



## HLA CLASS II MOLECULE-MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM RESPONSIBLE FOR THE EXPRESSION OF IL-1 $\beta$ AND TNF- $\alpha$ GENES INDUCED BY A STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-30<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 松山, 哲<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1004">http://hdl.handle.net/10271/1004</a>                               |

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 151号  | 学位授与年月日 | 平成 5年 3月26日 |
| 氏名    | 松山 哲  |         |             |
| 論文題目  | <p>HLA CLASS II MOLECULE - MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM RESPONSIBLE FOR THE EXPRESSION OF IL-1<math>\beta</math> AND TNF-<math>\alpha</math> GENES INDUCED BY A STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN<br/>                     (HLA-クラスII分子により惹起される細胞内情報伝達機構—ブドウ球菌外毒素による単球のIL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>遺伝子発現)</p> |         |             |

医学博士 松山 哲

## 論文題目

HLA CLASS II MOLECULE-MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM RESPONSIBLE FOR THE EXPRESSION OF IL-1 $\beta$  AND TNF- $\alpha$  GENES INDUCED BY A STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN

(HLA-クラスII分子により惹起される細胞内情報伝達機構—ブドウ球菌解毒素による単球のIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子発現)

## 論文の内容の趣旨

ブドウ球菌外毒素は抗原提示細胞のプロセッシングをうけることなく主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex : MHC) クラスII分子と特定のT細胞レセプター可変領域 ( $\beta$ -chain variable region : V $\beta$ ) に結合してT細胞を活性化することが知られている。この際、ブドウ球菌外毒素は単球 (抗原提示細胞) を刺激し、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 及び腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ ) の産生を促す。そこで我々はヒト末梢血単球をブドウ球菌エントロトキシンB (staphylococcal enterotoxin B : SEB) で刺激しこれによる IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現誘導に関する細胞内情報伝達機構について検討した。

〔方法〕 ヒト単球は、健常人末梢血から Ficoll-Paque 比重遠心法によって単核球を分離し、その後さらに対向流遠心分配法 (countercurrent centrifugal elutriation) を用いて分離した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA は、定量的逆転写-PCR 法にて検出した。Protein kinase C (PKC) 活性、protein tyrosine kinase (PTK) 活性はそれぞれに特異的な合成基質ペプチドを用いて測定した。

〔結果および考察〕 SEB はヒト単球を刺激し IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  mRNA の発現を増強した。この増強効果は抗 HLA クラス II 抗体の前処置により抑制されたことにより、SEB 刺激による IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  遺伝子発現の誘導は、HLA クラス II 分子を介した細胞内情報伝達により遂行されると考えられた。また、これら遺伝子発現は 3 種の PTK 阻害剤及び PKC 阻害剤によって抑制されることから、この情報伝達系には PTK 及び PKC が関与していることが示唆された。このことは (1) SEB 刺激により単球中の PTK 及び PKC 活性が認められたこと、そして (2) PKC を直接活性化する phorbol myristate acetate (PMA) が IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  遺伝子発現を誘導したことによって確認された。さらに PTK 阻害剤は、SEB による IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  遺伝子発現を抑制したが、PMA によるそれは抑制しなかったことより、この情報伝達系では、PTK が PKC の上流に位置していると考えられた。

以上の結果及び HLA クラス II 分子の細胞質内領域には PTK 領域が認められないことから、SEB は HLA クラス II 分子に結合するとこれに細胞質内で会合していると考えられる未知の PTK 分子を活性化し、これがさらに PKC を活性化し、最終的に IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  遺伝子の転写を惹起するものと推察される。

## 論文審査の結果の要旨

ブドウ球菌外毒素は、外来性をスーパー抗原のひとつであり、抗原提示細胞のプロセッシングをうけることなく、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex : MHC) クラスII分子と特定のT細胞レセプター $\beta$ 鎖可変領域 ( $\beta$ -chain variable region : V $\beta$ ) に結合してT細胞は活性化することが知られている。

この際、ブドウ球菌外毒素は単球（抗原提示細胞）を刺激し、インターロイキン（IL）-1 $\beta$ 及び腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor : TNF）- $\alpha$ の産生を促す。しかし、単球におけるブドウ球菌外毒素によるこれらモノカイン遺伝子の発現調節機構について未だ不明な点が多い。そこで申請者らは、ヒト末梢血単球を、ブドウ球菌エンテロトキシンB（staphylococcal enterotoxin B : SEB）で刺激し、これによるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子の発現誘導に関する細胞内情報伝達機構について検討した。

〔材料及び方法〕 ヒト単球は、健康人末梢から Ficoll-Paque 比重遠心法によって単核球を分離し、その後さらに対向流遠心分配法（countercurrent centrifugal elutriation）を用いて分離した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA は、定量的逆転写-PCR法にて検出した。Protein kinase C（PKC）活性、protein tyrosine kinase（PTK）活性はそれぞれに特異的な合成基質ペプチドを用い、リン酸基転移反応を測定することにより検討した。

〔結果及び考察〕 SEBはヒト単球を刺激し IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$  mRNA の発現を増強した。この増強効果が抗HLAクラスII抗体の前処置により抑制されたことにより、SEB刺激によるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子発現の誘導は、HLAクラスII分子を介した細胞内情報伝達により遂行されると考えられた。また、これら遺伝子発現は3種のPTK阻害剤及びPKC阻害剤によって抑制されることから、この情報伝達系にはPTK及びPKCが関与していることが示唆された。このことは(1)SEB刺激により単球中のPTK及びPKC活性が認められたこと、そして(2)PKCを直接活性化する phorbol myristate acetate（PMA）がIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子発現を誘導したことによって確認された。さらにPTK阻害剤は、SEBによるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子発現を抑制したが、PMAによるそれは抑制しなかったことにより、この情報伝達系では、PTKがPKCの上流に位置していると考えられた。

以上の結果及びHLAクラスII分子の細胞質内領域にはPTK活性領域が認められないことから、SEBはHLAクラスII分子に結合するとこれに細胞質内で会合していると考えられる未知のPTK分子を活性化し、これがさらにホスホリパーゼCのチロシン残基のリン酸化を介して生ずるジアシルグリセロールによってPKCを活性化し、最終的にIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子の転写を惹起するものと推察された。

また発表に際し、次の様な質疑が行われた。

- 1) centrifugal elutriation を用いた単球分離法の利点、細胞の yield、純度
- 2) SEB に LPS の混入はないか
- 3) 細胞破壊法について
- 4) PCRを行ったとき、T細胞マーカーの mRNA 発現をみたか
- 5) 用いた抗 HLA クラスII分子抗体の認識するエピトープは
- 6) 酵素阻害剤の作用の違いについて
- 7) IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 遺伝子の転写調節領域について

以上の点について、申請者の応答は概ね適切であった。

審議の結果、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位授与に値する十分な内容を備えているものと全員一致で判定した。

|         |    |    |    |    |    |    |      |
|---------|----|----|----|----|----|----|------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 教授 | 瀧川 | 雅浩 |    |    |      |
|         | 副査 | 教授 | 市山 | 新  | 副査 | 教授 | 金子榮藏 |
|         | 副査 | 教授 | 白澤 | 春之 | 副査 | 教授 | 馬場正三 |