

氏 名	もり やま ひろ ゆき 森 山 博 由
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3180 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学位論文題目	B 細胞抗原受容体との共刺激で Fas 誘導アポトーシスが阻害される分子機構の解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 野 陸 人 教 授 永 田 和 宏 教 授 阿 形 清 和

### 論 文 内 容 の 要 旨

B リンパ球細胞 (B 細胞) が分化成熟する過程において Fas を介するアポトーシスがその負の選択に重要な役割を果たしている。一方, B 細胞では, B 細胞抗原レセプター (BCR) を架橋すると Fas を介するアポトーシスを解除できると報告されている。マウス成熟 B リンパ球由来細胞株 A20 は Fas を介するアポトーシスに感受性を示すと報告されているが, Fas 刺激と BCR 刺激を同時に行うと, Fas を介するアポトーシスが阻害されることを申請者は見いだした。この BCR 刺激による Fas を介するアポトーシス阻害は, Fas 刺激直下のアポトーシス誘導因子 Caspase-8 の活性化を抑制することに起因しており, BCR 刺激は Caspase-8 活性化阻害分子である cellular caspase-8/FLICE inhibitory protein (c-FLIP) の急速な発現上昇を促した。一方, Fas 刺激が伝わると death-inducing signal complex (DISC) と呼ばれる Fas, アダプター分子 FADD, および Caspase-8 から構成される複合体の形成が引き起こされ, Caspase-8 が活性化するが, BCR 刺激で発現した c-FLIP は, Caspase-8 の DISC への会合を競合的に阻害した。A20 細胞において, DISC は Fas 刺激後 3 時間をかけてゆっくりと形作られた。このため, Fas と BCR の同時刺激後 2 時間で発現誘導された c-FLIP が, DISC 形成を阻害できたと考えられる。また, short hairpin RNA 発現系を用いて c-FLIP の発現を抑制すると Fas を介するアポトーシスの阻害効果は著しく減少した。Fas と BCR の同時刺激による Fas を介するアポトーシス阻害は, BCR 刺激単独で発現が誘導される c-FLIP によって担われていることを申請者は示唆することができた。また, A20 細胞を PI3 kinase (PI3K) の阻害剤である LY294002 で処理した解析と, dominant negative PI3K p85 $\alpha$  を発現させた解析を行った結果から, BCR 刺激による Fas を介するアポトーシス阻害効果が, PI3K の活性化阻害によって抑制されることが示された。また, A20 細胞に PI3K の下流で活性化することが知られる Akt を強制発現すると, BCR 刺激を与えなくても, c-FLIP の発現上昇が観察されるとともに, Fas を介するアポトーシスの強固な阻害効果が認められた。また, マウス脾臓由来成熟 B 細胞においても, BCR 刺激が c-FLIP mRNA の発現上昇を促すことが確認でき, またこの発現上昇は LY294002 による PI3K の活性化阻害によって消失することを示すことができた。

以上のことから, マウスの成熟 B 細胞において, BCR 刺激は PI3K/Akt シグナル経路を介して迅速に c-FLIP の発現上昇を誘導することで, BCR 刺激と同時に Fas 刺激が導入されても, Fas を介するアポトーシスを阻害することが示された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生命体が恒常性を維持するために重要な免疫システムの中で, 最も重要な役割を担う細胞の一つが B リンパ球 (B 細胞) である。生体にとって有害な物質 (外来抗原) を排除するために機能する免疫反応では, 外来抗原を認識した成熟 B 細胞が増殖・活性化し, 抗体産生細胞へと分化することが重要である。このため成熟 B 細胞の表面には, 抗原を認識する B 細胞抗原レセプター (BCR) が発現し, 機能している。一方, 細胞死を誘導するデスレセプターである Fas も同時に成熟 B

細胞上に発現し、Fas が刺激を受けるとアポトーシスが誘導される。そして成熟 B 細胞では、増殖・活性化に不可欠な BCR からのシグナルと、Fas を介するアポトーシス誘導シグナルという二つの相反したシグナルが共に細胞内に導入されることがある。申請者は、この BCR および Fas からの相反するシグナルに着目し、マウスの成熟 B 細胞に引き起こされる Fas 誘導アポトーシスが、同時に導入された BCR 刺激によって阻害されることを見いだした。そして、この現象の分子メカニズムをマウス B 細胞株やマウス脾臓 B 細胞を用いて解析し、BCR 刺激によって活性化する PI3K/Akt シグナル経路が、c-FLIP 分子の発現上昇を早期に引き起こし、発現上昇した c-FLIP が Fas を介するアポトーシスを直接阻害することを明らかにした。その解析では、RNA 干渉法を巧みに用いた分子細胞生物学的解析や、Fas 誘導アポトーシスシグナルで最初に活性化する Caspase-8 と Fas との会合 (DISC 形成) を c-FLIP が阻害するという生化学的解析等を駆使しており、レベルの高い研究を完成させていることは評価できる。一方、B 細胞においては、Fas 刺激による DISC 形成が他の種類の細胞と比較して遅く、そのために BCR 刺激によって発現が誘導された c-FLIP が、同時に導入された Fas からのアポトーシス誘導シグナルを阻害できることを示している。この事実は Fas 下流のシグナル伝達機構の解析で最大の課題となっている DISC 形成制御の分子機構を解明する糸口となると考えられ、非常に興味深い。また申請者は、マウスの生体内における成熟 B 細胞の増殖活性化に必須とされる活性化 T 細胞との相互作用において、活性化 T 細胞に発現した Fas リガンドを介して成熟 B 細胞へのアポトーシスが誘導された場合に、それを回避する機構として本研究で得られた結果が最も効果的に利用されている可能性を示すなど、自らの研究の生理学的な意義を示したことは高く評価でき、本研究が今後さらに発展していくことが期待される。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。