

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

リンパ球機能分子解析による免疫系評価法の検討に関する研究

研 究 報 告 書

主任研究者 奥 村 康

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

リンパ球機能分子解析による免疫系評価法の検討に関する研究

主任研究者 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学

研究要旨：TNFRファミリーに属するCD27はTRAF2とTRAF5の会合を通してNF- κ BおよびJNKを活性化していることが明らかとなった。またMAPKKKに属するASK1がTRAFを介するJNKの活性化に関与していることが明らかとなった。ヒトTRAILに対するモノクローナル抗体を作製し、ヒトCD4陽性T細胞クローンにTRAILが恒常的に発現しており、TRAIL感受性の腫瘍細胞に強い細胞障害活性を示すことが明らかとなった。またIFN α 処理により末梢血T細胞にもTRAILが発現することが明らかとなり、IFN α 刺激T細胞は腎癌由来の細胞株に強い細胞障害活性を示すことが明らかとなり、このことは腎癌のIFN α 治療の新たなメカニズムを明らかにしたことになる。

分担研究者名

八木田英雄（順天堂大学・助教授）

小端哲二（順天堂大学・講師）

中野裕康（順天堂大学・助手）

竹田和由（順天堂大学・助手）

とを明らかにしてきた。そこで今回我々同じTNFRファミリーに属し、T細胞に補助シグナルを導入することや、B細胞の抗体産生を増強する作用の知られているCD27という分子が、他のTNFRファミリーと同様にTRAFファミリー分子を介してNF- κ Bおよびc-Jun N-terminal kinase (JNK)を活性化しているかを検討する。

A. 研究目的

炎症や細胞増殖あるいは細胞死などの生体応答に関与しているtumor necrosis factor receptor (TNFR)ファミリーを介するNF- κ Bやc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化のメカニズムを明らかにする。これらのレセプターを介するシグナルをどの分子レベルでブロックするのが炎症や自己免疫疾患の治療上有効かを検討する。さらにそれらのシグナル伝達分子の機能をブロックするような薬剤の開発を最終目標とする。また最近、遺伝子クローニングされたTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)のモノクローナル抗体を作製し、この分子の生体における役割を明らかにし、この分子の機能をブロックしたり、あるいは積極的にある種の癌細胞に遺伝子導入することで、種々の疾患への治療の方向性を検討する。

B. 研究方法

我々はこれまで炎症や細胞増殖などに深くかかわっているTNFRファミリーを介するNF- κ Bの活性化のメカニズムについて解析してきた。特に我々は、これらのレセプターの下流に存在するシグナル伝達分子の一つである TNFR associated-factor (TRAF)- 5の遺伝子のクローニングを世界に先駆けて行い、TRAF5がCD30やlymphotoxin- β レセプター (LT- β R)を介するNF- κ Bの活性化に関与しているこ

1) TNFRファミリーに属するCD27がNF- κ Bを活性化するかどうかを、CD27をヒト胎児腎臓由来である293細胞に過剰発現させ、ゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイにより検討する。

2) CD27とTRAFファミリー分子との会合を293細胞に同時に発現させることにより検討する。

3) TRAF2やTRAF5のN末のZn結合領域を欠失させた不活性変異体をCD27と同時に発現させることで、CD27を介するNF- κ Bの活性化がブロックされるかどうかを検討する。

4) TRAFファミリーはNF- κ Bを活性化する他に、JNKの経路も活性化することが示されているがその分子メカニズムについては詳細は明らかにされていない。そこでJNKを活性化することが示されているMAPKKKに属するApoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1がTRAFを介するJNKの活性化に関与しているかどうかを、まず

5) TRAFをASK1と同時に発現させることでASK1の活性化が起こるかをin vitro kinase assay (IVK)により検討する。

6) ASK1とTRAFが会合するかどうかを293細胞に同時に発現させることにより検討する。

7) TRAFを介するJNKの活性化がASK1の不活性型によりブロックされるかどうかをIVKにより検討する。

また最近、ある種の腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) と呼ばれる分子がクローニングされたが、この分子の生体内における役割はほとんど明らかにされていない。そこで

8) ヒトリコンビナントTRAILを大量に作製するために、N末に存在する膜貫通領域を除く形で酵母の発現ベクターにTRAIL遺伝子を組み込み、酵母に遺伝子導入する。遺伝子導入した酵母を大量培養し、種々のカラムにより活性型TRAILを精製する。

9) リコンビナントヒトTRAILをマウスに免疫し、TRAIL感受性細胞であるJurkat細胞に対するTRAILのkillingの中和活性を指標にハイブリドーマをスクリーニングし、ヒトTRAILに対するモノクローナル抗体を得る。

10) この抗体を使用し、種々のヒトの細胞におけるTRAILの発現をフローサイトメトリーにより検討する。

11) TRAILの発現の認められた細胞については、TRAIL感受性細胞に対し細胞障害活性の有無をクロミウム遊離法により検討する。

C. 研究結果

ゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイの結果からCD27を過剰発現させることでNF- κ Bの活性化がもたらされることが明らかとなった。

TRAFファミリー分子との会合を検討した結果、CD27はTRAF2およびTRAF5と会合することが明らかとなった。さらにTRAF2およびTRAF5のN末のZn結合領域を欠失させた不活性型変異体をCD27と同時に発現させることにより、CD27を介するNF- κ Bの活性化がブロックされたことから、CD27を介するNF- κ Bの活性化はTRAF2およびTRAF5によって担われていることが明らかとなった。

TRAFファミリーに属するTRAF2, -5, -6はASK1と直接会合して、ASK1を活性化することを明らかにした。さらに不活性型のASK1をTRAF2と同時に発現させることによりTRAF2を介するJNKの活性化がブロックされたことより、TRAF2を介するJNKの活性化にASK1は必須の分子であることが明らかとなった。

ヒトTRAILに対するモノクローナル抗体の作製を行った。この抗体はリコンビナントTRAILによる標的細胞に対する細胞障害活性を強く抑制した。またこの抗体を用いた解析からTRAILはヒトCD4陽性のT細胞クローン上に刺激の有無にかかわら

ず恒常的に発現しており、TRAIL感受性の標的細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらにヒト正常末梢血Tリンパ球においてもIFN α によりTRAILの発現が誘導され、IFN α で刺激されたT細胞は数種類の腎癌細胞株にTRAILを介して効率よくアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

D. 考察

TNFRファミリーに属するCD27も他のメンバーと同様に、TRAF2やTRAF5を介してNF- κ Bを活性化していることが明らかとなり、このことはTNFRファミリーを介するシグナル伝達におけるTRAFファミリー分子の重要性および普遍性を明らかにしたことになった。またTRAFを介するJNKの活性化はASK1によっていることが明らかとなり、TRAFの直下においてTRAF-NIKという経路とTRAF-ASK1という二つの経路に分岐することが明らかとなった。TRAILも標的細胞破壊に関与していることが明らかとなり、これまで考えられてきたパーフォリン、FasL以外の第三の標的細胞破壊のメカニズムが明らかとなった。IFN α 活性化T細胞はTRAILを介して腎癌由来の細胞株に強い細胞障害活性を示すことが明らかとなり、このことは腎癌におけるIFN α 治療の新たな作用機序を明らかにすることとなった。

E. 結論

TNFRファミリーを介するNF- κ BやJNKの活性化に関与する複数の分子の存在が明らかとなり、炎症の治療という観点からTRAF, NIK, ASK1, IKKなどの分子をターゲットとした薬剤の開発の可能性が考えられた。

またTRAILは腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対してアポトーシスを誘導しないとの報告があり、TRAIL遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与することにより癌の遺伝子治療への発展が考えられる。またTRAILはAIDS発症時に生ずるT細胞の減少にも関与しているとの報告があり、TRAILに対する中和抗体を投与することによりT細胞減少を抑制できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Kashiwada, M., Y. Shirakata, J.-I. Inoue, H. Nakano, K. Okazaki, K. Okumura, T. Yamamoto, H.

- Nagaoka, and T. Takemori. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6) Stimulates Extracellular Signaling Kinase (ERK) Activity in CD40 Signaling Along a Ras-independent Pathway. *J. Exp. Med.* 187:237-244, 1998.
2. Akiba, H., H. Nakano, S. Nishinaka, M. Shindo, T. Kobata, M. Atsuta, C. Morimoto, C.F. Ware, N.L. Malinin, D. Wallach, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF- κ B and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 21:13353-13358, 1998.
3. Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo. Apoptosis Signal-regulating Kinase1 (ASK1) Is Essential for JNK/SAPK Activation by TRAF2. *Molecular cell*, 2; 389-395, 1998.
4. Hatakeyama, S., M. Kitagawa, K. Nakayama, M. Shirane, M. Matsumoto, K. Hattori, H. Higashi, H. Nakano, K. Okumura, K. Onoe, R. A. Good, and K.-I. Nakayama. Ubiquitin-dependent degradation of I κ B is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF^{RWD1}. *Proc. Natl. Acad. Sci.* in press, 1999.
5. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasaki, H. Akiba, K. Okumura, and H. Yagita. Involvement of TRAIL in human CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 162; 2639-2647, 1999.
6. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Etoh, K. Okumura, and H. Yagita. Type I interferons regulate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for anti-tumor effect of type I interferons. *J. Exp. Med.* 1999, in press.