

# 東北医科薬科大学

## 審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	トシマ カル 豊島 かおる（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博薬科第 14 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	T 細胞の分化におけるスフィンゴミエリンの発現と その機能的役割
論文審査委員	主査 教授 高橋 知子
	副査 教授 顧 建国
	副査 教授 井ノ口 仁一

## T 細胞の分化におけるスフィンゴミエリンの発現とその機能的役割

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

豊島 かおる

スフィンゴ脂質に分類されるスフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM) やスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid, GSL) は、形質膜上でコレステロールと共に特殊な微小領域 (脂質マイクロドメイン) を形成し、そこにシグナル伝達分子などが局在して形成された“脂質ラフト”構造は、細胞膜上の受容体を介したシグナル伝達やタンパク、脂質分子の相互作用の場として重要な役割をもつと考えられている。

T 細胞は細胞性免疫の中心的役割を担うリンパ球の一群であり、胸腺において多段階の生存・増殖・分化イベントを経て成熟し、末梢組織へ移出して免疫反応を担う。胸腺細胞分化の中でも“正負の選択”と呼ばれるイベントは T 細胞が自己寛容性を獲得する上で最も重要なイベントである。正負の選択を始めとする胸腺細胞の分化イベントは T 細胞抗原受容体 (T cell antigen receptor, TCR) などの膜受容体によって誘導されるシグナル伝達の強度によって制御される。これらのシグナルは細胞膜あるいは膜周辺分子の動的な変化を伴うため、脂質マイクロドメインがその強度や効率を調整するものと考えられる。

これまで脂質マイクロドメインの研究には、ガングリオシド (シアル酸を構成糖にもつ GSL の一群) の中でも GM1 と extended-GM1b に高感度に結合するコレラトキシン-B サブユニット (cholera toxin- B subunit, CTx-B) が多く用いられてきた。しかし、胸腺細胞では末梢 T 細胞と比べてガングリオシドの発現量が低く、発現している GSL の中でも CTx-B 結合性ガングリオシドは少量であることも知られていた。また近年では個々のスフィンゴ脂質分子種が別々のマイクロドメインを形成し特異的な機能をもつと考えられており、胸腺細胞におけ

る脂質マイクロドメインの生理的意義はいまだ未解明である。

本研究では T 細胞の分化過程における SM マイクロドメインの機能を解明することを目的とした。はじめに野生型マウスの胸腺細胞の分化過程におけるフィンゴミエリン発現を解析した。SM 分子が 5-6 分子でクラスター化している状態 (SM マイクロドメイン) のみを特異的に認識するライセニン (Lysenin, Lys) と、一分子で分散している SM に優先的に結合するエキナトキシン (EquinatoxinII, EqII) の 2 種類の SM 結合性タンパク毒素を用いて解析した。その結果、胸腺細胞の SM 発現量は一連の分化過程で大きく変動し、それはセラミドから SM を合成する酵素である SM 合成酵素 1 (sphingomyelin synthase, SMS1) の発現レベルで厳密に制御されていることが示された。特筆すべき点は分化の初期段階から SM 発現は徐々に低下し、正負の選択後に再度大きく増加することである。なかでも分散した SM の増加量は正負の選択前と比べて約 2 倍であったのに対し、SM マイクロドメイン発現量は 10 倍以上増加していた。

正負の選択における SM マイクロドメインの関与が考えられたため SMS1 の欠損マウスを用いてその機能的意義を解析した。SMS1 欠損マウスでは分化に伴う SM 発現の増減が認められず、SM 発現は各分化段階において著しく低下していた。このとき SMS1 の欠損による SM の前駆体であるセラミドや GSL の代償的な増加は認められなかった。次に、このマウスを正負の選択のモデルとなる TCR トランスジェニックマウスと掛け合わせた。正の選択のモデルである TCR トランスジェニックマウス (メス HY TCR Tg, OT- I TCR Tg) の系では、SMS1 欠損により分化後期段階の胸腺細胞数が減少しており、正の選択の低下が認められた。負の選択のモデルである TCR トランスジェニックマウス (オス HY TCR Tg) の系では SMS1 欠損により負の選択の亢進を認めた。これらの現象が TCR 依存性の細胞死か否かを確認するため、胸腺細胞に TCR 刺激を行った結果、SMS1

欠損胸腺細胞ではコントロールと比較して細胞死が亢進することが判明した。さらに *SMS1* 欠損胸腺細胞では、TCR 近位のシグナル分子である ZAP-70 のリン酸化が TCR 刺激に伴い亢進していた。負の選択につながる ERK5 のリン酸化やアポトーシス促進分子である Bim の発現、ERK5 の下流の伝達分子の Nur77 の発現も顕著に増加しており、*SMS1* 欠損胸腺細胞では TCR シグナル伝達が亢進することが判明した。野生型マウスの胸腺細胞に SM を添加した状態で TCR 刺激を行うと、SM の添加濃度依存的に TCR シグナルの減弱と生存率の増加が認められた。以上より、負の選択において SM マイクロドメインは TCR シグナルが誘導する細胞死に抑制的に関与することが明らかとなった。

*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞では TCR シグナル伝達の増強がみられたが、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞の *SMS1* 遺伝子のノックダウン細胞株では、細胞の SM 量が 2 割減少しただけで SM マイクロドメインが消失し、TCR シグナル伝達が減弱することが報告されている。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて Jurkat 細胞に *SMS1* と GSL 合成の初発分子であるグルコシルセラミドの合成酵素 (Glucosylceramide synthase: GlcCerS) の変異を導入し、Jurkat 細胞において SM マイクロドメインが TCR シグナル伝達に対して抑制的か促進的のどちらに働くか再検討するとともに GSL マイクロドメインとの機能を比較した。*SMS1* 変異導入 Jurkat 細胞では SM マイクロドメインの発現が著しく減少しており、このとき TCR 刺激に伴う ZAP-70 のリン酸化の低下や  $Ca^{2+}$  応答の亢進が認められた。一方で *GlcCerS* 変異導入細胞では TCR シグナル伝達の変化は見られなかった。さらに *SMS1* 変異導入 Jurkat 細胞に *SMS1* 遺伝子を再導入すると、SM 発現は mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで回復し、このとき *SMS1* 変異導入細胞で見られた TCR シグナル伝達の亢進は mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した。

本研究により，SM マイクロドメインは TCR シグナル伝達を抑制的に制御していることが明らかとなった．SMS1 欠損胸腺細胞では正負の選択時に SM 発現量が増加しないために，TCR 刺激の閾値が下がり TCR シグナル強度が増強されて負の選択が亢進したと考えられる．このことは TCR シグナル強度の調節に SM に富んだ脂質マイクロドメインが寄与することを示唆している．胸腺細胞分化において SM 発現量の増減は厳密に制御されており，それが微調整されることでシグナル伝達強度が調節され，正負の選択を決定する TCR 刺激の閾値を適正化しているものと考えられる．

自己免疫疾患患者の T 細胞ではマイクロドメイン構成脂質の質的・量的な変化が起こることが報告されている．全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)患者の T 細胞では形質膜のコレステロールや GSL が増加しており，それらの発現を健常人由来 T 細胞と同程度に低下させると T 細胞の機能が回復する．自己免疫疾患患者の T 細胞における SM 発現変化は報告されていないが，炎症が関与するような肥満病態では血清中の SM の質的变化(脂肪酸のアシル鎖長の変化)が起きることが知られている．今後，健常人と自己免疫疾患患者のヒト T 細胞における SM 発現の変化を解析し，自己免疫疾患における SM マイクロドメインの病態生理学的意義を明確にし，新たな診断，治療法の開発につなげていきたい．

<参考文献> 主論文(原著論文)

1. Kaoru Toshima, Masakazu Nagafuku, Toshiro Okazaki, Toshihide Kobayashi, Jin-ichi Inokuchi  
Plasma membrane sphingomyelin modulates thymocyte development by inhibiting TCR-induced apoptosis. *International Immunology*, 2018.  
DOI: 10.1093/intimm/dxy082.
2. 永福 正和, 豊島 かおる, 堀内 隼, 井ノ口 仁一  
スフィンゴミエリンマイクロドメインは Jurkat 細胞の T 細胞抗原受容体依存性活性化を負に制御する. *東北医科薬科大学研究誌*, 65, 印刷中