



## Differential expression of proteinase inhibitor-9 and granzyme B mRNAs in activated immunocompetent cells

堀江, 修

(Degree)

博士（保健学）

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3384

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003384>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 161 】

氏 名・(本 籍) 堀江 修 ( 大阪府 )

博士の専攻分野の名称 博士 (保健学)

学 位 記 番 号 博い第17号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Differential expression of proteinase inhibitor-9 and  
granzyme B mRNAs in activated immunocompetent  
cells

(活性化免疫担当細胞でのPI-9とgranzyme B  
mRNAの経時的発現の違い)

審 査 委 員

主査 教授 寮 隆吉

教授 渡邊 信

教授 西山 馨

## 論文内容の要旨

専攻領域 病因・病態解析学領域  
専攻分野 病因解析学分野  
氏名 堀江修

論文題目（外国語の場合は、その和訳を併記すること。）

Differential expression of proteinase inhibitor-9 and granzyme B mRNAs  
in activated immunocompetent cells

（活性化免疫担当細胞での PI-9 と granzyme B mRNA の経時的発現の違い）

目的：免疫担当細胞は Fas/Fas ligand、TNF そして perforin/granzyme B (GrB)系を介して、標的細胞の apoptosis を惹き起こす。免疫担当細胞は傷害を起こす際にも、自身の細胞は傷害から免れることが判っている。この機序として、GrB に対する内因性 proteinase inhibitor (PI)-9 が重要な役割を果たすと推測されている。そこで、今回は *in vitro* で T リンパ球や NK 細胞を活性化して PI-9 と GrB の mRNA と抗原の動きを詳細に検討し、PI-9 の役割を明らかにすることを試みた。さらに造血幹細胞輸注(HSCT)後の患者の PI-9 と GrB の mRNA と抗原の動きも観察して PI-9 の解明を行った。

方法：健常者末梢血から *Epstein-Barr virus* を用いて樹立した B 細胞株、*Herpesvirus saimili* を用いて樹立した CD8<sup>+</sup> T 細胞株、B 細胞性白血病細胞株 U-Tree02、B 細胞株 Raji、骨髄球細胞株 HL-60、T 細胞株 Jurkat、NK 細胞株 YT-N10、巨核球細胞株 CMK を用いた。Agonist としては 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA)、50 U/ml IL-2 と 2 U/ml IL-12 の併用そして 20 U/ml IL-6 を用いた。HSCT 後 6 ヶ月以上経過し graft-versus-host disease (GVHD) 症状の認められた 4 例と認められなかった 4 例ならびに健常者 5 例について検討した。

PI-9 と GrB の mRNA は real-time quantitative PCR で観察した。Transcript copies 数は内部 control GAPDH の transcript copies で除した値である ratio で求めた。PI-9 と GrB の抗原は家兔由来 polyclonal PI-9 抗体と monoclonal GrB 抗体を用いて flow cytometry で測定した。

成績：PI-9 mRNA の発現は YT-N10 細胞で最大であり、PI-9 transcript copies は 0.197 であった。CD8<sup>+</sup> T 細胞株で 0.111、U-Tree02 細胞で 0.031、B 細胞株で 0.012、Raji 細胞で 0.009、HL-60 細胞で 0.007 そして CMK 細胞は 0.001 であった。Jurkat 細胞には発現はなかった。（うらにつづく）

そこで YT-N10 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞株を活性化して PI-9 と GrB の mRNA の動きを観察した。PMA 添加 3 時間後で PI-9 mRNA の発現が最も増強され、一方添加 12 時間後で GrB mRNA の発現が強く認められた。IL-2 と IL-12 を併用して CD8<sup>+</sup> T 細胞株を刺激すると、同様に GrB mRNA の増強に先立って、PI-9 mRNA の増強が認められた。PMA 添加 12 時間後 B 細胞株の PI-9 mRNA の発現は最高になったが、IL-6 刺激では変化がなかった。CMK 細胞においても同様の結果が得られた。いずれの細胞でも抗原の変化は検出できなかった。

HSCT 後 GVHD を発症した患者末梢血中の GrB mRNA の発現は、健常者 control に比較して 4 例中 3 例が有意に高く、GVHD を発症していない患者末梢血中では、4 例中 1 例が有意に高かった。PI-9 mRNA の発現は、GrB の上昇している例でも、健常者 control に比べてすべて低下していた。

結論：PI-9 あるいは GrB mRNA は、我々の開発した real-time quantitative PCR 法で定量的に観察できるので、これら遺伝子の制御機構の解明に適していた。Chemical agent や生理的な cytokine で CD8<sup>+</sup> T 細胞株と YT-N10 細胞を活性化させると、GrB mRNA の発現に先立って PI-9 mRNA の発現が起こることがはじめて明らかになった。PI-9 mRNA が早期に活性化されること、PI-9 が CTL と NK cell の自己融解を防ぐために、重要な役割を果たしていることを示す直接の証拠と考えられる。PI-9 と GrB 抗原の変化はどちらも認められなかった。鋭敏な方法を開発すれば検出できると考えられる。さらに PMA は B 細胞株と CMK 細胞の PI-9 mRNA も上昇させた。PI-9 mRNA の制御に c-kinase が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

HSCT 後の患者の CTL と NK 細胞は活性化されていることが推測される。実際 GrB mRNA が有意に上昇している例は見られたが、興味あることにすべての症例で PI-9 mRNA は低下していた。PI-9 の減少が GrB によって惹き起こされる組織障害の増悪に関わっているのかもしれない。また PI-9 と GrB mRNA の制御は異なる機構で行われている可能性が示唆された。

キーワード：PI-9、granzyme B、cytokine、GVHD、real-time quantitative PCR

指導教員

寮 隆吉

## 論文審査の結果の要旨

氏名	堀江修		
論文題目	Differential Expression of proteinase Inhibitor-9 and Granzyme B mRNAs in activated immunocompetent Cells (活性化免疫担当細胞でのPI-9とgranzyme B mRNAの経時的発現の違い)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	寮 隆吉
	副査	教授	渡邊 信
	副査	教授	西山 肇
要旨			
<p>免疫担当細胞が傷害を惹き起こす際に、自爆しない理由は proteinase inhibitor (PI)-9 が重要な役割を果たしているとの仮説で、PI-9 mRNA と抗原の動きを検討したものである。まず各種系統の血球細胞中の PI-9 mRNA の発現量を新しく開発した real-time quantitative PCR 法で定量的に観察して、CTL や NK 細胞に強く発現していることを示した。さらに CTL と NK 細胞を phorbol ester で刺激すると granzyme B (GrB) に先立って PI-9 mRNA が増加することを明らかにした。生理的 agonist である IL-2 と IL-12 の組合せでも同様の効果があることを示した。Phorbol ester は B 細胞や巨核球の PI-9 mRNA の発現も増強させたので、c-kinase が PI-9 mRNA の制御に重要な役割を果たしていることも明らかにした。</p> <p>さらに同種造血幹細胞移植後の患者の PI-9 mRNA は GVHD の有無に関わらず 8 例中全例で低下していることを見出した。</p> <p>本研究は PI-9 の役割について、遺伝子レベルでの検討を加えて、PI-9 が apoptosis 惹起因子の GrB より、より早期に合成されて免疫担当細胞の自己融解を防いでいるとの直接の証拠と、PI-9 と GrB mRNAs が異なった機序で制御されていることを示す知見を得たものとして価値あるものであることを認める。</p> <p>よって、学位申請者の堀江修氏は博士（保健学）の学位を得る資格があると認める。本論文は The Tohoku Journal of Experimental Medicine 205: 103-114, 2005 に掲載されている。</p>			