

未熟胸腺細胞増殖因子の発見

小濱 靖弘

Discovery of Immature Thymocyte Proliferation Factor

Yasuhiro KOHAMA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received January 5, 2006)

An athymic mouse-derived immature T-cell clone, N-9F, was not maintained by interleukin-2 alone but required another soluble factor, contained in concanavalin A-stimulated rat splenocyte culture supernatant, namely T cell growth factor (TCGF), for its proliferation. An N-9F-proliferation factor (NPF) was isolated in a pure form from TCGF. N-9F cells and immature thymocytes proliferated in the presence of N-9F at 10^{-12} – 10^{-9} M in a dose-dependent manner, but adult thymocytes were not stimulated by NPF. NPF increased DNA synthesis of N-9F. NPF increased CD4 and CD8 double negative, single positive and double positive thymocytes in fetal thymus organ culture. A hamster anti-NPF antiserum possessing the capacity to neutralize N-9F proliferation activity of NPF neutralized the increasing effect of NPF on immature thymocytes. All effects of NPF was inhibited by mAb QR6.6 to recognize a 100kDa surface molecule of N-9F. The amino-terminal 20 amino acid sequence of NPF was identified and identical to that of rat saposin A. The apparent molecular weight of NPF, 16000, was comparable to that of saposin A. A Hitrap-mouse recombinant His-tag-saposin A antibody column bound NPF, pulled down the NPF activity in TCGF, and the antibody recognized a 16kDa molecule in western-blotting of TCGF. Thus, NPF in TCGF was a saposin A-like protein possessing the capacity for growth and differentiation of immature thymocytes. The physiological significance of NPF in the growth and differentiation of immature thymocytes was discussed in view of the characteristic distributions of NPF and the molecule recognized by its mAb QR6.6 in fetal thymi.

Key words—immature thymocyte; immature thymocyte proliferation factor; differentiation; TCGF; cell cycle; FTOC

1. はじめに

免疫系の細胞はすべて骨髄中の造血幹細胞から生じる。共通リンパ系前駆細胞から T 細胞へと分化する細胞は骨髄から胸腺へ移入する。T 細胞の分化・成熟には胸腺微小環境の役割が重要とされているが、胸腺非リンパ系細胞と T 細胞間の相互作用に関するメカニズムには未知の点が多く残されている。¹⁻⁷⁾ 胸腺非リンパ系細胞は、上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞、繊維芽細胞を始め、様々な細胞から成り立っており、これらを総称して胸腺ストローマ細胞 (TSC) と呼んでいる。以前から、T 細胞が成熟するには TSC に直接接触することが必要であると報告されている。^{4,8)} また一方で、TSC が

T 細胞に対して様々な成長、分化因子を分泌するという報告もある。山元らは、T 細胞の分化・成熟における TSC の役割に関する研究の一端として、ヌードマウス由来の T 細胞クローン (N-9F) を樹立した (Fig. 1)。⁸⁾ N-9F は CD4, CD8 ダブルポジティブ (DP) の未熟 T 細胞であり、full length の γ , δ T cell receptor の mRNA を発現している。N-9F は TSC に応答して増殖し、IL-2 を添加するとさらに増殖が誘導される。また、N-9F は concanavalin (Con) A 刺激脾細胞培養上清 (TCGF) 中に含まれる IL-2 以外の可溶性因子によって TSC 非存在下で増殖し、これらの増殖は N-9F 上の 100 kDa の糖蛋白を認識するモノクローナル抗体 (mAb) QR6.6 により抑制されることを見出している (Table 1)。¹¹⁾ MAb QR6.6 は N-9F をラットに免疫して得られたモノクローナル抗体 (mAb, IgM) で、その認識する分子は免疫系の組織では胸腺のみに存在する。この分子は胎児期に高発現し (胎齢 17 日には 70% の

大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: kohama@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成 17 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

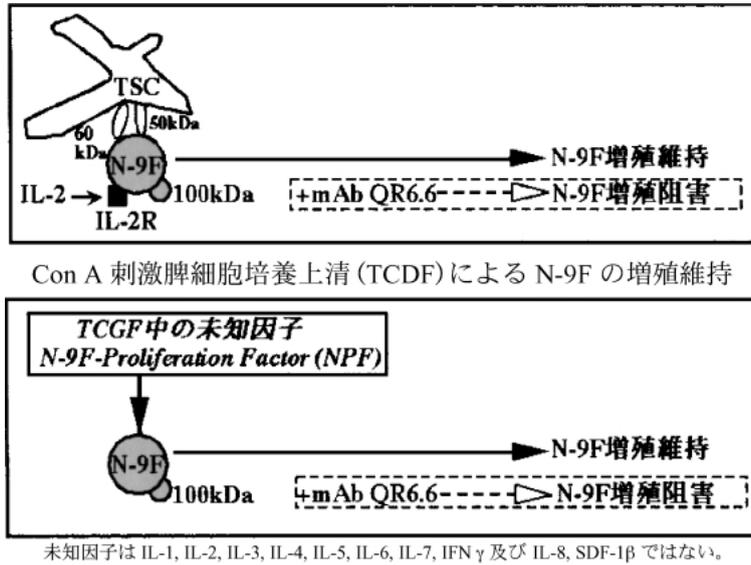


Fig. 1. The Roles of TSC, Its mAbs, 50 kDa and 60 kDa, mAb QR6.6, Its 100 kDa Antigen on N-9F and IL-2-IL-2R in N-9F Proliferation

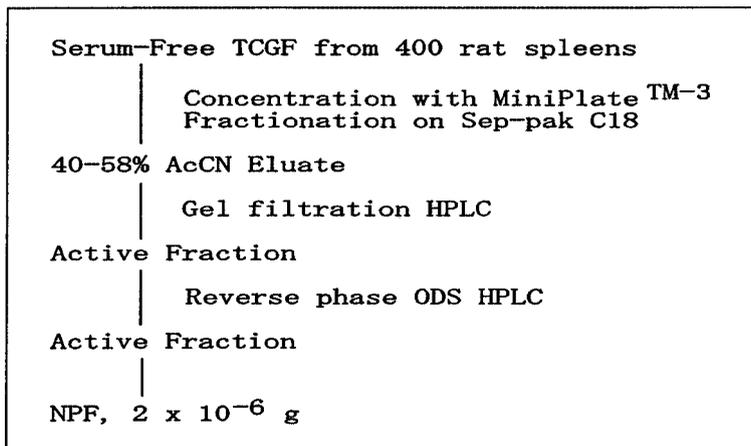


Fig. 2. Isolation of NPF

胸腺細胞が mAb QR6.6 陽性), 成マウスではその発現はわずかになる。MAb QR6.6 陽性細胞は胎児では CD4, CD8 ダブルネガティブ (DN), 成マウスでは DN 及び DP な未熟胸腺細胞であることから (Table 2), この mAb QR6.6 により認識される分子は T リンパ球の分化・成熟に関与していると思われる。

N-9F は Con A 刺激ラット (若しくはマウス) 脾細胞培養上清 (T-cell growth factor, TCGF) により増殖維持される (Fig. 3)。一方, N-9F はいずれのヒト及びマウスリコンビナントリンフォカイン (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, インターフェロン- γ)

やケモカイン (IL-8, SDF-1 β) により増殖維持されないことを認めている。⁸⁾そこで, 今回 TCGF 中の N-9F 増殖因子を試み, 本因子 (N-9F-proliferation factor, NPF) を単離するとともに,¹²⁾ NPF と mAb QR6.6 陽性分子との関連性, 未熟胸腺細胞機能調節機序及び胸腺内局在性を検討し, NPF の未熟胸



小濱靖弘

大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学助教授, 1943 年生まれ, 大阪市出身。大阪大学薬学部卒業, 同大学院薬学研究科修了, 薬学博士。米国プリンストン大学生物学部留学, 大阪大学薬学部助手を経て, 1988 年より現職。2006 年 3 月末をもって退官。

Table 1. Immature T-cell Clone, N-9F⁸⁻¹¹⁾

1. 無胸腺マウス脾臓から樹立された CD4⁺CD8⁺ 細胞株である。
2. H-2 同種マウスの胸腺ストローマ細胞 (STC) 上で増殖するが、脾臓細胞、胎児繊維芽細胞及び腹腔浸出細胞上では増殖しない。
3. STC 上での増殖は STC の 50 kDa 及び 60 kDa 細胞表面分子に対する mAb により阻害される。
4. STC 上での増殖は N-9F の 100 kDa 細胞表面分子に対する mAb QR6.6 により阻害される。
5. STC 上で IL-2 添加により IL-2 レセプターを発現誘導し、増殖が促進される。
6. STC 非存在下では、IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- γ 及び SDF- β より増殖刺激を受けない。
7. Concanavalin A 刺激脾臓細胞培養上清 (TCGF) により増殖維持される。
8. TCGF による増殖維持も mAb QR6.6 により阻害される。

Table 2. Characterization of MAb, QR6.6¹¹⁾

1. N-9F の 100 kDa 細胞表面分子に対する mAb である。
2. N-9F の STC 上での増殖、TCGF による増殖維持を阻害する。
3. QR6.6 と反応する (陽性) 分子は胸腺に存在するが、リンパ節、骨髄、脾臓等の免疫系組織には存在しない。
4. QR6.6 陽性分子は成マウス胸腺細胞の 3—5%、新生児胸腺細胞の 10—20%、胎齢 17 日胎児胸腺細胞の 70%、胎齢 15 日胎児胸腺細胞の 10—20% を占める。
5. QR6.6 陽性分子は胎児の CD4⁻CD8⁻ 胸腺細胞、成マウスの CD4⁻CD8⁻ から CD4⁺CD8⁺ 胸腺細胞である。

腺細胞増殖因子としての位置付けを攻究、考察した。

2. 未熟胸腺細胞増殖因子 NPF の分離と同定

ラット 400 匹分の脾細胞から調製した血清無添加 TCGF を原料とし、N-9F の増殖活性及びその活性の mAb QR6.6 による抑制作用を指標に分離精製を行った。まず、TCGF を Mini PlateTM-3 で 10 倍濃縮後 Sep-pak C18 カートリッジを用い、40—53% AcCN 溶出画分を得、さらにゲル濾過及び逆相系を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製し、TCGF 中の可溶性因子 NPF の単離に成功した (Figs. 2, 3, 4)。収量は原料蛋白の 1/10⁷ の 2 μ g という微量であった。ゲル濾過及び SDS-PAGE から推定される分子量は 16 kDa であった。アミノ酸シーケンスを解析した結果、N 末端側のアミノ酸 20 残基 (Ser-Leu-Pro-Cys-Asp-Ile-Cys-Lys-Thr-Val-Val-Thr-Glu-Ala-Cys-Asn-Leu-Leu-Lys-Asp-) を同定した (Fig. 5)。このアミノ酸配列を BLAST search を用いて検索した結果ラット (マウス) sphingolipid activator protein subunit, saposin A の N 末端側のアミノ酸配列と一致した (Fig. 5)。¹³⁻¹⁵⁾ ラット及びマウス saposin A は、84 アミノ酸残基からなり、23 及び 35 番残基以外のアミノ酸配列は全く同じである。また、高度にグリコシレーションされており、分子の約半分を糖鎖が占める。¹⁶⁾

そこでマウス saposin A cDNA から大腸菌にリコンビナント His-tag-saposin A (mrH-saposin A) を

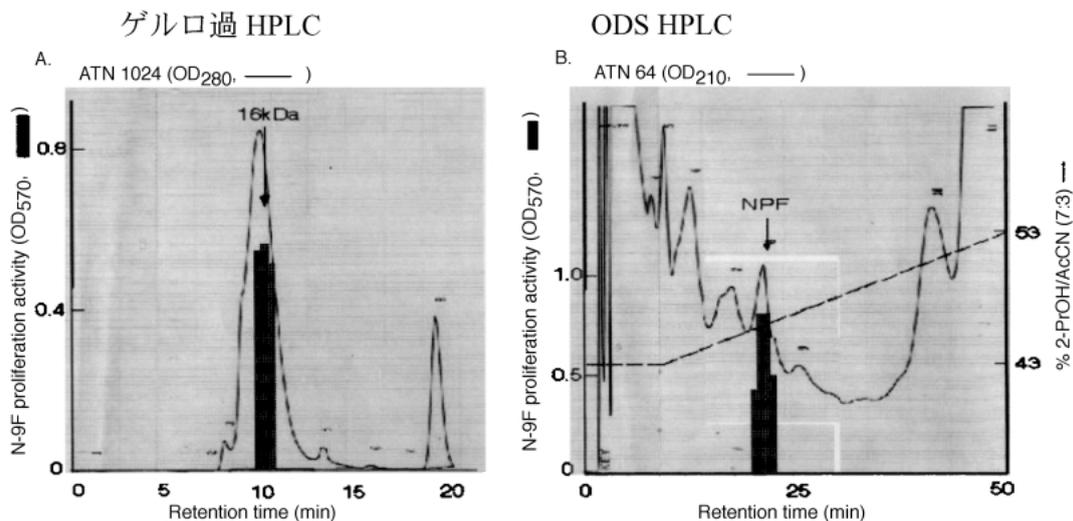


Fig. 3. Purification of NPF

A: Asahipak GS-320 HPLC of active Sep-pak C18 fraction using PBS as a solvent. B: Cosmosil C18 HPLC of active Asahipak GS-320 fraction. The elution was done with a linear gradient of increasing concentrations of 2-PROH/ACCN (7 : 3) in 0.05% TFA. An aliquot of each fraction was subjected to the proliferation assay of N-9F by an MTT method.

発現させ、¹⁷⁾ 精製分離した mr-saposin A の N-9F 増殖活性を測定するとともにウサギ抗 mrH-saposin A 抗体を作製した。MrH-saposin A は N-9F 増殖活性を示さず、またウサギ抗 mrH-saposin A 抗体は TCGF 中の NPF 活性を中和しなかった。一方、ウサギ抗 mrH-saposin A 抗体は TCGF の western blotting において NPF の分子量と一致する 16 kDa の分子を認識した (Fig. 6)。

Figure 6 において、12 kDa のバンドは、対照の OVA でもみられるので、非特異的なものと判断された。さらに、Hitrap- ウサギ抗体 affinity カラムを

作成し、このカラムが TCGF 中の NPF 活性を結合することを確認した後 (Fig. 7)、これを用いて TCGF 中の NPF 活性の pull-down assay を行った。すなわち、serum-free TCGF を Hitrap- 抗 mrH-saposin A 抗体 affinity カラムにかけ、結合及び非結合分画に分け、2.5% TCGF に相当する濃度で NPF-proliferation assay を行った。さらに、順次非結合分画を同じカラム (結合分画を溶出後) にかけ、結合及び非結合分画に付き assay を行った。その結果、第 1 回及び第 2 回目の結合及び非結合分画には N-9F 増殖活性がみられたが、第 3 回目の両分画に

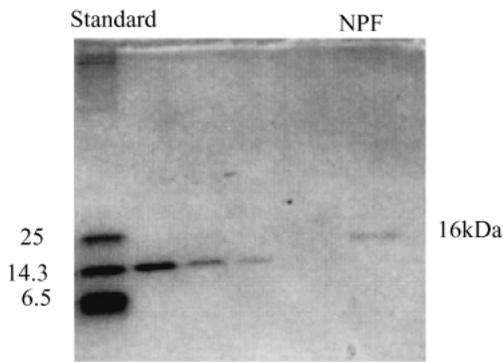


Fig. 4. SDS-PAGE of NPF
NPF was subjected to electrophoresis on a 17% gel and detected by silver staining. From left, the first lane was protein MW standard, the second lysozyme (50 ng), the third lysozyme (25 ng) and the fourth lysozyme (12.5 ng). The right lane was NPF.

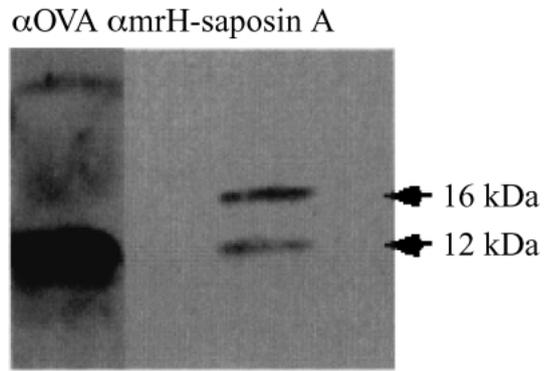


Fig. 6. Western Blotting of TCGF with Rabbit Anti-mrH-saposin A Antibody
Serum-free TCGF concentrated 10-fold was used as TCGF. αOVA: rabbit anti-ovalbumin immunoglobulin G, αNPF: rabbit anti-mrH-saposin A immunoglobulin G.

| Amino acid sequence | MW |
|---|---------------|
| Rat saposin A | 16 kDa |
| 1 SLPCDICKDV VTEAGNLLKD NATEEEILHY LEKTC A WIHD 84 | |
| SSLSASCKEV VDSYLPVILD MIKGEMSNPG EVCSALNLCE SLQE | |
| Mouse saposin A | 16 kDa |
| 1 SLPCDICKDV VTEAGNLLKD NATQEEILHY LEKTC E WIHD 84 | |
| SSLSASCKEV VDSYLPVILD MIKGEMSNPG EVCSALNLCE SLQE | |
| Rat NPF | 16 kDa |
| 1 SLPCDICKDV VTEAGNLLKD | |
| ● N-glycosylation site | |

Fig. 5. Comparison of Amino Acid Sequence of NPF with Those of Rat and Mouse Saposin As¹³⁻¹⁵⁾

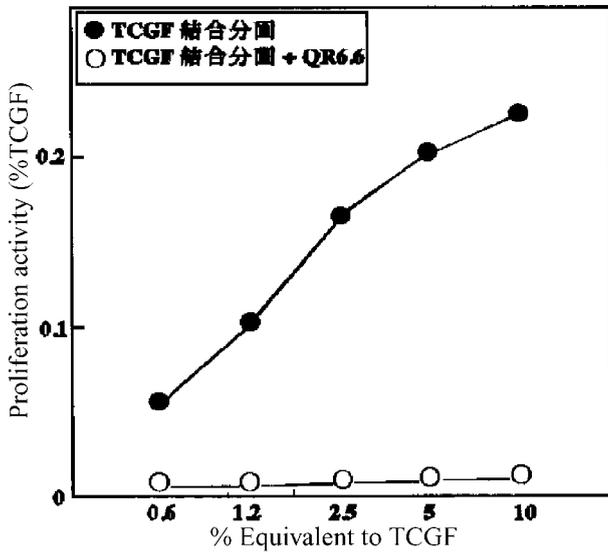


Fig. 7. Binding of NPF Activity in TCGF to Hitrap-anti-mrH-saposin A Antibody Column
 Serum-free TCGF was applied on the affinity-column, and the bound and unbound fractions were assayed for N-9F-proliferation activity in doses of % equivalent to TCGF.

は活性は認められなかった。つまり、TCGF 中の NPF 活性はすべて mrH-saposin A 抗体に結合し、TCGF 中の NPF 活性を pull-down することが分かった (Fig. 8)。以上の結果、mrH-saposin A 抗体は NPF 活性を中和することはできなかったが、NPF を認識・結合することはできた。

以上のことより、NPF が saposin A と N 末端アミノ酸配列及び分子量が一致すること、及び mrH-saposin A 抗体が TCGF 中の NPF を認識・結合することが明らかとなり、NPF を化学的には saposin-like protein であると位置付けた。次に、NPF の生物学的側面を明らかにすべき研究が進められた。

3. NPF の生物学的性質

細胞増殖活性は、細胞を NPF 存在下 48 時間培養後、MTT 法あるいは $[^3\text{H}]$ thymidine の取込みにより測定した。NPF は N-9F 細胞クローンの増殖を 0.01—9.6 ng/ml の範囲で濃度依存的に促進した

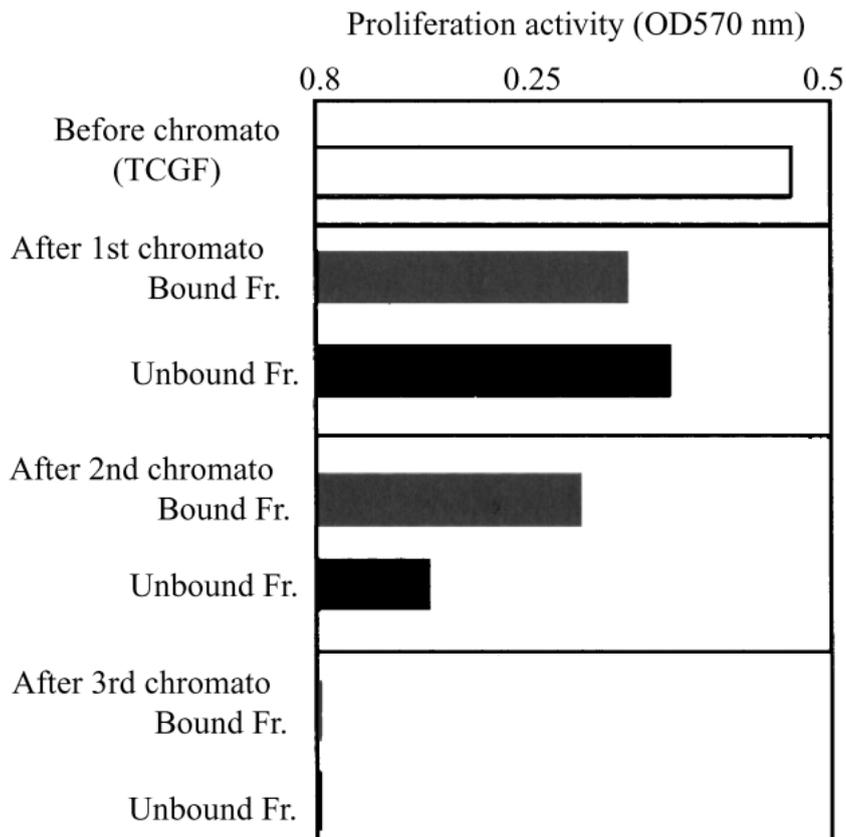


Fig. 8. Pull-down Assay
 Serum-free TCGF was applied on Hitrap-anti-mrH-saposin A antibody-column, and the bound and unbound fractions were assayed for N-9F-proliferation activity. Successively, the unbound fraction was applied on the same column after the elution of the bound fraction, and the both fractions were assayed for the activity, until the activity disappears.

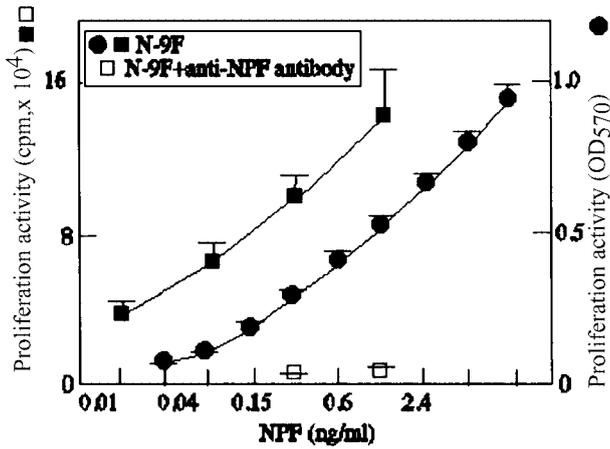


Fig. 9. N-9F-Proliferation Activity of NPF
N-9F cells were cultured with NPF in RPMI-1640 medium, and proliferation of N-9F was measured by an MTT method. N-9F cells were cultured with NPF in the presence of hamster anti-NPF antiserum (2%), and the proliferation of N-9F was measured by an incorporation of [³H]thymidine. The mean background is 19256 cpm. Data represent mean from three to five independent experiments. SD values are shown as error bars.

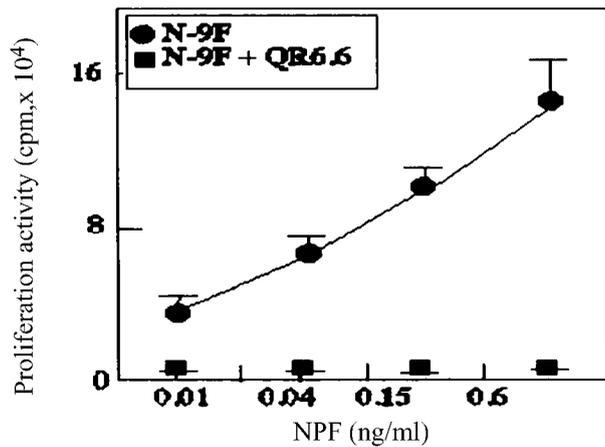


Fig. 10. Inhibition of NPF-activity by mAb QR6.6
N-9F cells were cultured with or without mAb QR6.6, and the proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation. Data represent mean from three to five independent experiments. SD values are shown as error bars.

(Fig. 9). この活性はハムスター抗 NPF 抗血清 (Fig. 9) 及び mAb QR6.6 (Fig. 10) により完全に阻害された。NPF は胎齢 17d (E17) のマウス未熟胸腺細胞の増殖を促進したが、成マウス胸腺細胞の増殖は促進しなかった (Fig. 11)。NPF の未熟胸腺細胞の増殖促進活性はやはり mAb QR6.6 により阻害された (Fig. 12)。脾臓細胞には影響を示さなかった (Fig. 11 において、若干活性があるようにみられるが、培養液中に産生される IL-2 によるものと思われる)。

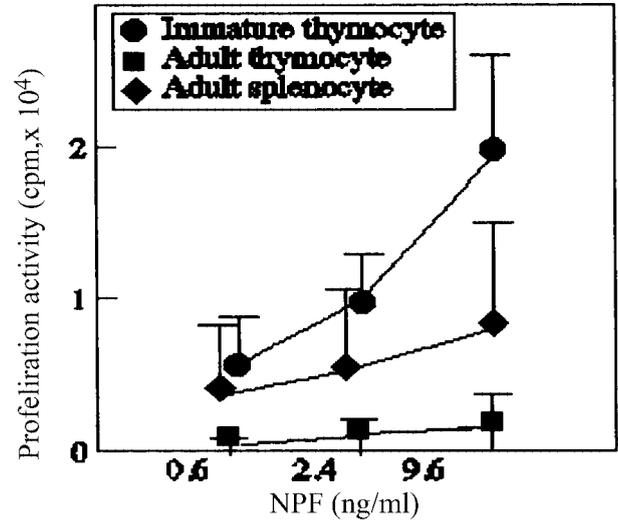


Fig. 11. N-9F-Proliferation Activity of NPF on Thymocytes and Splenocytes
Immature thymocytes (E17), adult thymocytes and adult splenocytes were cultured with NPF in serum-free RPMI-1640 medium, and cell proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation. Mean background are 565 cpm for immature thymocytes, 492 cpm for adult thymocytes and 4158 cpm for splenocytes, respectively. Data represent mean from three to five independent experiments. SD values are shown as error bars.

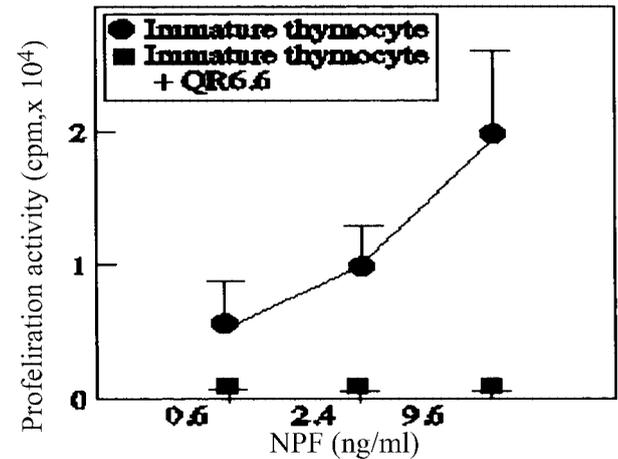


Fig. 12. Inhibition of the NPF Activity by mAb QR6.6 on Immature Thymocytes
Immature thymocytes (E17) were cultured with or without mAb QR6.6, and the proliferation activity was measured by [³H]thymidine incorporation.

NPF の胎児胸腺細胞増殖作用と mAb QR6.6 の胎児胸腺細胞との反応性を E15 から adult までの同じ胸腺細胞で測定比較したところ、いずれも E17 及び新生児において極めて高く、E15 及び adult ではほとんど認められなかった (Fig. 13)。すなわち、mAb QR.6.6 陽性分子の発現が、NPF の胸腺細胞増殖作用発現に重要に関わっていることが強く示唆

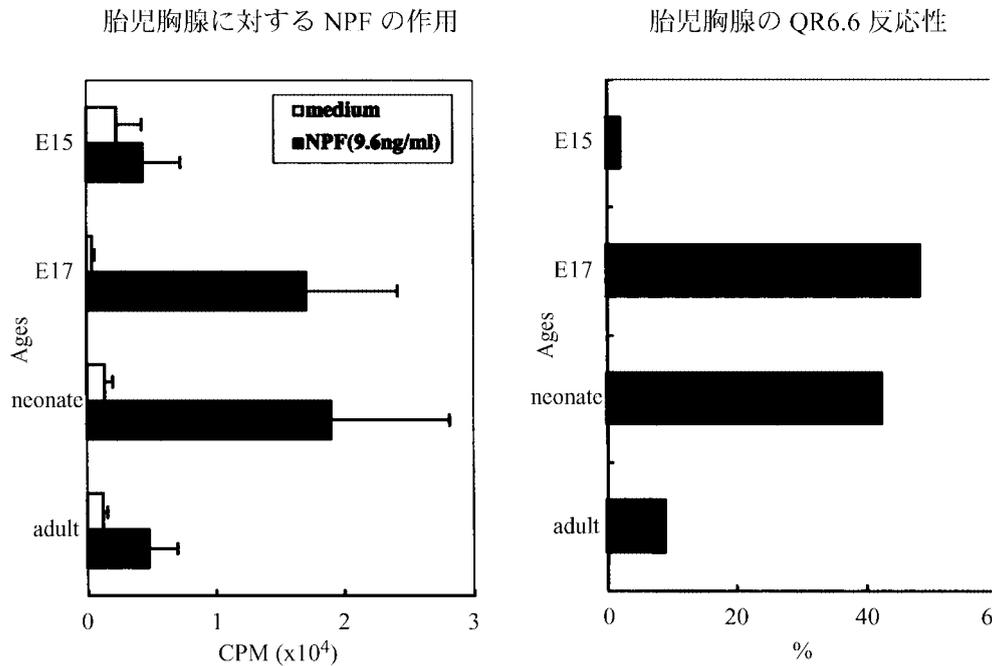


Fig. 13. Comparison of the NPF Activity with the mAb QR6.6 Reactivity on Thymocytes

The NPF activity was measured by ^3H thymidine incorporation. The data shows the mean \pm SD ($n=3$). The mAb QR6.6 reactivity (%) was measured by flow cytometry. The data shows the mean of 2 experiments. Both activities were measured using thymi of the same mouse.

された。

NPFによるN-9F増殖活性を確認するために、N-9FのDNA合成へのNPFの影響を調べた結果(Figs. 14A, B), NPFは血清添加培養液中では総細胞数及びS期とG₂/M期の細胞数を2倍以上に増加させた。G₀/G₁期の細胞数に対しては減少効果を示した。血清無添加培養液中では総細胞数には影響しなかったが、S期とG₂/M期の細胞数を明らかに増加させ、G₀/G₁期の細胞数を減少させた。また、NPFの作用は、mAb QR6.6により抑制された(Figs. 14C, D)。すなわち、NPFはN-9FのDNA合成を促進することを認めた。

より生理的な条件下におけるNPFの作用をみる目的で、胎児胸腺組織培養法(FTOC)¹⁸⁾を行った。その結果(Figs. 15A, C), 6日間培養で、NPFは胸腺中CD4/CD8 DN, CD4及びCD8 SP及びCD4/CD8 DP thymocytes数を明らかに増加させ、また、胸腺から膜上移行したCD8 SP及びCD4/CD8 DP thymocytes数も増加させた(Figs. 15B, C)。胸腺中及び膜上すべての細胞数をみると、すべての画分のthymocytes数が増加し、特に、NPFによるCD4/CD8 DP thymocytes数の増加作用は著しいものであった(Fig. 15D)。一

方、NPFのN-9F増殖活性中和活性を有するハムスター抗NPF抗血清は、4日間の培養でNPFのthymocytes数増加活性を中和・抑制した(Figs. 15B, E, この際、膜上にはほとんど細胞はみられなかった)。この効果は、ハムスター抗NPF抗血清が内因性のNPFの活性を中和したものと考えられ、生理的にNPFが未熟胸腺細胞を増殖・分化させる作用を有するものと推定される。

4. Saposin Aの生物学的意義とNPFとの関連性

Saposin Aはリソソームでのsphingolipidの代謝に関与する分子量15.3 kDaの糖蛋白質(糖含有率約40%)で、前駆体のprosaposinから生じる(Fig. 16)。

Prosaposinは53 kDaの蛋白として翻訳された後、糖鎖付加を受けて65 kDa、さらに70 kDaの糖蛋白質になる。70 kDaの分子は細胞外へ分泌されるのに対し、65 kDaの分子はリソソームへ移行してプロセッシングを受け、saposin A, saposin B, saposin C, saposin Dの4分子が生成される。これらの4つのsubunitはそれぞれ異なる糖脂質基質特異性を示し、saposin Aは主として β -glucosylceramidaseによるglucosylceramidaseの加水分解を活性化する

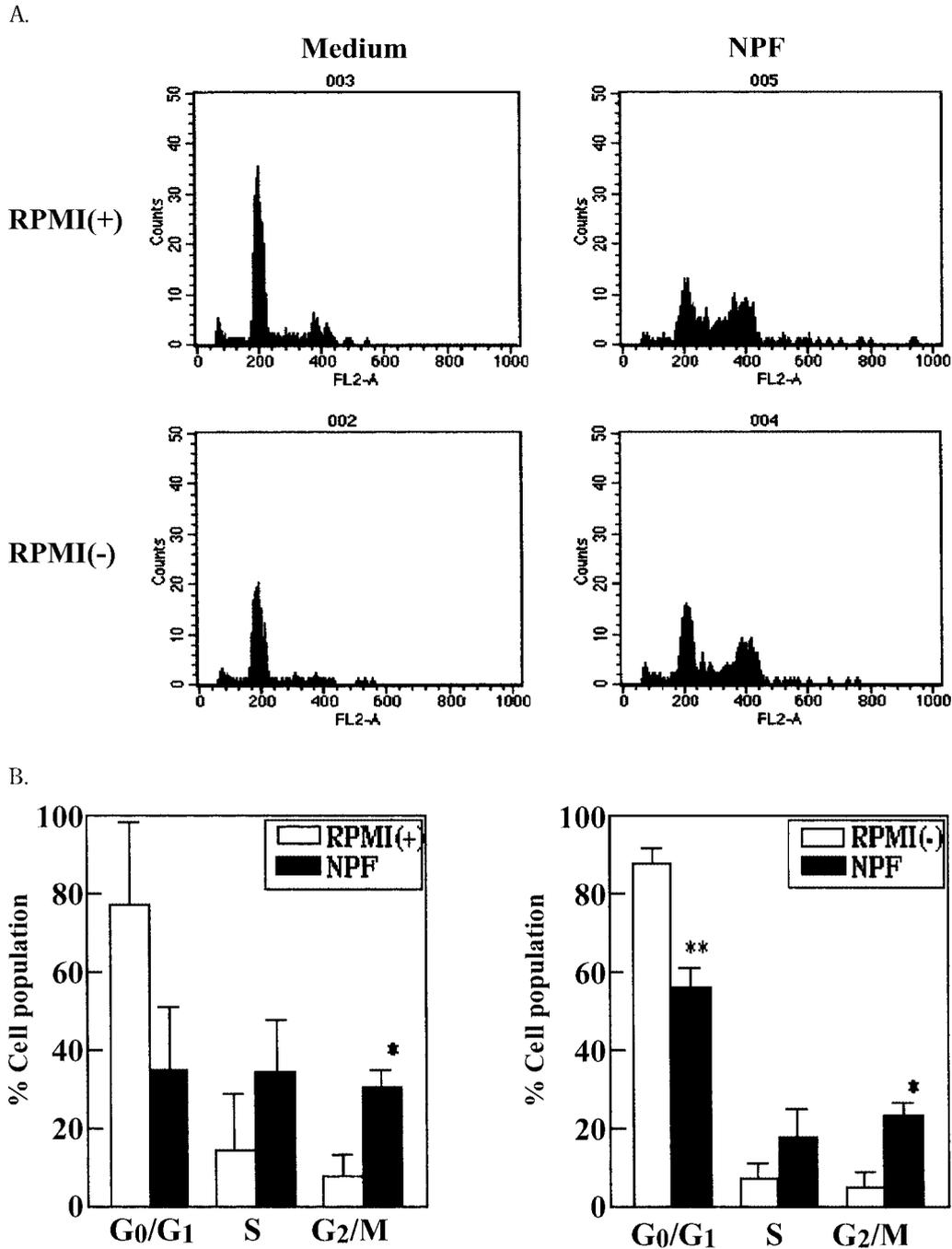


Fig. 14.

(Fig. 16).¹⁹⁻²² これは、saposins がタンパク質部分の疎水性と糖鎖部分の親水性の両親媒性により、脂質と酵素の反応を活性化・促進するものと考えられている。

近年、sphingolipids が T 細胞のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Fig. 17).²³ Ceramide-sphingosine-1-phosphate rheostat は T 細胞のアポトーシスを制御してい

る。²⁴ すなわち、FasL の結合により内因性 ceramide が上昇し、その結果、シグナル伝達系の CARK, G タンパク Ras 等が活性化されるとともに PKB, Bcl₂ 等が阻害され apoptosis が誘導される。一方、ceramidase や sphingosine kinase が活性化されると ceramide が sphingosine-1-phosphate へシフトし、SAPK 及び caspase 3/7 が抑制されるとともに ERK が活性化され、apoptosis が抑制される。²⁵

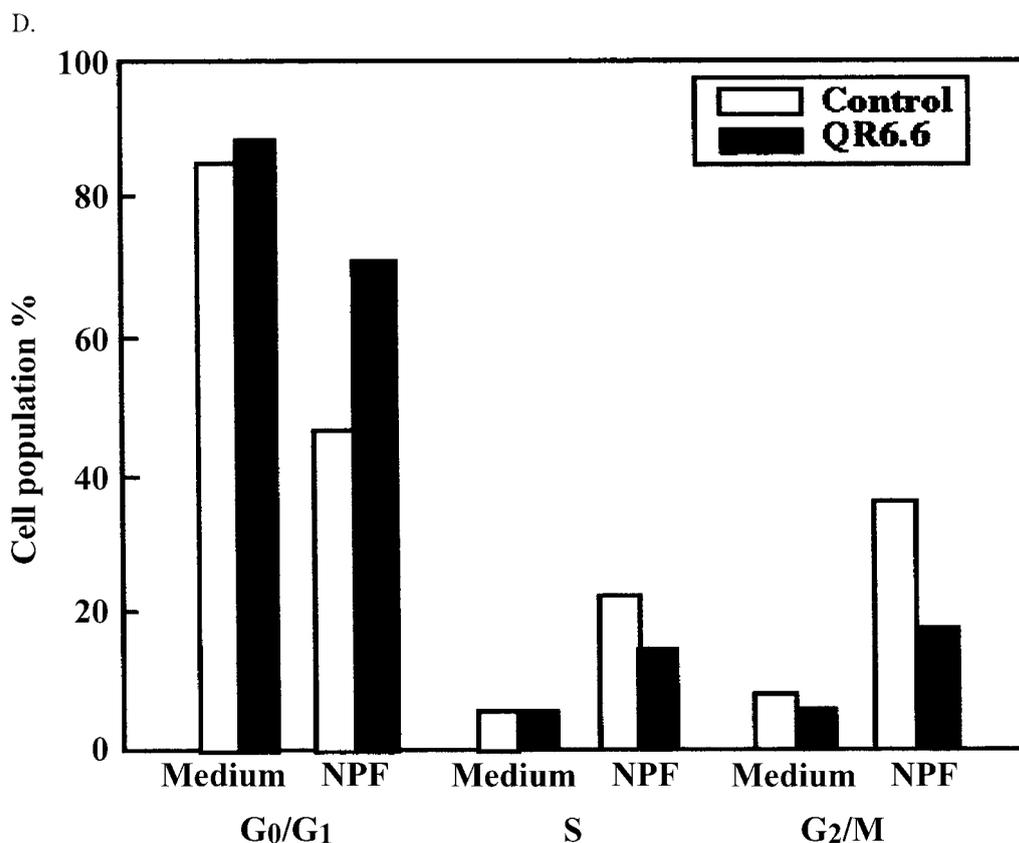
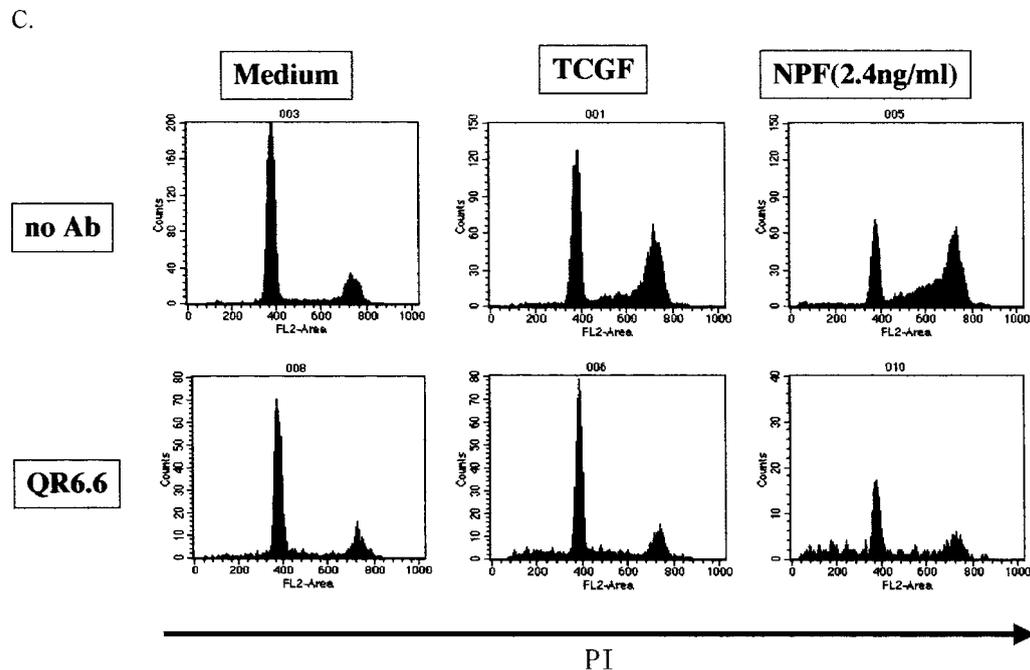


Fig. 14. Effect of NPF on N-9F Cell Cycle

N-9F cells were cultured with sample in RPMI-1640 (RPMI(-)). DNA content of cells was determined by flow cytometric analysis. RPMI(+) and (-) show RPMI-10% FCS and serum-free RPMI. A: Representative flow cytometric analysis in the effect of NPF on N-9F DNA content. The results from three independent experiments by NPF (2.4 ng/ml) are shown in B. Total cell numbers ($\times 10^5$) were 0.42 ± 0.27 for medium and 1.09 ± 0.13 ($p < 0.05$ versus medium) for NPF in RPMI(+), and 0.35 ± 0.17 for medium and 0.28 ± 0.11 for NPF in RPMI(-), respectively. Data represents the mean \pm S.D. Statistically significant from medium: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. C: Representative flow cytometric analysis in the effect of mAb QR6.6 on the NPF activity. The results from two independent experiments by NPF (2.4 ng/ml) are shown in D.

Glycosphingolipids の分解が進むことが、免疫細胞の一般的な活性化のシグナルになるのかも知れない。ごく微量の saposin A によるシグナルが、上記 apoptosis 抑制系に何らかの効果を及ぼす可能性は

否定できないが、現在のところなんら証拠はない。なお、glycosylceramide の貯留により発症するゴウシェ病では、体液性免疫系が亢進している (Fig. 18)²⁶⁾が、この理由は不明のままである。

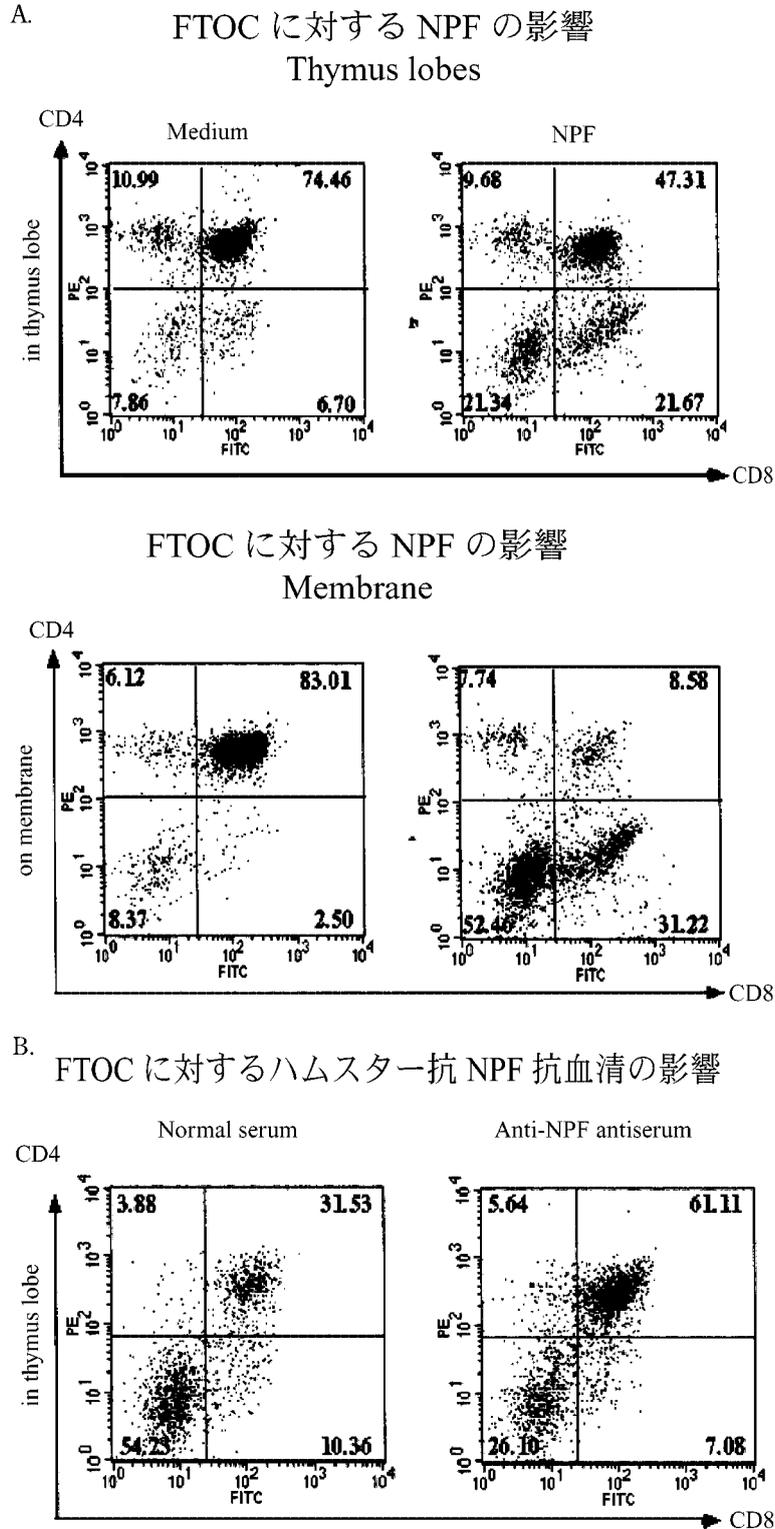


Fig. 15.

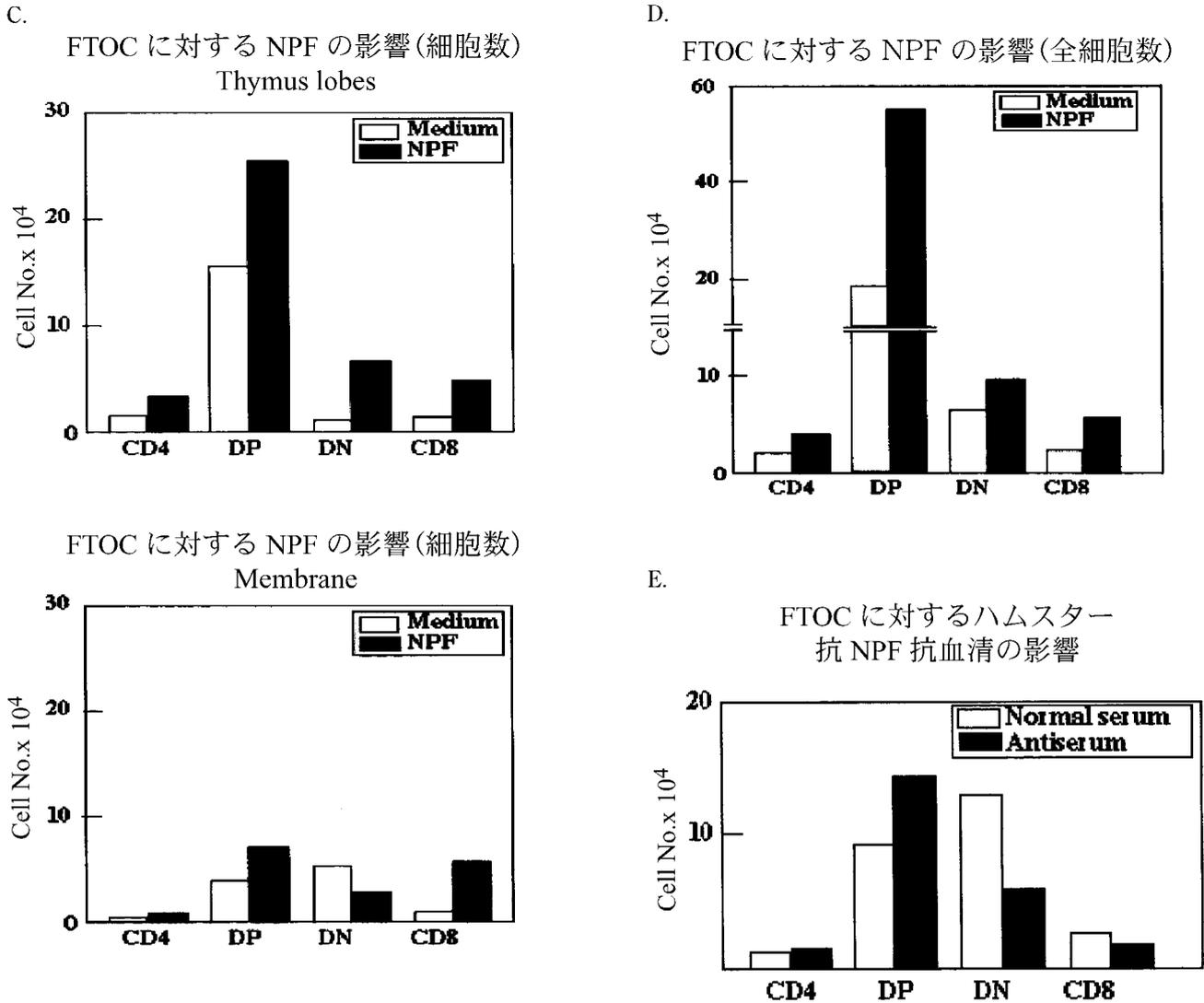


Fig. 15. Effect of NPF on FTOC

Thymus lobes from fetal day 14 mice were cultured with NPF or antiserum and stained with phycoerythrin-conjugated anti-CD4 and fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD8 antibodies. Thymocytes in five lobes and all thymocytes emigrated on membrane from five lobes were subjected to flow cytometric analysis. A: Representative flow cytometric analysis by NPF for 6 days. B: Representative flow cytometric analysis by hamster anti-NPF antiserum (2%) for 4 days. C: The results (cell number) from five lobes by NPF (2.4 ng/ml) are shown. Five independent experiments for thymus lobes and two independent experiments for thymocytes emigrated on membrane were performed with similar results. Total cell numbers ($\times 10^5$) per thymus lobe were 2.06 ± 0.50 for medium and 4.04 ± 0.74 ($p < 0.05$ versus medium) for NPF in thymus lobes, and 1.08 for medium and 1.16 for NPF in thymocytes emigrated on membrane, respectively. D: The results (total cell number in lobe and on membrane) from five lobes by NPF (2.4 ng/ml) are shown. E: The results (cell number) from 5 lobes by hamster anti-NPF antiserum (2%) are shown. Total cell numbers ($\times 10^5$) per thymus lobe were 2.60 ± 0.65 for medium and 2.45 ± 0.43 for NPF, respectively.

Sapoin A とアミノ酸配列において約 60% の相同性を示す sapoin C prosapoin 及び prosapide が数種の神経細胞において細胞増殖作用及び細胞死を抑制することが報告されている。^{28,29)} そして、この作用は、G-protein-associated receptor を介することが報告されている。³⁰⁾ NPF は $10^{-12} \sim 10^{-9}$ M の濃度で N-9F を、 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ M の濃度で未熟胸腺細胞を増殖させ、sapoins はほぼ同濃度の $10^{-9} \sim 10^{-8}$ M の濃度で細胞死を抑制する。^{28,29)} しかし、sapoin C の活性本体である prosapide は N-9F 増殖活性を示

さなかった (未発表)。Sapoin に関しては、上述のごとく 1980 年代後半から sphingolipid の代謝における役割が多く報告されてきたが、免疫系に関する報告はほとんどない。しかしながら、先に述べたように sphingolipid 代謝の亢進が apoptosis の抑制を招くという最近の知見は、NPF と sapoins の関連性を示唆するものであり、今後の研究が待たれる。

なお、NPF の収量があまりにも少ないため、NPF 中の糖含量及び NPF の β -glucosylceramidase による glucosylceramidase の加水分解促進活性を測

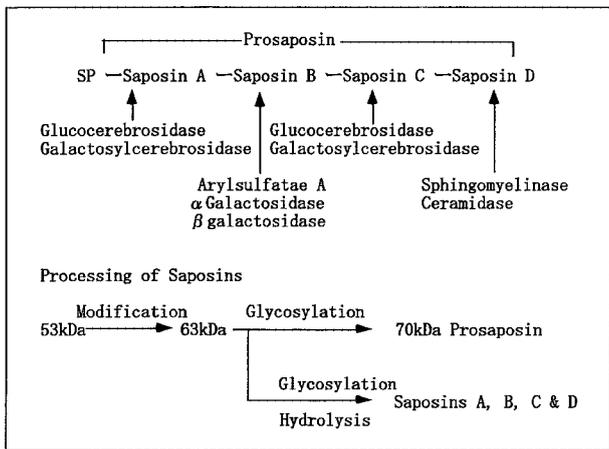


Fig. 16. Structure, Function and Processing of Saposins

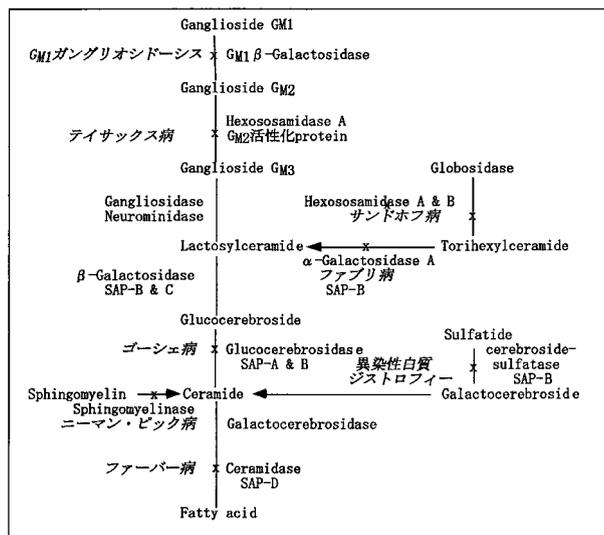


Fig. 18. Degradation of Sphingolipids²⁷⁾
Japanese and X indicate sphingolipidosis by genetic deficit. SAP: saposin.

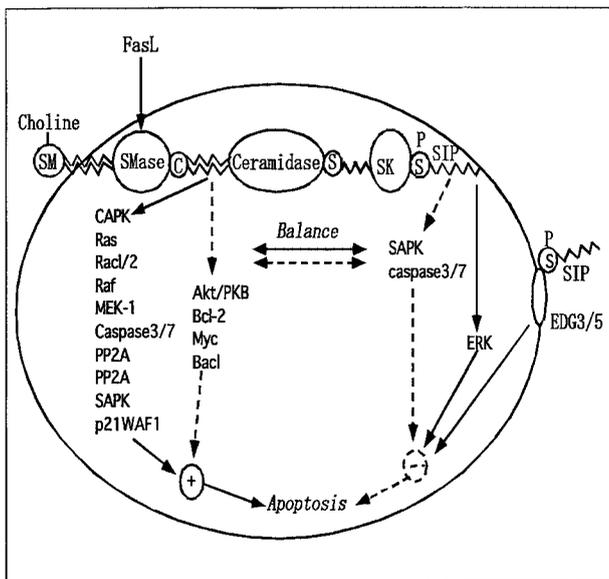


Fig. 17. The Ceramide-SIP Rheostat that Regulates T-cell Apoptosis

Upon binding of FasL, induction of the sphingomyelin pathway results in enhanced levels of endogenous ceramide. Consequently, CAPK, Ras, Rac1/2, Raf, MEK1, caspase 3/7, PP2A, SAPK and p21 WAF1 become active, whereas PKB, Bcl2, Myc and Bad are inhibited, resulting in apoptosis. However, shifting the balance from C to SIP (either endogenously or exogenously via binding to EDG3/5) prevents these processes, as exemplified by the inhibition of SAPK and caspase 3/7, and the activation of ERK. Abbreviations 1: induces, 2: prevents, C: ceramide, CAPK: ceramide-activated protein kinase, EDG: endothelial differentiation gene, ERK: extracellular regulated kinase, FasL: Fas legend, MEK: mitogen-activated protein kinase, PKB: protein kinase B, PP2A: protein phosphatase 2A, S: sphingosine, SIP: sphingosine-1-phosphate, Sapk: stress-activated protein kinase, SK: sphingosine kinase, SM: sphingomyelin, Smase: sphingomyelinase. Solid line: activating/activated, dotted line: inhibiting/inhibited.

定することはできなかった。また、 β -glucosylceramidase による glucosylceramidase の加水分解を $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M の濃度で活性化するが、これは高濃度の界面活性作用による物理化学的性質に依存したも

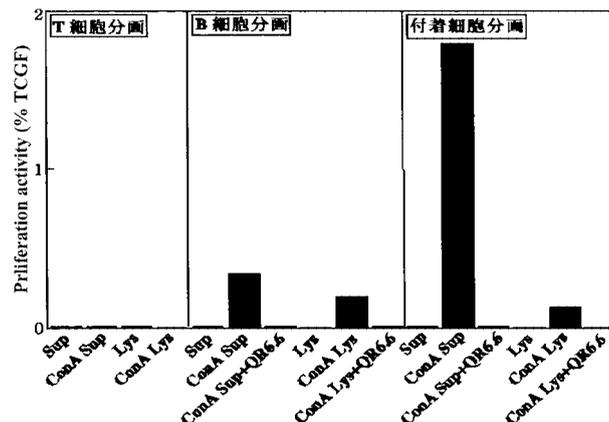


Fig. 19. The Source of NPF-poliferation Activity
T cell-rich fraction, B cell-rich fraction and adherent cells derived from rat splenocytes were cultured with or without concanavalin A, and their supernatant and lysate were assayed for N-9F-proliferation activity.

のであり、細胞死や細胞増殖作用とは異なっている。

5. NPF の胸腺内局在性

まず、NPF 産生細胞を推定する目的で、NPF 抽出材料であるラット脾細胞を用いて検討した。すなわち、T 細胞、B 細胞及びび付着細胞 (マクロファージ、上皮細胞等) rich な分画に分け、それぞれを Con A 存在下若しくは非存在下で培養し、培養上清と cell lysate について N-9F 増殖活性を検討した。その結果、N-9F 増殖活性は Con A 刺激した付着細胞 rich 分画の培養上清に特に高く、その他付着細胞の Con A 刺激 lysate, B 細胞の Con A 刺激

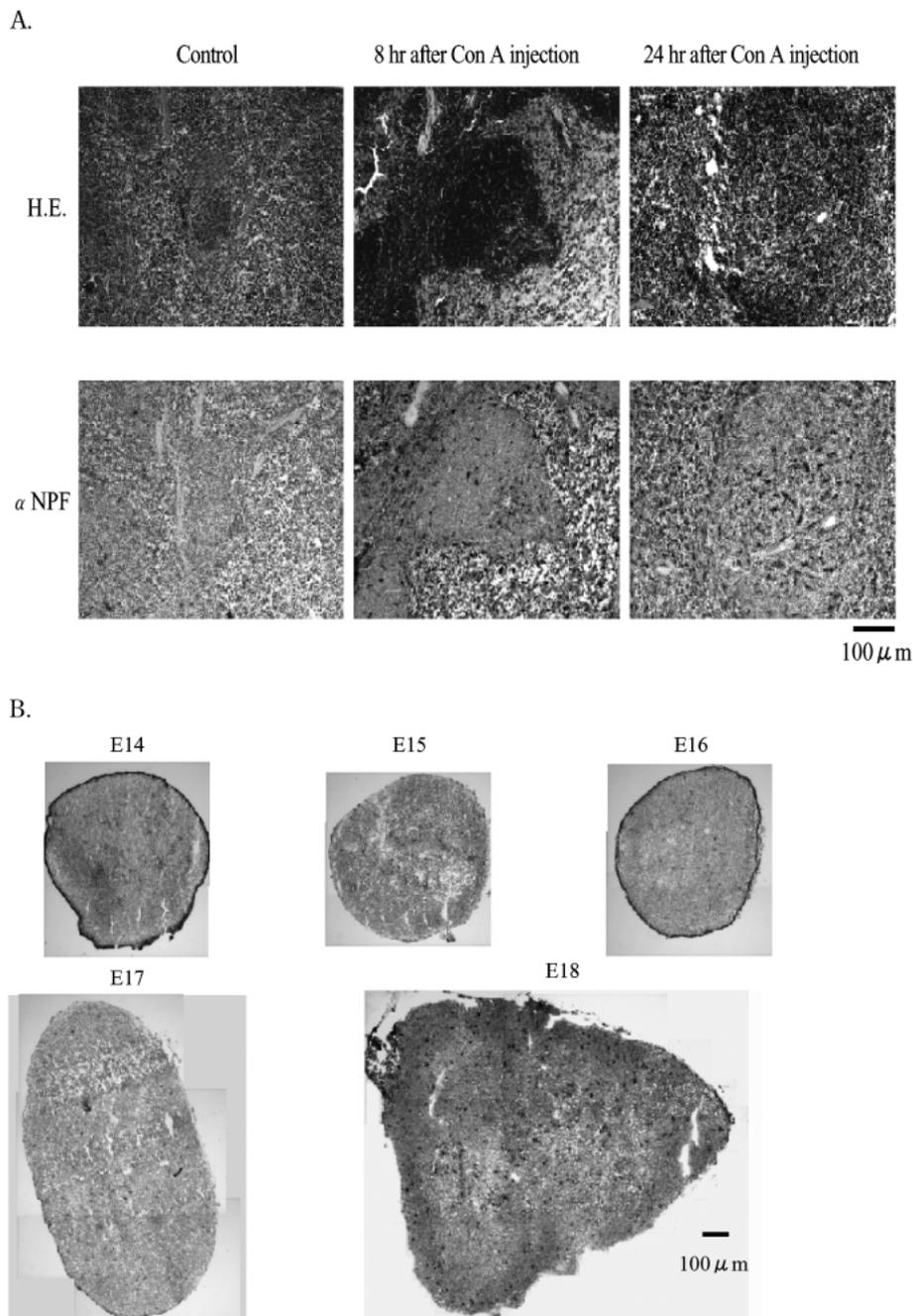


Fig. 20.

培養上清及び lysate にみられた (Fig. 19). したがって, NPF は主に付着細胞に存在し, 何らかの刺激で細胞外に放出されることが認められた.

次に, ウサギ抗 NPF 抗体 (α NPF, mrH-saposin A を認識することができる) を用い, 脾臓及び未熟 T 細胞の分化・成熟の場である胎児胸腺における NPF の分布を免疫染色法により検討した. その結果, マウス脾臓の組織染色像において, B 細胞領域の胚中心及び T 細胞領域を含む脾臓全体に NPF

の発現を確認した (Fig. 20A). また, Con A 投与 8 時間及び 24 時間後にその発現が顕著に増加することを確認した. 胎児胸腺の組織染色像においては, E14 から NPF 陽性細胞は確認され, E18 にその発現が強くなることが分かった (Fig. 20B). また, E18 の胎児胸腺染色像から, NPF は ER-TR5 抗体で染色される髓質, 及び Mac-1 陽性細胞の多い皮髄境界部に強く発現し, 皮質にも発現することが分かった (Fig. 20C).

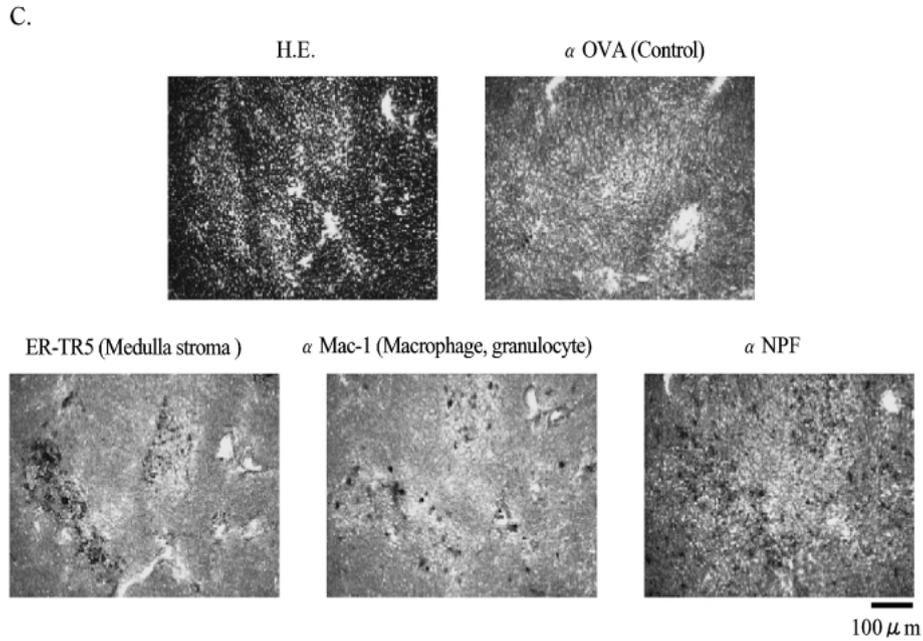


Fig. 20. Immunohistochemistry of NPF

A: Distribution of rabbit anti-NPF antibody in spleen of mice injected with Con A. B: Distribution of rabbit anti-NPF antibody in thymus of fetal mice. C: Distribution of anti-rat anti-Mac-1 antibody, ER-TR5 antibody and rabbit anti-NPF antibody in thymus of fetal (E18) mice.

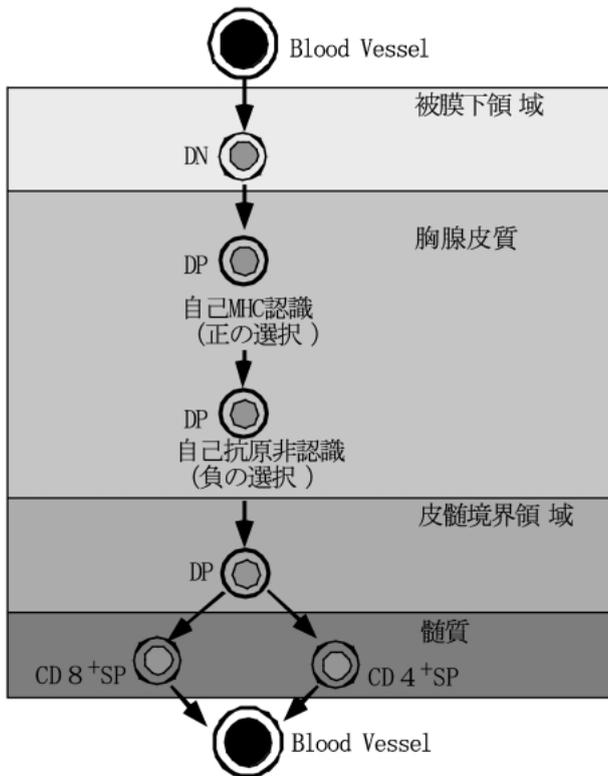


Fig. 21. T Cell Differentiation in Thymus

未熟 T 細胞は胸腺において E17 前後に CD4, CD8 DP 細胞に分化し, mAb QR6.6 陽性細胞もこの時期に最も多く出現する. したがって, NPF が

| 胎齢 (日) | ~ 16 | 18 | 20 ~ |
|----------------|------|----|---------|
| 胸腺部位 | 被膜下 | 皮質 | 皮髓境界 髓質 |
| T細胞分化 | DN | DP | SP |
| NPF局在性 | - | + | ++ |
| NPF産生能 | - | ++ | |
| mAb QR6.6 陽性細胞 | - | ++ | |

Fig. 22. Summary of NPF Activity

この時期胸腺において未熟 T 細胞の分化成熟に関与していることが示唆される. E18 の胎児胸腺染色像から, NPF は髓質及び皮髓境界部に強く発現し, 皮質にも発現することが分かった. CD4, CD8 DN 細胞は皮質から皮髓境界部で DP 細胞に, さらに髓質で SP 細胞に分化成熟すると言われており, NPF の分布は未熟 T 細胞の分化・成熟過程に NPF が何らかの関わりを有するものと考えられる (Fig. 21).

6. 総括

未熟 T 細胞クローン N-9F を増殖させる新しい可溶性因子 NPF を TCGF 中から分離した. 本因子は

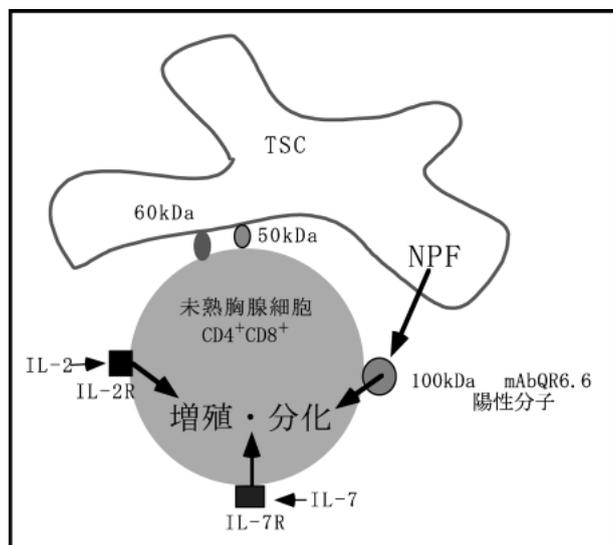


Fig. 23. Putative Physiological Significance of NPF in T-cell Differentiation in Thymus

化学的には sphingolipid activator protein subunit, saposin A-like protein であった。NPF は未熟な胸腺細胞のみを増殖させ、未熟胸腺細胞にのみ局在する分子を認識する mAb QR6.6 によりその作用は抑制された。また、増殖細胞の DNA 合成を促進するとともに、CD4/CD8DN, CD4 及び CD8 SP, 特に CD4/CD8DP 胸腺細胞を増加させ、さらに未熟 T 細胞が胸腺において CD4, CD8 DP 細胞に分化する時期及び場に NPF 及び mAb QR6.6 反応分子が発現することから、未熟胸腺細胞の増殖のみならず分化にも関与していることが示された (Fig. 22)。N-9F の胸腺における位置付けを模式的に表すと、Fig. 23 のようになる。すなわち、N-9F は TSC 等付着細胞で産生され、主として DP 未熟胸腺細胞表面上の 100 kDa の mAb QR6.6 陽性分子発現近傍に作用し、DP 未熟胸腺細胞を増殖させるとともに SP T 細胞へと分化させる。これまで未熟胸腺細胞の増殖に係る因子として IL-2 及び IL-7 が報告されているが、^{3-7,31-35} これらの因子は本研究で用いた増殖 assay 系では無効であった。⁸⁾ したがって、NPF は新しい未熟胸腺細胞増殖因子であるとともに、saposin A-like protein の新しい生物学的意義を示唆するものである。

NPF の未熟 T 細胞の成熟・分化における生理的役割の詳細については、特に未熟胸腺細胞-ストローマ細胞間相互作用の面及び他因子との相互作用

の面からのさらなる攻究が必要である。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野、山元 弘教授との共同研究の下で行われたものであり、この場を借りて感謝申し上げます。本研究に多大な御協力を賜った辻川和丈博士を始めとする共同研究者の皆様にご礼申し上げます。本研究の一部は、文部科学省及び厚生労働省の御援助により行われました。ここに厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Von Boehmer H., *Annu. Rev. Immunol.*, **6**, 309-326 (1987).
- 2) Haynes B. F., Markert M. L., Sempowsky G. D., Patel D. D., Hale L. P., *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 529-560 (2000).
- 3) Shortman R., Wu L., *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 29-47 (1996).
- 4) Anderson G., Moore N. C., Owen J. J. T., Jenkinson E. J., *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 73-99 (1996).
- 5) Antavina C., *Immunol. Today*, **18**, 350-361 (1997).
- 6) Boyd R., Chidgey A., *Immunol. Today*, **21**, 472-474 (2000).
- 7) Small M., Weissman H., *Scand. J. Immunol.*, **44**, 115-121 (1996).
- 8) Tamura H., Kuzuhara H., Hiramine C., Hojo K., Yamamoto H., Fujimoto S., *Immunology*, **74**, 265-270 (1991).
- 9) Takeuchi T., Kuzuhara H., Tamura H., Hiramine C., Hojo K., Yamamoto H., *Cell. Immunol.*, **146**, 324-334 (1993).
- 10) Takeuchi T., Tamamoto T., Tamura H., Yamamoto H., *Int. Immunol.*, **7**, 583-590 (1995).
- 11) Tamura H., Kuzuhara H., Takeuchi T., Yamamoto H., *J. Immunol.*, **152**, 1134-1140 (1994).
- 12) Kohama Y., Shinoda S., Hagihara K., Hashimoto K., Yamaguchi A., Nakamura A., Tsutiya T., Tsujikawa K., Yamamoto H., *Immunology*, **109**, 209-216 (2003).
- 13) Morales C. R., El A. M., Zhao Q., Igdoura S. A., *J. Histochem. Cytochem.*, **44**, 327-337 (1996).

- 14) Colland M. W., Sylvester S. R., Tsuruta J. K., Griswold M. D., *Biochemistry*, **27**, 4557–4564 (1988).
- 15) Tsuda L., Sakiyama T., Endo H., Kitagawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1266–1272 (1992).
- 16) Ito K., Takahashi A., Shimada I., Arata Y., O'Brien J. S., *Eur. J. Biochem.*, **215**, 171–179 (1993).
- 17) Qi X., Leonava T., Grabowsky G. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 16746–16753 (1994).
- 18) Kisielow P. W., Leiserson W., Gordon J., *J. Immunol.*, **133**, 1117–1123 (1984).
- 19) O'Brien J. S., Kishimoto Y., *FASEB J.*, **5**, 301–308 (1991).
- 20) Igdoura S. A., Bencosme A., Ponce E., Sun Y., Grabowsky G. A., *J. Biol. Chem.*, **283**, 385–394 (1996).
- 21) Morimoto S., Yamamoto Y., O'Brien J.S., Kishimoto Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3493–3497 (1990).
- 22) Leonova T., Qi X., Bencosme A., Ponce E., Sun Y., Grabowsky G. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 17312–17320 (1996).
- 23) Prieschl E. E., Baumruker T., *Immunol. Today*, **21**, 555–560 (2000).
- 24) Basu S., Bayoumy S., Zhang Y., Lozano J., Kolensnick R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 30419–30426 (1998).
- 25) Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P. G., CosoOAJ, Gurkind J. S., Spiegel S., *Nature*, **381**, 800–803 (1996).
- 26) Shoenfeld Y., Gallant L. A., Shaklai M., Livivni E., Djaldetti M., Pinkhas J., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **106**, 388–391 (1982).
- 27) Voet D., Voet J. G., "Biochemistry," 3rd ed., translated by Tamiya N., Muramatsu M., Yagi T., Yosida H., Tokyokagakudojin, Tokyo, 2004, p. 978.
- 28) Hiraiwa M., Taylor E. M., Campana W. M., Darin S. J., O'Brien J. S., *Proc. Natl., Acad. Sci., U.S.A.*, **94**, 4778–4781 (1997).
- 29) Tsuboi K., Hiraiwa M., O'Brien J. S., *Dev. Brain Res.*, **110**, 249–255 (1998).
- 30) Hiraiwa M., Campana W. M., Martin B. M., O'Brien J. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 415–418 (1997).
- 31) Murray R., Suda T., Wrigton N., Lee F., Zlotnik A., *Int. Immunol.*, **1**, 526–531 (1989).
- 32) Kondo M., Weissman H., *Microbiol. Immunol.*, **251**, 59–65 (2000).
- 33) Shimonkevitz R. P., Husmann L. A., Bevan M. J., Crospe I. N., *Nature*, **329**, 157–159 (1987).
- 34) Jenkinson E. J., Kingston R., Owen J. J. T., *Nature*, **329**, 160–162 (1987).
- 35) Tentori L., Longo D. L., Zuniga-Pflucker J. C., Wing C., Kruisbeek A. M., *J. Exp. Med.*, **168**, 1741–1747 (1988).