

ヒト T 細胞におけるインターロイキン-12 の GMEB1, PI3K/Akt を介した抗アポトーシス作用

川邊 清一

東邦大学医学部内科学講座神経内科学分野 (大森)

要約 : Interleukin (IL)-12 は pro-inflammatory cytokine の 1 つで T 細胞の分化や増殖などに重要な働きをしている。Glucocorticoid modulatory element binding protein (GMEB) 1 と GMEB2 は glucocorticoid receptor (GR) に影響し glucocorticoid の作用を調節する機能があり, caspase-2, -8, -9 と結合し抗アポトーシス効果を示すことが報告されている。また, 今回の研究に先だて行われたヒト T 細胞を用いた実験において IL-12 は GMEB1 と GMEB2 の発現を上昇させることが分かっていた。今回われわれは IL-12 がヒト T 細胞において GMEB1, 2 の発現を増加させ, glucocorticoid によるアポトーシスを抑制することを発見した。また, IL-12 は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway を介した抗アポトーシス効果もあることが分かったのでそれらの実験結果について概説する。

東邦医学会誌 59(3) : 147-149, 2012

KEYWORDS : interleukin-12, glucocorticoid modulatory element binding protein, apoptosis

Glucocorticoid (GC) は抗炎症薬や免疫抑制薬として広く使われており, T 細胞のアポトーシスを引き起こすことが知られている。今回われわれは interleukin (IL)-12 が GC によるヒト T 細胞のアポトーシスを抑制するその機構を明らかにしたので概説する。

Glucocorticoid と免疫担当細胞のアポトーシス

GCs は生命維持に必要な homeostasis や代謝を保つのに不可欠なホルモンの 1 つであるが, 免疫系への作用も有する。GC 製剤は GC の欠乏状態を補う治療以外にも免疫抑制や抗炎症剤として, 炎症性疾患, 自己免疫性疾患, アレルギー疾患の治療に一般診療で広く用いられている。GC は免疫系反応に対する作用についてはさまざまな効果が報告されている。免疫担当細胞表面所の接着分子を down-regulation したり, cytokine の signal 制御, regulatory T cell (Treg) の分化に必要な foxp3 の発現を増加させたりする作用が知られている。さらに, GC は thymocyte, monocyte, macrophage, T 細胞や B 細胞をアポトーシスさせる作用がある。これらの作用は GC が細胞内の glucocorticoid receptor (GR) に結合することで前記の細胞のアポ

トーシスの pathway が活性化されアポトーシスを引き起こすと考えられている¹⁾。

GMEB1, GMEB2

Glucocorticoid modulatory element binding protein (GMEB)1 と GMEB2 は KDWK 蛋白ファミリーの一員で heterodimer を形成して DNA に結合する。GR を介して GC の作用を調整する作用があることが知られている²⁾。また, GMEB1 と GMEB2 はアポトーシスの main pathway である caspase-2, -8, -9 と結合し caspase を介するアポトーシスを抑制する作用があることが近年報告された³⁾。

Interleukin (IL)-12

IL-12 は p35 と p40 の 2 つの subunit からなる heterodimer で cell mediated immune response のキーとなるサイトカインの 1 つで, naïve CD4⁺ T 細胞を Th1 細胞に分化させる作用や, 細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T-lymphocyte : CTL) とナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞の cytotoxic function を活性化させる作用も有する。IL-12 の受容体 IL-12R は T 細胞, CTL, NK 細胞の

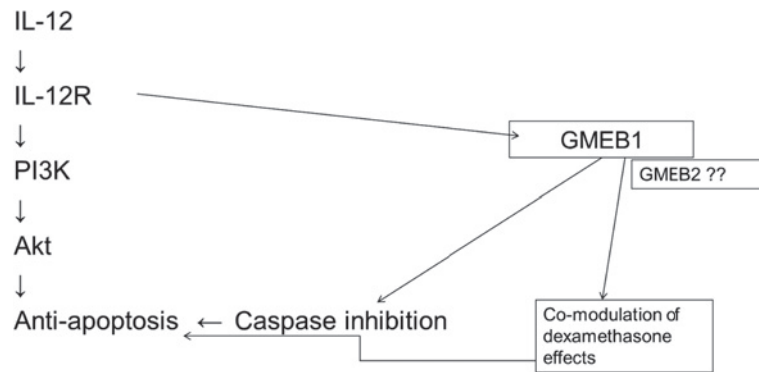


図1 IL-12によるヒトT細胞に対する抗アポトーシス効果

IL: interleukin, GMEB: glucocorticoid modulatory element binding protein

PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

細胞膜にあり、IL-12が結合するとJak2やTyk2を介してシグナルが伝達される。活性化されたJak2はsignal transducer and activator of transcription (STAT)4をリン酸化しリン酸化されたSTAT4がインターフェロン γ (IFN- γ)などIL-12に反応する遺伝子のDNAに結合しこれらを発現させる。また、IL-12Rからの刺激はphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signal pathwayも活性化しT細胞の生存や抗アポトーシス作用を呈することが報告されている⁴⁾。しかし、GCによって引き起こされるアポトーシスに対するIL-12の効果については知られていなかった。

また、今回の研究に先だて行われたマイクロアレイを用いた研究でIL-12がGMEB1とGMEB2を発現させることを発見していた。

1. IL-12はGCによるT細胞のアポトーシスを抑制する

まず、IL-12がGCによって引き起こされるT細胞のアポトーシスを抑制するかどうか調べた。3人のボランティアから採血を行いperipheral blood mononuclear cell (PBMC)を分離しphytohemagglutinin (PHA)とIL-2を用いてT細胞blastを得た。得られたT細胞はアポトーシスを引き起こすために培養液中にdexamethason (DEX)を加え、さらにIL-12の効果を見るために培養液中にはIL-12を加えたものと加えないもので比較した。24時間培養後T細胞のマーカーであるCD3を染色し、生存細胞、アポトーシス細胞、死細胞の割合をAnnexin-PI assay kit[®] (Beckman Coulter, Inc., High Wycombe, Buckinghamshir, UK)を用いて測定した。アポトーシス細胞と死細胞の割合はIL-12を加えたものでは加えなかったものと比べて有意に減少した。

2. IL-12はGMEB1とGMEB2の発現を増加させる

次にIL-12が抗アポトーシス作用とGCの調節機能を有するGMEB1, GMEB2の発現に影響するか実験した。ボランティアから採血して得られたPBMCからT細胞を分離し培養液中にIL-12を加えて24時間培養した。培養し

た細胞から messenger ribonucleic acid (mRNA) を分離し quantitative polymerase chain reaction (qPCR) を行ったところ GMEB1 の mRNA の発現は 2.82 ± 1.14 倍、GMEB2 は 2.57 ± 0.31 倍それぞれ IL-12 で刺激しなかったものと比べて増加していた。

3. IL-12の抗アポトーシス効果はGMEB1をknock-downすることで抑制される

IL-12の抗アポトーシス効果がGMEB1, GMEB2を介しているのか調べるため small interfering RNA (siRNA) を用いてGMEB1とGMEB2をknockdownして実験を行ったところ、GMEB1をknockdownしたPBMCではIL-12による抗アポトーシス効果は抑制されていた。しかし、GMEB2をknockdownした細胞では明らかな抗アポトーシス効果の抑制はみられなかった。

4. PI3K/Aktを介するIL-12の抗アポトーシス機能

IL-12は動物の細胞を使った実験でPI3K/Akt signal pathwayを介して抗アポトーシス効果を示すことが報告されている。ヒトT細胞でもPI3K/Akt signal pathwayを介したIL-12の抗アポトーシス効果がみられるか実験を行った。ボランティアからPBMCを分離しDEXでアポトーシスを誘導した。培養液中にIL-12とPI3Kの特異的な阻害薬であるLY294002 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)を加えて24時間後に死細胞とアポトーシスを起こした細胞の割合を測定した。IL-12を加えたPBMCではDEXによるアポトーシスは減少したが、IL-12とLY294002を加えたPBMCではIL-12のみに比べて有意に死細胞、アポトーシス細胞が増加した。この結果からIL-12はPI3K/Akt pathwayも介して抗アポトーシス効果を起こすと考えられた。

まとめ

ヒトT細胞におけるIL-12の抗アポトーシス効果の分子機構を明らかにした(図1)。IL-12は炎症や免疫反応にお

いて重要なT細胞の生存に大変重要な働きを有している。抗炎症薬や免疫抑制剤としてGCは一般臨床で広く使われているがIL-12はGCの効果を抑制する作用があることが考えられ、その経路であるGMEBやPI3K/Aktに作用するような新たな薬剤が開発されればGCの効果を増強させるような新たな治療法になる可能性が示唆された。

本研究の一部は柳瀬奨学金の援助で行われた。

文 献

- 1) Zen M, Canova M, Campana C, et al.: The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev* **10**:305-310, 2011
- 2) Zeng H, Kaul S, Simons SS Jr: Genomic organization of human GMEB-1 and rat GMEB-2: Structural conservation of two multifunctional proteins. *Nucleic Acids Res* **28**: 1819-1829, 2000
- 3) Nakagawa T, Tsuruma K, Uehara T, et al.: GMEB1, a novel endogenous caspase inhibitor, prevents hypoxia- and oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Neurosci Lett* **438**: 34-37, 2008
- 4) Yoo JK, Cho JH, Lee SW, et al.: IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4⁺ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Immunol* **169**: 3637-3643, 2002