慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	The p85α regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates β-selection in thymocyte development
Sub Title	クラスIA PI3-キナーゼの制御サブユニットp85αの胸腺T細胞成熟過程におけるβ-セレクションへの関与
Author	白木, 文子
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.16-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0016

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

The p85α regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates β-selection in thymocyte development

（クラスIA PI 3-キナーゼの制御サブユニットp85αの胸腺T細胞成熟過程におけるβ-セレクションへの関与）

白　木　　文　子

内容の要旨

胸腺T細胞は、最も未熟なCD4$^-$CD8$^-$細胞（DN）からCD4$^+$CD8$^+$細胞（DP）を経て、最終的にCD4$^+$CD8$^-$もしくはCD4$^-$CD8$^+$の成熟細胞（SP）へと分化する。この過程において、αβ鎖のT細胞受容体（TCR）が機能的か否かの２段階のセレクションを受ける。すなわち、DNからDPへの分化過程におけるpre-TCRによるβ-セレクション、およびDPからSPへの分化過程におけるTCRによる正負の選択である。本研究では、この２段階のセレクションのそれぞれにおけるクラスIA PI 3-キナーゼ（PI3K）の機能解析を行った。クラスIA PI3Kは、リンパ球においては、主として制御サブユニットp85αおよび触媒サブユニットp110δからなるヘテロダイマーとして機能していることが知られている。まず、制御サブユニットp85αのDNからDPへの分化への関与を検証するために、p85α$^{-/-}$マウスとRag-2$^{-/-}$マウスをかけ合わせ、β-セレクションの*in vivo*モデル実験を行った。Rag-2$^{-/-}$マウスの胸腺T細胞はDN段階で分化が停止しているが、Rag-2$^{-/-}$マウスに抗CD3ε抗体を投与することで、その刺激がpre-TCRシグナルの代わりとなってDP段階まで分化が進行する。抗CD3ε抗体投与後のp85α$^{+/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスにおいてはDPへの分化が制御されており、細胞数もp85α$^{+/+}$Rag-2$^{-/-}$マウスの場合に比べ減少していた。また、単一のTCRのみを発現するTCRトランスジェニックマウス（DO11.10）、Rag-2$^{-/-}$マウスならびにp85α$^{-/-}$マウスの交配により作製したマウス（p85α$^{-/-}$DO11.10Rag-2$^{-/-}$）を解析した結果、正負の選択への異常はないものの、DP細胞の絶対数が減少するという表現型が認められた。次に、触媒サブユニットp110δの特異的阻害剤であるIC87114の存在下・非存在下に胎児胸腺器官培養（FTOC）を行った。T細胞の分化段階がDNにある14.5日期胚の胎児胸腺を５日間器官培養することで、DPまでの分化過程を解析可能であるが、IC87114を加えた場合には、このDPへの分化が抑制された。一方、すでにDP段階にある17.5日期胚の胎児胸腺T細胞は、IC87114を加えたにもかかわらず、加えてない場合と同様にSPへと分化が進んでいた。さらに、クラスIA PI3Kと拮抗的に機能するPtenの胸腺特異的欠損マウスを用いて、β-セレクションの*in vivo*モデル実験を行った。抗CD3ε抗体投与後のPten$^{-/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスでは、対照となるPten$^{+/+}$Rag-2$^{-/-}$マウスの場合と比べ、DNからDPへの分化の促進・細胞数の増加が認められた。以上の結果から、クラスIA PI3KはDPからSPへの分化過程にはほとんど関与せず、pre-TCRの刺激によるDNからDPの分化過程に特異的な役割を担うことが明らかとなった。

論文審査の要旨

本論文では胸腺内におけるＴ細胞の分化過程に脂質キナーゼの一つであるクラスIA-PI3-キナーゼ（以下PI3K）がどのような機能を持つかを検討した。具体的にはPI3Kの制御サブユニットであるp85αのノックアウトマウス（以下PI3Kノックアウトマウス）やT細胞受容体（TCR）トランスジェニックマウスなどを用いてT細胞の分化を検討した。ダブルネガティブ細胞からダブルポジティブ細胞への移行には機能的なTCRβ鎖の再構成が必須であり、再構成したTCRβ鎖を含むプレTCRを介したシグナルが伝達されて細胞増殖とTCRα鎖の再構成が誘導される。このチェックポイントをβ-セレクションと呼ぶ。本研究から、PI3Kがβ-セレクションに関与すること、その一方でダブルポジティブ細胞からシングルポジティブ細胞への分化段階でTCRの特異性や自己反応性をチェックするポジティブセレクションやネガティブセレクションには必要でないこと、などを明らかにした。

審査では、ダブルネガティブＴ細胞からダブルポジティブＴ細胞への分化に有意差があるとはいえ分化が停止するわけではないことから、PI3Kの生理的な機能をどのように解釈すべきなのか、が問われた。これに対し、PI3Kが細胞増殖や生存にかかわる可能性や分化の引きがねにかかわる可能性があり、これらを区別する実験を計画中であると回答された。また、用いたPI3Kノックアウトマウスにおいてはは T細胞のみならず他の細胞でもp85αが欠損しており、観察された表現型が上皮細胞などのストローマ細胞の表現型による可能性に関して質問された。これに対しては、その可能性は否定しきれないが、さらに検討するために培養ストローマ細胞を用いた実験を行い、予備的にはT細胞におけるPI3Kの活性が重要であるという結果を得ていると回答された。また、上皮細胞におけるPI3Kの機能に関しては自分ではデータをもっていないと回答された。さらに、p85αのノックアウトによって酵素活性がどの位低下しているかを評価したかが質問された。これに対して、試みはしたが胸腺細胞においてPI3Kの産物であるPIP3の検出は極めて難しく、成功していないと回答された。PI3Kの逆反応を司る脱リン酸化酵素であるPtenの欠損によってどのような表現型が得られるかとの質問には、これまでに自己免疫反応の惹起やダブルポジティブ型の胸腺腫の発症などが報告されていると回答された。事実この研究においてもT細胞特異的にPtenを欠損させた場合、異常な表現型を持つダブルポジティブ細胞がある頻度で出現することが観察されたことが報告された。以上の観察を背景にして医学的にはどのような応用が考えられるか、という質問に対しては、直接PI3Kを標的にすることは難しく、下流のシグナル伝達系を含めた分子機構を解明し、より特異的な標的を探しだすことが重要であると回答された。Notchシグナル経路とＴ細胞白血病の関係が注目されていることから、PI3Kの上流に関しても質問され、これに対して培養ストローマ細胞にNotchのリガンドを発現させた型を用いた研究を計画中であると回答された。

本研究は、さらに詳細な分子機構を解明する必要があるとはいえ、T細胞の分化におけるPI3Kの機能を示したことで価値があると評価された。

論文審査担当者　主査　微生物学・免疫学　小安　重夫
発生・分化生物学　須田　年生　　皮膚科学　天谷　雅行
微生物学・免疫学　石川　博通
学力確認担当者：
審査委員長：須田　年生

試問日：平成19年 1月17日