

論文内容要旨

自己免疫疾患の分子病態解明に向けた

新規 TNFR2 アダプター分子アミノペプチダーゼ P3 の機能解析

主指導教員：小池 透 教授

(基礎生命科学部門 医薬分子機能科学)

副指導教員：木下 英司 准教授

(基礎生命科学部門 医薬分子機能科学)

副指導教員：的場 康幸 准教授

(応用生命科学部門 遺伝子制御科学)

井上 雅己

(医歯薬学総合研究科 薬学専攻)

【はじめに】

腫瘍壊死因子 (TNF) は、様々な炎症性・自己免疫性疾患の病態に関わるサイトカインである。TNF レセプターには TNFR1 / TNFR2 の 2 種類が存在するが、とりわけ TNFR2 は、欠損により関節リウマチモデルマウスなどの病態悪化が認められることや、制御性 T 細胞の活性化に関わることなど、免疫抑制的な作用を担うことが示唆されている。そのため、TNFR2 の機能を明らかにできれば、様々な TNF 関連疾患の分子病態の解明や新たな治療薬開発につながると期待されるが、これまで TNFR2 を選択的に活性化する実験系の確立が困難であったため、細胞内シグナル伝達機構については殆ど分かっていない。そこで本研究では、TNFR2 シグナル伝達機構の解明を目的に、ファージ表面提示法を駆使して独自に作製した、TNFR2 のみを選択的に活性化可能な TNF 構造変異体 (R2-7) を用いて、TNFR2 のアダプター分子の探索を行い、同定された分子と TNFR2 シグナルとの関連性について解析を行った。

【方法・結果・考察】

1) TNFR2 シグナル関連タンパク質の探索

TNFR2 の細胞内シグナルに関わる分子を探索するため、TNFR2 を強制発現させた HEK293T 細胞 (HEK293T-TNFR2) を R2-7 で刺激した後、免疫沈降法により TNFR2 シグナル複合体を回収した。この複合体に含まれるタンパク質群をショットガンプロテオミクス法にて網羅的に解析した結果、TNFR2 の新規アダプター分子としてアミノペプチダーゼ P3 (APP3) の同定に成功した。

2) APP3 の機能解析

アミノペプチダーゼ P は、タンパク質 N 末端の X-Pro 結合を切断する酵素である。APP3 の機能は殆ど不明であり、TNFR2 との関連性は報告がない。そこで、TNFR2 シグナルにおける APP3 の機能解析を行った。

① TNFR2 と APP3 の結合

APP3 には、細胞内局在の異なる 2 つのアイソフォームである Mitochondrial APP3 (APP3m) 及び Cytosolic APP3 (APP3c) が存在する。そこで、TNFR2 と複合体を形成し得るアイソフォームを解析するため、各 APP3 を HEK293T-TNFR2 に強制発現させ、R2-7 で刺激した後、APP3 に対する免疫沈降を行った。ウエスタンブロット (WB) の結果、APP3m 強制発現細胞のみで TNFR2 及び TRAF2 が検出され、TNFR2 複合体に APP3m が結合することが判明した。APP3m は、通常ミトコンドリアに局在するため、TNFR2 シグナルの活性化に伴い、細胞質へ移行する可能性が考えられた。

② APP3 の細胞内局在の変化

APP3m の局在変化を調べるため、細胞質及びミトコンドリアにおける APP3m 存在量の

変化を解析した。HEK293T-TNFR2 を R2-7 で刺激した後、細胞質及びミトコンドリア画し、WB にて検出した APP3m を定量解析した。その結果、APP3m は、時間依存的に細胞質画分で増加し、ミトコンドリア画分で減少することがわかった。

③ APP3 の細胞内シグナル伝達への影響

TNFR2 シグナルへの APP3 の影響を調べるため、関連する細胞内シグナル分子である MAPK (p38/ERK/JNK)、NF- κ B 及び PI3K/Akt について解析した。APP3m を強制発現、並びにノックダウンした HEK293T-TNFR2 を R2-7 で刺激した後、各シグナル分子のリン酸化を WB にて調べた。その結果、APP3m の発現上昇に伴い JNK のリン酸化が亢進した一方、APP3 の発現低下により JNK のリン酸化は抑制された。しかし、その他のシグナル分子への影響は認められなかったことから、APP3m は JNK を介した転写因子の活性化を制御していると考えられた。

④ APP3 の潰瘍性大腸炎への影響

APP3 が潰瘍性大腸炎の病態にどう関与しているかを調べるために、APP 阻害剤である Apstatin を投与した時のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎マウスへの影響を解析した。Apstatin (0.1 mg/kg) を 8 日間連日投与し、その間の体重測定、また 8 日目に摘出した大腸組織の長さの測定及び病理組織の観察を行った。その結果、Apstatin 投与群では、非投与群に比べて、体重の減少や大腸の短縮傾向が認められた。また、病理組織観察では、びらんや炎症細胞浸潤などの悪化が認められ、APP3 の阻害が大腸炎の悪化に関わることが示唆された。

【結論】

本研究では、新たな TNFR2 アダプター分子として APP3 を見出し、その機能解析を行った結果、APP3 による TNFR2 シグナルの新たな制御機構が存在する可能性を示した。今後、さらに TNFR2 シグナルの解析が進展すれば、自己免疫疾患の病態発症機序の解明や新規治療薬の開発に繋がるものと期待できる。