

REGULATION OF HLA CLASS II MOLECULE EXPRESSION BY INTERFERON- γ : THE SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM IN GLIOBLASTOMA CELL LINES.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 根津, 延和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/950

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	医博第 97号	学位授与年月日	平成 2年 3月26日
氏名	根津延和		
論文題目	REGULATION OF HLA CLASS II MOLECULE EXPRESSION BY INTERFERON- γ : THE SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM IN GLIOBLASTOMA CELL LINES. (インターフェロン γ によるHLAクラスII抗原の発現調節機構：グリオーマ細胞株における細胞内情報伝達機構)		

医学博士 根津延和
論文題目

REGULATION OF HLA CLASS II MOLECULE EXPRESSION
BY INTERFERON- γ : THE SIGNAL TRANSDUCTION
MECHANISM IN GLIOBLASTOMA CELL LINES.

(インターフェロン γ によるHLAクラスII抗原の発現調節機構: グリオーマ細胞株
における細胞内情報伝達機構)

論文の内容の要旨

主要組織適合抗原の中のクラスII抗原はヘルパーT細胞の抗原認識において拘束分子(抗原提示分子)として働き免疫応答において重要な位置を占めている。中枢神経系の細胞である星状細胞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。そして、このようにしてクラスII抗原を発現した星状細胞はT細胞に抗原提示細胞として働き中枢神経系における免疫応答に関与している。そこで、このIFN- γ によるクラスII抗原発現に関与するセカンドメッセンジャーについて glioblastoma T98G 及び A172 を用い検討した。

T98G 及び A172 細胞は IFN- γ 48 時間処理により DR、DQ、DP 抗原を発現した。更に、T98G 株では IFN- γ により DRA、DRB、DPA、DPB mRNA が発現し、これらの mRNA 発現は RNA ポリメラーゼ II の阻害剤であるアクチノマイシン D により抑制されることから転写レベルの制御を受けていることがわかった。その発現には新たな蛋白合成は必要としなかった。そこで、この DR、DP 抗原量を転写レベルで調節しているセカンドメッセンジャーを検討したところプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化と細胞質内 Ca^{++} レベルの上昇が関与していることが判明した。その理由は次の実験結果による。A) PKC について、(1) IFN- γ による DR、DP 抗原発現は PKC の阻害剤として知られる H-7 及びスタウロsporin により抑制された。(2) phorbol myristate acetate (PMA) 100 nM で 96 時間培養し予め RKC を枯渇させておくと、IFN- γ による DR、DP 抗原発現は抑制された。(3) IFN- γ 10^3 単位/ml で処理後、細胞を細胞膜、細胞質、核の 3 分画に分けると IFN- γ 処理 2 分後に PKC は細胞質より細胞膜へ移行、8 分後には元に復し、細胞質に戻った。(4) IFN- γ 10^3 単位/ml により inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) の産生がみられた。 IP_3 の産生は IFN- γ により phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) の加水分解が起こる事を示している。 PIP_2 の加水分解からは IP_3 と共に PKC を活性化させるジアシルグリセロールが産生されることが知られている。B) Ca^{++} について、(1) EGTA により培養液中の Ca^{++} をキレートすると DR、DP 抗原発現は抑制された。このことは、細胞外からの流入もクラスII抗原の発現に関与することを示唆する。そこで、これを確認するため、(2) IFN- γ による Ca^{++} の移動について (i) 細胞外からの流入、(ii) 細胞内カルシウム貯蔵オルガネラからの放出の 2 点について調べた。(i) に関して検討すると、IFN- γ 10^3 単位/ml により 15 秒後すでに $^{45}CaCl_2$ の流入が認められ漸次増加、さらに IFN- γ の濃度に依存性して増加した。次に、(ii) に関し、細胞内での Ca^{++} 放出を調べたところサポニン処理漏出細胞では IFN- γ 10^3 単位/ml 添加により直ちに放出が認められ約 7 分で 82.7% が放出された。これらより細胞内 Ca^{++} プール及び細胞外 Ca^{++} 流入により細胞質内 Ca^{++} 濃度の上昇が起こると考えられた。以上を裏づける結果として、PMA 単独、カルシウムイオノフォア A23187 単独では DR 抗原の発現は認められず、両者の組合せにより DR 抗原の発現が認められた。DP 抗原も PMA と A23187 の組合せにより発現が認められた。次に、この mRNA の転写調節をしている遺伝子配列について DPB 遺伝子 5' 上流域の 5' 及び 3' 欠損変異 DNA を用い CAT (chloramphenicol acetyl transferase) アッセイを行った。その結果 DPB 遺伝子 5' 上流域の 152-126 塩基が IFN- γ による DPB mRNA 発現にとって重要であることが判明した。

以上より、IFN- γ はそのレセプターを介して、PKC の活性化と細胞質内 Ca^{++} レベルの上昇を惹起し、既存の蛋白質をリン酸化する。その結果、DPB 遺伝子では上流-152~-126 に蛋白が直接又は間接(他の蛋白との結合又は修飾)に結合し、転写を促進させると考えられた。

論文審査の結果の要旨

T細胞に対する抗原提示機構において重要な役割を果たしている主要組織適合抗原のクラスⅡ抗原は、B細胞等では構成的に発現されているが、中枢神経系の星状神経膠細胞ではインターフェロン γ (IFN- γ)による誘導を受ける。そこで申請者は、グリオブラストーマT98GとA172 (前者は正常細胞に近く、後者は腫瘍性が強い)を用いて、このIFN- γ によるクラスⅡ抗原発現誘導に関与するセカンドメセンジャーの特定を試みた。これらの培養グリオブラストーマ細胞で発現されたクラスⅡ抗原は、DR抗原、DP抗原、DQ抗原にそれぞれ特異的な単クローン抗体を用いて流動細胞計測法 (flow cytometry)により、これらクラスⅡ抗原に対するmRNAはcDNAプローブを用いてRNAプロット解析により、プロテインキナーゼC (PKC)は単クローン抗体を用いてELISAにより測定された。得られた実験結果は以下のとおりである。

1. IFN- γ によるDRA、DRB、DPA、DPB mRNAの発現過程には新たな蛋白合成は関与していない。
2. IFN- γ によるこれらクラスⅡ抗原mRNAの発現のためには、PKCの活性化と細胞質のCa²⁺濃度の上昇の両者が必要である。Ca²⁺はCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの活性化以外の機構で作用するらしい。
3. IFN- γ の作用により細胞質から細胞膜へのPKCの移行とイノシトール1,4,5-トリリン酸(IP₃)の急速な生産がみられる。ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸からIP₃と共に生成するとされている1,2-ジアシルグリセロール(DG)により細胞膜へ移行したPKCの活性化が引き起こされると考えられる。
4. 細胞質Ca²⁺濃度の上昇には、細胞外からの流入と細胞内カルシウム貯蔵オルガネラからの放出の両者が関与する。
5. DPB遺伝子の部分欠失5'上流域とクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子の融合遺伝子の発現実験の結果、DPB遺伝子の上流-184~-126塩基の領域(ここに従来から"W-box"として知られているクラスⅡ抗原 β 鎖遺伝子の共通配列がある)がIFN- γ によるDPB mRNAの発現にとって重要である。

以上により、IFN- γ は受容体を介してPKCの活性化と細胞質Ca²⁺濃度の上昇を引き起こし、次いで今後解析すべく残された未知の過程を経て遺伝子上流-152~-126塩基域(DPBの場合)への制御蛋白質の結合が可能な状態を作ることによって転写を促進すると考えられた。

申請者から以上の内容の口頭発表を受け、次の論点についての質疑応答が行われた。

1. DR抗原、DQ抗原、DP抗原の機能と構造について。いずれの抗原も α 鎖と β 鎖からなるが、構造上の相関性について
2. 用いたグリオブラストーマT98GとA172の由来、特性等について
3. 20 μ M W-7 (カルモジュリン拮抗薬)がIFN- γ によるクラスⅡ抗原の発現を阻害しなかったことから、Ca²⁺/カルモジュリンプロテインキナーゼは無関係と結論づけているが、このことのpositive controlについて。また、そうとすればCa²⁺の作用機構について
4. IFN- γ による細胞質から細胞膜へのPKCの移行の機構について
5. ホルポールエステル(PMA)によりPKCを枯渇させたところがあるが、その原理、機構について
6. 細胞質へ移行したPKCの活性化に、DGのみならず、Ca²⁺により活性化されたカルバインによるPKCの限定切断が関与するという可能性について
7. 細胞内でのCa²⁺放出をサポニン処理漏出細胞で調べている。サポニンの作用機構、サポニン処理細胞の生存性、寿命、サポニンを生体にも使えるか等について

審査委員会では、以上の口頭発表、質疑応答および提出された主論文について審議した。その結果、本研究は多くの手段、方法を用いてIFN- γ によるクラスⅡ抗原mRNA発現機構について細部にわたって解析し、概略を明かしたすぐれた研究と高く評価された。また、質疑応答でも学位授与に値する知識、思考力

を備えていることが示された。よって、本研究は学位授与に価すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新				
	副査	教授	五十嵐	良雄	副査	教授	植村	研一
	副査	教授	藤田	道也	副査	助教授	馬場	正三