の要旨

主要組織適合抗原のクラス II 抗原は、ヘルパー T 細胞の抗原認識において抗原提示分子として働き、免疫応答において重要な役割を果たしている。中枢神経系のグリオーマ細胞株 T98G は、インターフェロン (IFN)- γ の刺激によりクラス II 抗原を誘導的に発現する。我々はこれまで、この IFN- γ によるクラス II 抗原発現誘導に関与する細胞内情報伝達機構を検討し、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化と細胞内 Ca イオンレベルの上昇がこれに関与することを明らかにした。本研究では、この情報伝達系には更に、チロシンキナーゼ (TPK) が関与することを、三種の TPK 阻害剤 (genistein, herbimycin A, typhostin) の使用と、細胞内基質のチロシンリン酸化により証明した。更にこの情報伝達系における TPK の役割についても検討した。

(材料と方法) 1) 細胞株：グリオーマ細胞株 T98G を用いた。2) TPK 阻害剤：三種の TPK 阻害剤 (genistein, herbimycin A, typhostin) を用いた。これらで細胞を前処置した後 IFN- γ (10⁶U/ml) で刺激し、HLA-DR 抗原の発現をこれに対する単クローン抗体を用い flow cytometry にて検出した。3) phorbol myristate acetate (PMA) 及び A23187：PKC を直接活性化する PMA とカルシウムイオノフォア A23187 の併用により HLA-DR 抗原を発現させた。4) Immunoblotting：IFN- γ によって惹起される細胞内基質のチロシンリン酸化を抗リン酸化チロシン単クローン抗体を用い、immunoblotting により検出した。5) PKC 活性：細胞を膜及び細胞質分画に分け、それぞれの PKC 活性を、PKC 特異的合成基質に対するリン酸化能で検討した。6) 細胞内 Ca イオン濃度：fura-2/AM を用い、Argus100/CA にて測定した。7) inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3)：Amersham Corp のキットを用いて測定した。

(結果と考察) 三種の TPK 阻害剤は、いずれも IFN- γ による DR 抗原発現を濃度依存的に抑制した。又、IFN- γ により細胞内基質のチロシン残基のリン酸化が誘導され、genistein はこのリン酸化を抑制した。以上より、IFN- γ による DR 抗原発現誘導の細胞内情報伝達には PKC に加えて TPK が関与することが判明した。又、これら三種の TPK 阻害剤は、PMA による PKC の活性化に全く影響を与えなかったことから、これら三種の阻害剤は非特異的に PKC を抑制することによって DR 抗原発現を抑制しているのではないことが判明した。次に、この TPK の活性化と PKC の活性化及び、細胞内 Ca イオン濃度の上昇

がどの様に連鎖しているかを検討した。IFN- γ 添加により細胞内 Ca イオンの急激な上昇と IP3 の産生が認められたが、genistein はこれらを完全に抑制した。さらに、三種の TPK 阻害剤は PMA とカルシウムイオンフォア A23187 で誘導される DR 抗原発現を阻止することができなかった。これらの結果より TPK の作用点はホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転の上流に位置することが判明した。つまり、他の研究結果から推察すると、TPK によるホスホリパーゼのリン酸化はこれらを活性化し、PI 代謝回転を亢進し、PKC を活性化すると考えられる。以上の結果及び IFN- γ レセプターの細胞内領域には TPK 領域が認められないことから、TPK 活性を持つ未知の分子が IFN- γ レセプターの細胞内領域に会合し、これが IFN- γ 刺激により活性化すると推察される。こうして活性化した TPK 分子は PKC を活性化し細胞内 Ca イオン濃度を上昇させ、最終的に HLA-DR 遺伝子の転写を惹起すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、インターフェロン γ (以下 IFN- γ) による HLA-DR 分子の発現においてチロシンのリン酸化がどのような役割を果たすかをチロシン特異的プロテインキナーゼ (TPK) に対する阻害剤を用いて調べたものである。

申請者らは以前にヒトの細胞株を用いて IFN- γ による HLA-DR の誘導がホスホイノシタイド (PI) 分解、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化、細胞内 Ca²⁺ の上昇をもたらすことを報告している。

細胞としては、本来 HLA-DR を発現していないヒトグリオブラストーマ細胞株 (T98G) を使用している。

申請者らを含めいくつかの研究室で PKC の活性化や細胞内 Ca²⁺ の増加が IFN- γ によるクラス II 分子の発現誘導に関与していることが示されてきた。ゲニステインは *Pseudomonas* の発酵液から得られるイソフラボン化合物であり、EGF 受容体、pp60^{v-src} のごとき TPK を特異的に阻害することが知られている。ハービマイシン A は *Streptomyces* の発酵液から得られ、チルホスチンは合成剤である。

今回、これら 3 種の作用機構を異にする TPK 阻害剤が IFN- γ 誘導の DR 発現を阻害したということは、チロシンのリン酸化がこの過程に関与していることを意味している。他方、ホルボールエステル (PMA) と A23187 は TPK 阻害剤と無関係に DR の発現を誘導する。このことは IFN- γ 刺激で始まる信号伝達が TPK の活性化 \rightarrow PKC の活性化の順序で起こることを示唆している。しかし、他の伝達系も完全には否定しえない。なぜなら、1. チロシンのリン酸化、イノシトール三リン酸 (IP3) の形成、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を完全に阻害する濃度の TPK 阻害剤も IFN- γ 誘導性の DR の発現を完全には阻害しえず、2. (PMA+A23187) による DR の誘導発現レベルは IFN- γ によるものより低いからである。

したがって、申請者らは非受容体型の TPK が IFN- γ 受容体と会合している可能性を考えている。すでに、そのような例 (TCR と fyn, CD4/CD8 と lck など) が知られている。

以上のような発表の経過中およびその後で本研究に関する以下のような質疑を行った。

1. 細胞生存率
2. TPK 阻害剤の実体及び性質について
3. TPK 阻害剤の濃度依存性
4. EPICS のデータの表示法
5. Fura-2は小胞体に入らないか
6. 細胞内 Ca^{2+} と細胞外 Ca^{2+} のどちらが DR 発現に重要か
7. 一度上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下する機構
8. (PMA+A23187) で誘導される DR 量と IFN- γ で誘導される DR 量が一致しない理由
9. ゲニステインの作用機構
10. IFN- γ 刺激後 IP3 がピークに達する時間について
11. PKC の膜への移動の機構
12. 本研究で用いた細胞の由来について
13. 本研究の目的について

これらの質疑に申請者はほぼ適切な解答を与えた。以上の発表及び質疑応答の結果から本論文は博士（医学）の授与にふさわしいものであると全員が一致して判断した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 植 村 研 一 副査 教授 瀧 川 雅 浩

副査 助教授 小 田 敏 明 副査 助教授 楯 村 春 彦