

|           |                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | うえ の ひで き<br>上 野 英 樹                                                                                                                                                                                                                                 |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2302 号                                                                                                                                                                                                                                         |
| 学位授与の日付   | 平 成 13 年 1 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    | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                                                                                                                                  |
| 学位論文題目    | ZAP-70 is required for calcium mobilization but is dispensable for mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily activation induced via CD2 in human T cells<br>(ヒトT細胞における CD2 刺激において, ZAP-70 は細胞内カルシウム濃度上昇に必要であるが MAPK スーパーファミリーの活性化には必須ではない) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 湊 長 博 教 授 本 庶 佑 教 授 中 畑 龍 俊                                                                                                                                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

T細胞はT細胞レセプター (TCR) を介した刺激のみならず, CD2 を介した刺激によっても活性化することが知られている。TCR の刺激伝達系と CD2 の刺激伝達系はその多くを共有していると考えられており, 実際に CD2 刺激下での T 細胞の活性化には TCR の鎖の存在が必須である。その一方で CD2 刺激系では, TCR の刺激伝達系に必須であると考えられているシグナル伝達分子の一つ, ZAP-70 がチロシンリン酸化されないことが知られており, TCR 伝達系と CD2 伝達系が一部異なることが示されている。また, CD2 の刺激伝達系における ZAP-70 の役割は未だ明らかではない。

CD8 欠損症は *zap-70* の遺伝子異常により発症する非常に稀な原発性重症複合型免疫不全症の一つで, 末梢血中に CD8 陽性 T 細胞を欠如することが特徴である。また, CD4 陽性 T 細胞はほぼ正常数存在するが ZAP-70 を欠如するため CD3 刺激下での DNA 合成が見られない。CD8 欠損症の患者より得られる末梢血 CD4 陽性 T 細胞はヒト ZAP-70 欠損 T 細胞の 1 モデルであると考えられる。本研究では CD8 欠損症の患者の CD4 陽性 T 細胞を用いて T 細胞の CD2 の刺激伝達系における ZAP-70 の役割に関して種々の検討を行った。

CD8 欠損症の患者および健常人から末梢血単核球を分離し, 抗 CD2 抗体 (抗 T11<sub>2</sub>, 抗 T11<sub>3</sub> 抗体のペア) で刺激すると, CD8 欠損症患者由来の単核球においてのみ DNA 合成, サイトカイン産生が全く認められなかった。このことより CD2 刺激系においても T 細胞活性化に ZAP-70 が必須であることが明らかとなった。

T 細胞のサイトカイン産生には多くの転写因子の協調的な活性化が必須である。その中の一つである AP-1 は ERK, JNK, p38 の 3 分子で構成される MAPK スーパーファミリーにより活性化される。CD2 刺激による MAPK スーパーファミリーの 3 分子の活性化を *in vitro* kinase assay の系で検討したところ, そのいずれもが, CD2 刺激により正常 T 細胞のみならず ZAP-70 欠損 T 細胞においても弱いながら活性化された。このことより, ZAP-70 欠損 T 細胞における CD2 刺激下でのサイトカイン産生の欠如は MAPK スーパーファミリーの活性化障害によるものではないこと, および CD2 刺激系において ZAP-70 非依存性の MAPK スーパーファミリー活性化経路が存在することが示唆された。サイトカイン産生に重要な役割を果たすもう一つの転写因子, NFAT は細胞内カルシウム濃度上昇依存性に活性化されるカルシニューリンにより脱リン酸化を受けて活性化され, 核内に移行する。ZAP-70 欠損 T 細胞では CD2 を介した刺激によるカルシウム濃度上昇, および NFAT の脱リン酸化が見られなかった。また ZAP-70 欠損 T 細胞をカルシウム・イオノフォアの存在下, すなわち細胞内カルシウム濃度を上昇させた状態で CD2 刺激すると, NFAT の活性化と共にサイトカインを産生することが判明した。以上より, CD2 刺激系において ZAP-70 はカルシウム濃度上昇および NFAT をはじめとするカルシウム濃度依存性の転写因子の活性化に必須であることが示唆された。

本研究により, ZAP-70 の CD2 シグナル伝達における重要性を示すと共に, T 細胞のシグナル伝達に ZAP-70 非依存性の活性化経路が存在することが示唆された。CD8 欠損症において, 末梢に存在する CD4 陽性 T 細胞の多くがメモリー型

T細胞に特徴的な表面抗原を発現しており（参考論文）、そのT細胞の形質転換にCD2を介するシグナル伝達系が関与している可能性も考慮され、非常に興味深い。

### 論文審査の結果の要旨

本研究ではCD8欠損症の患者由来のZAP-70欠損T細胞を用いて、T細胞のCD2刺激伝達系におけるZAP-70の役割に関して種々の検討を行っている。

ZAP-70欠損T細胞を抗CD2抗体で刺激すると、DNA合成、サイトカイン産生が全く認められず、CD2刺激系においてT細胞活性化にZAP-70が必須であることが明らかとなった。CD2刺激によるMAPKスーパーファミリーの3分子のいずれもが、CD2刺激によりZAP-70欠損T細胞においても活性化され、ZAP-70欠損T細胞におけるCD2刺激下でのサイトカイン産生の欠如はMAPKスーパーファミリーの活性化障害によるものではないことが示唆された。その一方でZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激によるカルシウム濃度上昇、およびNFATの脱リン酸化が見られなかった。またZAP-70欠損T細胞を強制的に細胞内カルシウム濃度を上昇させた状態でCD2刺激すると、NFATの活性化と共にサイトカインを産生した。以上より、ZAP-70欠損T細胞でのCD2刺激によるサイトカイン産生障害は、細胞内カルシウム濃度上昇およびNFATをはじめとするカルシウム濃度依存性の転写因子の活性化障害によるものと判明した。本研究により、CD2刺激伝達系においてはZAP-70が主に細胞内カルシウム濃度上昇に重要な役割を持つことが示唆された。

以上の研究はZAP-70のCD2シグナル伝達における機能の解明に貢献し、CD8欠損症の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年12月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。