

氏 名	いま 井 とし お 夫
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 593 号
学位授与の日付	平 成 10 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	T細胞特異的な細胞遊走に関する因子の研究

(主査)

論文調査委員 教授 河合明彦 教授 市川 厚 教授 伊藤信行

## 論 文 内 容 の 要 旨

免疫細胞は種々のサイトカインにより分化, 増殖, 細胞死が制御されている。生体内では炎症は局所的に見られ, リンパ球の分化, 成熟等はある特定の部位において行われている。従って, 細胞の分化, 増殖, 死に加えて, 細胞の移動も免疫系にとって必要不可欠な現象である。炎症時の好中球, 単球の浸潤にはそれぞれIL-8, MCP-1と呼ばれるケモカインが重要な走化因子であることが示されている。リンパ球の炎症部位への浸潤, リンパ組織へのホーミング, リンパ組織内での移動についても同様な走化因子の存在が予想されていたが, リンパ球に対するケモカインの精製は困難であった。そこで, 我々はリンパ球特異的なケモカイン, ケモカイン受容体の解明を試みた。

## 第1章 シグナルシーケンスストラップ法による新規CCケモカインTARCの同定

多くの分泌蛋白質や細胞膜蛋白質はN末端にシグナルシーケンスが存在する。我々はシグナルシーケンスをコードする遺伝子断片を効率よく選択的にクローニングする方法, シグナルシーケンスストラップ法を開発した。EBウイルスベクターにまずシグナルシーケンスを欠失させたCD4遺伝子を組み込み, さらにPHA (phytohemagglutinin) で活性化したヒト末梢血単核細胞由来のcDNAの5'末端側のみをシグナルシーケンス欠失CD4遺伝子の5'上流に導入し, 発現ライブラリーを構築した。得られた発現ライブラリーをEBウイルス感染Raji細胞に導入し, CD4抗原が細胞表面上に発現している細胞を繰り返し選別することで, シグナルシーケンスをコードする遺伝子断片の濃縮を行った。最終的に濃縮されたCD4抗原陽性細胞からプラスミドを回収し100クローンを調べたところ, 42クローンが細胞表面上にCD4抗原を発現させ得た。得られた遺伝子断片の1つを用いて新規CCケモカイン遺伝子の分離に成功した。新規ケモカインmRNAは胸腺で構成的に発現しており, PHAで活性化したヒト末梢血単核細胞でも一過性に発現する。これら発現の特徴から新規ケモカインをTARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) と命名した。組換えTARC蛋白はバキュロウイルス発現系を用いて産生し, 陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相HPLCを用いて精製した。<sup>125</sup>I標識したTARCはある種のT細胞株, 末梢血T細胞に特異的に結合したが, B細胞株, 単球, 顆粒球には結合しなかった。T細胞株Jurkatを用いて求めた結合定数は2.1nMと高親和性であり, TARCの受容体への結合はTARCのみで阻害され, 調べた限りの他のケモカインでは阻害されなかった。TARCはT細胞株Hut78, Hut102に対して細胞遊走を誘導したが, 単球, 顆粒球に対しては活性を示さなかった。以上の結果より, 我々は初めてT細胞特異的なケモカインを同定し, またT細胞特異的なケモカイン受容体の存在を明らかとした。

## 第2章 TARC受容体の同定

ケモカインの活性は標的細胞上のレセプターに結合することで発揮される。1991年に初めてIL-8受容体がクローニングされ, 7回膜貫通G蛋白共役型受容体 (GPCR) のファミリーに属することが明らかとなった。それ以降, 主にデジェネレートプライマーを用いたPCRでケモカイン受容体に類似したGPCRをクローニングし, 培養細胞に発現させてケモカインとの反応性を調べるという手法で, 多くの受容体が同定された。我々はTARC受容体を同定するために, TARCと分泌型アルカリフォスファターゼの融合蛋白 (TARC-SEAP) を作製し, 5種のケモカイン受容体遺伝子と5種のケモカイン受容体

類似遺伝子をそれぞれ発現させた細胞に対する結合を調べた。TARC-SEAPはCCR4発現細胞に特異的に結合し、結合定数は、0.5nMと高親和性であり、CCR4への結合はTARCのみで阻害され、調べた限りの他のケモカインでは阻害されなかった。TARCはCCR4発現細胞に対して細胞遊走と細胞内カルシウム濃度上昇を誘導した。CCR4 mRNAはある種のT細胞株、末梢血T細胞に強く発現していたが、B細胞、NK細胞、単球、顆粒球では発現は認められなかった。以上の結果より、CCR4はT細胞特異的ケモカインTARCの受容体であり、T細胞特異的に発現していることが明らかとなった。

### 第3章 TARC受容体 (CCR4) の新たなリガンドの発見

Macrophage-Derived Chemokine (MDC) はTARCの発見から1年後に同定された新規CCケモカインで、TARCに非常に良く似た特徴を持っており、アミノ酸配列の相同性も37%と高い。MDC、TARC mRNA共に構成的に胸腺で強く発現し、多くのCCケモカインの遺伝子がヒト17番染色体に存在するのに対してTARC、MDCの遺伝子は共にヒト16番染色体に存在する。より詳しくこれら2つのケモカインの関係を明らかとするために、MDCと分泌型アルカリフォスファターゼの融合蛋白 (MDC-SEAP) を作製し、TARC受容体であるCCR4との相互作用を解析した。MDC-SEAPはCCR4発現細胞に特異的に結合し、結合定数は0.18nMと高親和性であり、CCR4への結合はMDCとTARCのみで阻害され、調べた限りの他のケモカインでは阻害されなかった。7種類のケモカイン受容体遺伝子導入細胞に対する反応を調べたところ、MDCとTARCは共にCCR4発現細胞に対してのみ細胞内カルシウム濃度上昇を誘導した。さらにMDC、TARCは共にCCR4発現細胞の細胞遊走を誘導したが、活性はMDCがTARCより約2倍強かった。以上の結果よりMDCはTARCと同様にCCR4が特異的な受容体であり、T細胞選択的なケモカインであることが明らかとなった。

以上、本研究により、T細胞特異的ケモカイン、ケモカイン受容体が存在する事が初めて明らかとなり、それら遺伝子を同定した。従って、免疫反応におけるT細胞の複雑な移動を論理的に考えることが可能となり、T細胞の移動を制御し、免疫疾患を治療する為の重要な標的が得られたと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文はリンパ球の走化性に関与するサイトカイン (このようなサイトカインを特にケモカインと呼んでいる) について、申請者独自の解析手段を用いてその存在を実証し、またレセプターの実体についても解析を行ったものである。

申請者はまず、リンパ球に働くケモカインの遺伝子をクローン化する手法の開発から手がけた。CD4のシグナルシーケンスをコードする遺伝子領域をEBウイルスベクターに組込むことにより、シグナルシーケンスをもつ遺伝子を効率よくクローン化する方法 (シグナルシーケンストラップ法) を開発した。このベクターに、ヒト末梢血単核細胞由来のcDNAの5'-末端側を組込み、発現ライブラリーを構築した。これをRaji細胞に導入し、細胞表面にCD4抗原をもつようになった細胞を選別して濃縮し、この細胞集団から分離した発現プラスミドのクローン解析により、新規のケモカイン遺伝子の分離に成功した。

本遺伝子は胸腺で構成的に発現し、またPHAで活性化したヒト末梢血単核細胞でも一過性に発現することから、thymus and activation-regulated chemokine (TARC) と命名した。TARC遺伝子をバキュロウイルス発現系で発現させて、タンパクを精製し、<sup>125</sup>I標識して種々の細胞との結合実験を行ったところ、B細胞や単球、顆粒球には結合しなかったが、Tリンパ系の細胞株や末梢T細胞に特異的に結合し、Jurkat細胞で高親和性の結合定数 (2.1nM) が得られた。また、本因子はT細胞株 (Hut78, Hut102) に対して細胞遊走を誘導し、単球や顆粒球に対して作用せず、T細胞特異的ケモカインであることが分かった。

上記の結果から、TARCに対するレセプターがT細胞に存在することが示唆されたので、申請者はレセプターの実証を試みた。本実験にはTARCと分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) の融合タンパクTARC-SEAPを作成し、すでに分離されているさまざまなケモカイン受容体遺伝子およびリガンドの明らかでないケモカイン受容体類似遺伝子を発現させた細胞を多数準備し、TARC-SEAPとの結合性を調べた。その結果、TARCはCCR4遺伝子を発現させた細胞のみと特異的に結合した。また、TARCはCCR4発現細胞の遊走および細胞内カルシウム濃度上昇を誘導した。さらに、CCR4は胸腺およびT細胞株や末梢血T細胞に強く発現していたが、B細胞、NK細胞、単球、顆粒球には発現せず、CCR4はTARCの機能的なレセプターで、T細胞特異的に発現しているものと結論した。

最後に、申請者はTARCレセプターに結合する別のリガンドを見出した。即ち、TARC発見の1年後に同定された新規ケモカイン (macrophage-derived chemokine, MDC) について、TARCとの比較実験を行ったところ、胸腺で構成的に発現しており、ヒト16番染色体に遺伝子座をもつことなど、TARCによく似た特徴を持つことが分かった。また、MDCとSEAPの融合タンパクを作成してレセプターとの結合実験を行い、MDCがCCR4発現細胞に高親和性の結合定数 (0.18nM) で結合し、TARCと競合することを示した。MDCもCCR4発現細胞に対して細胞遊走を誘導し、細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導した。以上から、MDCはTARCと同様にT細胞特異的なケモカインであることが明らかとなった。

以上、本論文の研究から、Tリンパ球の走化性に特異的に働くケモカインおよびそのレセプターの存在が初めて明らかにされ、それぞれの遺伝子が同定された。本研究の成果をもとに、今後免疫反応におけるT細胞動員についての論理的な解析が可能になり、その制御や、関連する免疫疾患の実態や治療に関する解析が可能になるものと思われる。よって、本論文が博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。さらに、平成10年6月30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。