

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790924

研究課題名（和文） 正常人、SLE 患者 T 細胞のオートファジー機能とそのアポトーシスに
 対する役割の解析

研究課題名（英文） Functional analysis of autophagy in T cells of healthy donors and
 SLE patients

研究代表者

藤井 博司 (FUJII HIROSHI)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：30531321

研究成果の概要（和文）：持続的な分裂増殖をするヒトプライマリ T 細胞におけるハイスルー
 プットかつ高感度なフローサイトメトリーによるオートファジーの定量系の開発を行った。上
 記の方法を用いて T 細胞各種細胞ストレス、薬剤によるオートファジー誘導能、オートファジ
 ーの細胞死における機能的意義の解析を行いオートファジーは活性化 T 細胞において細胞死に
 抑制的に働いていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We successfully developed the high thorough-put and high sensitive
 method to measure autophagic activity of human activated T cells on flow cytometry. Using
 this method, we analysed the functional significance of autophagy for stress by cell
 replication, drugs. We confirmed that autophagy had inhibitory effects on apoptotic cell
 death of activated T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病アレルギー内科学

キーワード：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

免関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、
 血管炎症候群などの膠原病では自己免疫的

機序に起因する慢性炎症により病変が形成
 されていると考えられている。中でも T 細胞、
 B 細胞の持続的な刺激、分裂はその炎症の維

特に重要と考えられており、cyclosporin A、FK506、CTLA4-Ig (abatacept)、抗 BAFF 抗体 (belimumab) などの各々の細胞の刺激を特異的に阻害する薬剤は上記膠原病の治療にすでに応用されている。持続的（時に爆発的に）分裂増殖する T 細胞、B 細胞は様々な細胞ストレス（酸化ストレス、栄養ストレス、エネルギーストレス、DNA ダメージ、テロメア長の短縮、ER ストレス）に曝されることになり、細胞はそれらストレスに対抗する機構を備えているが、それらが不十分な場合リンパ球はアポトーシスによる細胞死を起こす。申請者は、分裂増殖する T 細胞のテロメラーゼ、DNA 修復系、解糖系の誘導とその機能的意義について研究を行ってきた。特に関節リウマチ患者 T 細胞はテロメラーゼの誘導、DNA 修復系が不十分なため刺激分裂後、より多くの細胞死が誘導されることを見出した。テロメラーゼ、DNA 修復系、解糖系の誘導以外にも、慢性炎症におけるリンパ球の細胞ストレスに対抗する機構を制御することにより膠原病の治療につながる可能性を考えている。

オートファジーは細胞質、もしくは細胞内小器官が二重の脂質膜に取り込まれてライソゾームにより消化、融解されていく現象であり、タンパク質のリサイクリングや飢餓状態でのエネルギー産生を行う。オートファジーは各種細胞において栄養飢餓状態、エネルギーストレス、酸化ストレスなどにより誘導されることが報告されており、持続的に分裂増殖する細胞において、細胞ストレスに対抗する機構として重要と考えられている。申請者は活性化ヒトプライマリリンパ球におけるオートファジー誘導の機序と意義に着目し、その制御による膠原病治療への応用の可能性を追求したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究はヒト T cell line とプライマリ T 細胞を用いて、高感度なオートファジーの系を開発する。エネルギーストレス下でのオートファジーの定量とその役割、特にアポトーシスとの関連についての解析を行うことを主目的とする。

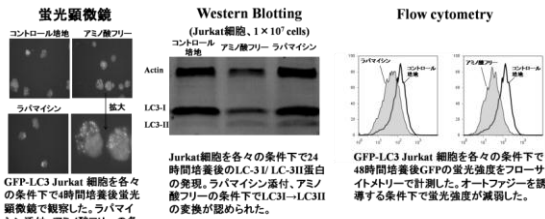
3. 研究の方法

オートファジーを検知する融合タンパク GFP-LC3 をレトロウィルスベクターを用いてヒト活性化 T リンパ球に発現させ、GFP の減衰をフローサイトメトリーで解析することによりオートファジーの定量を行う。また、オートファジー必須のタンパクである ULK-1 の dominant negative 変異体である ULK-1K46I をレトロウィルスベクターで発現させることによりオートファジーを特異的に抑制する系を確立する。

4. 研究成果

(1) GFP-LC3 発現 Jurkat 細胞の樹立とフローサイトメトリーによるオートファジーの定量

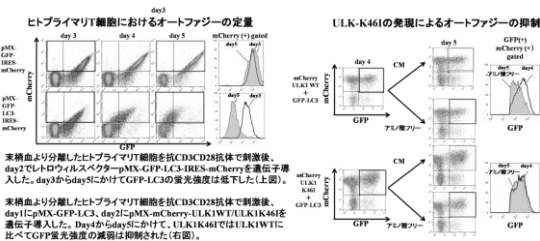
レトロウィルスベクター pMX-GFP-LC3 を Jurkat cell に stable に遺伝子導入し GFP 陽性の分画をフローサイトメトリーでソート後、クローニングした。この細胞は従来オートファジーを誘導するとされているラパマイシン、アミノ酸フリー培地においてオートファジーが誘導されることをウェスタンブロットティング、蛍光顕微鏡で確認した。同じオートファジー誘導条件下で GFP-LC3 の蛍光強度は著明に低下した（下図）。このことから GFP-LC3 融合タンパク発現系で GFP の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定することによりオートファジーを定量できると考えられた。



(2) ヒトプライマリ T 細胞における GFP-LC3 の発現系の確立、オートファジーの定量とその機能解析

ヒト末梢血より MACS ビーズにて T 細胞を分離、抗 CD3CD28 抗体にて刺激後 2 日目にレトロウイルスベクター

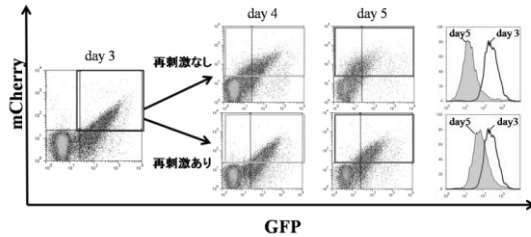
pMX-GFP-LC3-IRES-mCherry を T 細胞に stable に遺伝子導入する。刺激後 4 日目、5 日目と GFP-LC3 の蛍光強度は著明に減衰し、刺激後分裂する T 細胞はオートファジーが誘導されていることが示された (下図)。また、オートファジーに必須のタンパクである ULK-1 の dominant negative 変異体 ULK-1K46I をレトロウイルスベクターで共発現することにより GFP-LC3 の減衰は阻害され、遺伝子操作による特異的なオートファジー阻害系が確立された。



(3) 活性化ヒトプライマリ T 細胞における最も刺激によるオートファジーの制御

(2) で示した刺激後 3 日目から 5 日目にかけてのオートファジーの誘導は 3 日目に T 細胞を再刺激することにより阻害された (下図)。このことから T 細胞の再刺激によりオートファジーを抑制する遺伝子が誘導されている可能性がある。

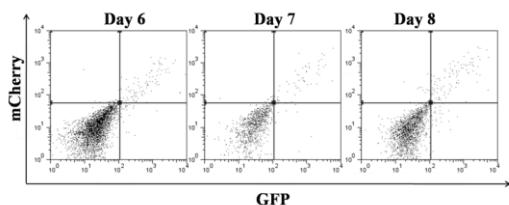
ヒトプライマリT細胞の再刺激によるオートファジーの抑制



(4) ヒトプライマリ B 細胞における GFP-LC3 の発現系の樹立。オートファジーの定量とその機能解析

ヒト末梢血より B 細胞を MACS ビーズで分離後、CpG, IL-2, IL-10, IL-15 で刺激することにより B 細胞は分裂増殖する。T 細胞と同様に pMX-GFP-LC3-IRES-mCherry を導入できたが刺激後 GFP の蛍光強度はあまり変化がなく B 細胞においては刺激分裂のみではオートファジーはあまり誘導されなかった。この後、さらに IL-6、抗 CD40L 抗体を用いることにより CD138 陽性の IgG 産生細胞へと分化誘導できる系をすでに確立しているが、その過程のなかでオートファジーが誘導されるかどうかを解析する。また、ULK-1K46I を強制発現しオートファジーを抑制することにより形質細胞への分化、抗体産生能におけるオートファジーの役割を解明する。

ヒトプライマリB細胞におけるオートファジーの定量



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ①白井剛志、藤井博司、中村恭平、渡部龍、田島結実、高澤徳彦、石井智徳、張替秀郎
顕著な脳炎を呈した中枢神経ループス患者における新規抗 EphB2 自己抗体の同定
第 56 回日本リウマチ学会総会 2012/4/28
東京
- ②渡部龍、藤井博司、白井剛志、田島結実、高澤徳彦、石井智徳、張替秀郎
フローサイトメトリーを用いたヒトプライマリ T 細胞におけるオートファジーの定量と機能解析
日本分子生物学会第 12 回春季シンポジウム 2012/4/25 山梨
- ③Shirai.T, Fujii. H., Ono.M, Takasawa.N, Ishii.T, Harigae.H.
Retroviral vector system identified FLRT2 as a novel cell surface autoantigen against anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus.
米国リウマチ学会(ACR) 2011/11/5
シカゴ
- ④白井剛志、藤井博司、中村恭平、渡部龍、田島結実、高澤徳彦、石井智徳、張替秀郎
レトロウィルスベクターシステムを用いた抗血管内皮細胞抗体対応自己抗原 FLRT2 の同定
第 55 回日本リウマチ学会総会 2011/7/19
神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博司 (FUJII HIROSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 30531321

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者