

氏名 田口佳光
 学位(専攻分野) 博士(生命科学)
 学位記番号 生博第39号
 学位授与の日付 平成17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 生命科学研究所高次生命科学専攻
 学位論文題目 IL-2シグナルによるNK細胞増殖におけるセラミド調節機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 小堤保則 教授 湊長博 教授 米原伸

論文内容の要旨

【背景と目的】スフィンゴ脂質セラミドは、近年、細胞内シグナル分子としての機能が認識されてきている。ヒトNK (natural killer) 細胞由来の KHYG-1 細胞は、IL-2 に依存した細胞増殖を示し、IL-2 受容体より始まる連鎖的なリン酸化シグナルにより増殖が制御されることが示されているが、セラミドの細胞増殖への関与はこれまで明らかにされていない。そこでNK細胞をモデルとして、IL-2による増殖制御、細胞内セラミド量の挙動、およびセラミド代謝酵素の制御を解析し、セラミドの細胞増殖制御への関与を検討した。

【結果】IL-2欠乏下でKHYG-1細胞を培養すると12時間経過後からアポトーシスによる細胞死をはじめた。IL-2欠乏12時間後に、IL-2を添加すると増殖した。この時の細胞内セラミド量は、IL-2の欠乏により増加し、IL-2の添加により減少した。セラミド量を制御する酵素の活性を測定したところ、IL-2によりセラミドの減少に機能するグルコシルセラミド合成酵素(GCS)、スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)が活性化され、セラミドを産生する酸性スフィンゴミエリナーゼ(acid SMase)活性が抑制された。IL-2によりKHYG-1細胞が増殖する時、細胞透過性のC2セラミドを投与したところ、セラミドの増加を伴い細胞増殖が抑制された。IL-2によりセラミド代謝酵素が制御されること、また産生したセラミドが細胞増殖の抑制に機能していることが示唆された。

IL-2シグナルの下流の各種キナーゼの阻害薬を用いてIL-2シグナルを阻害したところ、LY294002により、セラミドの蓄積を伴い、細胞増殖が抑制された。このとき、GCS、SMS活性が低下し、acid SMaseの活性化が認められた。またCOS-7細胞に活性型PI-3キナーゼを過剰発現させたところ、GCS、SMSの活性化、acid SMase活性の抑制によりセラミドが減少し、細胞増殖が促進された。以上の結果からPI-3キナーゼ経路により細胞内セラミド量が調節されていることが明らかになった。

ノーザンプロットの結果、mRNAレベルで、IL-2によるGCS発現量の上昇およびacid SMaseの発現量の低下が観察され、この調節はLY294002により抑制された。mRNAの安定性を調べたところ、IL-2シグナルによるmRNA安定性への影響は無かった。核run-onアッセイの結果、IL-2によりGCSの転写の活性化およびacid SMaseの転写の抑制が認められ、この転写調節がLY294002により阻害された。従って、GCSとacid SMaseはPI-3キナーゼを介した転写制御による調節を受けていることが明らかになった。

ヒトの末梢血により分離したNK細胞では、IL-2により増殖が亢進し、この時GCS、SMSの活性化、acidおよびneutral SMase活性の抑制によりセラミドが減少した。この効果はLY294002の添加により阻害された。末梢血NK細胞でもIL-2シグナル下流のPI-3キナーゼを介して増殖の調節およびセラミド代謝酵素の活性調節によるセラミド調節がされていることが明らかとなった。

【結論】OYG-1細胞においてIL-2シグナルの下流のPI-3キナーゼの経路を介し、GCS、SMSおよびacid SMaseの活性調節を受けていること、またGCSとacid SMaseは転写制御による調節を受けていることを明らかにした。ヒト末梢

血NK細胞においてもIL-2シグナル下流のPI-3キナーゼによりセラミド代謝酵素が活性レベルで制御されていることを明らかにした。本研究によりNK細胞の増殖調節にセラミドの細胞内での量的調節が重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

スフィンゴ脂質セラミドは従来、リン脂質と同様に、細胞脂質二重膜の構成成分としての役割や細胞内の栄養要素としての重要性に焦点が合わされ、長らく細胞生理機能とは無縁の脂質と考えられていた。1989年にビタミンD3の添加によるヒト白血病HL-60細胞株単球系分化誘導過程において、中性スフィンゴミエリナーゼ活性化によるセラミドの産生が確認され、セラミドが細胞内シグナル分子として細胞機能を担っている事が報告された。その後、様々なストレスによるアポトーシス誘導時のシグナル伝達機構の生化学的解析により、セラミドの細胞内アポトーシス誘導メディエーターとしての役割が認識されてきている。一方、ナチュラルキラー（NK）細胞は生体内で腫瘍に対する免疫学的監視機能、ウイルスなどの感染制御機能が注目されてきたが、細胞の増殖生存の調節機能については、まだ十分に解明されていない。NK細胞はサイトカインによりMHC非拘束性のキラー活性と増殖が活性化されるが、インターロイキン（IL）-2はキラー活性と増殖両方を活性化することが知られている。

このような背景の中、本研究は、NK細胞をモデルとして、IL-2による増殖制御、細胞内セラミド量の挙動、およびセラミド代謝酵素の制御を解析することによって、セラミドの細胞増殖制御への関与を検討したものである。評価すべき点としては、以下のような点が上げられる。

1. IL-2シグナルによる本細胞の生存増殖調節にスフィンゴ脂質セラミドが係わっているかについて検討を加え、細胞内セラミド量が、IL-2の欠乏により増加し、IL-2の添加により減少することを明らかにした。さらに細胞内のセラミド量のこのような調節はグルコシルセラミド合成酵素、スフィンゴミエリン合成酵素及び酸性スフィンゴミエリナーゼが協奏的に働いて起こることを明らかにした。また、細胞透過性のC2セラミド投与の実験から、セラミドの増加に伴い細胞増殖が抑制されることも示した。
2. 核run-onアッセイにより、グルコシルセラミド合成酵素及び酸性スフィンゴミエリナーゼが転写レベルでIL-2シグナルにより調節されていることを示した。さらに、その調節は、LY294002の添加により阻害されたことから、IL-2シグナルの下流のPI-3キナーゼを介して起こることを示した。
3. ヒトの末梢血により分離した、NK細胞においても、IL-2により増殖が亢進し、この時グルコシルセラミド合成酵素及びスフィンゴミエリン合成酵素の活性化、酸性及び中性スフィンゴミエリナーゼ活性の抑制によりセラミドが減少することを明らかにし、培養細胞と類似の現象が起きていることを示した。さらに、末梢血NK細胞でもIL-2シグナル下流のPI-3キナーゼを介して増殖の調節およびセラミド代謝酵素の活性調節によるセラミド量の調節がされていることを示した。

以上のように、本論文はNK細胞におけるIL-2による細胞増殖にスフィンゴ脂質セラミドが関与することを明らかにしたものであり、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成17年2月2日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。