

論文の内容の要旨

論文題目 タンパク質アルギニンメチル化による T 細胞制御機構の解析

井上 真以亜

要旨

T 細胞は、自身が細胞障害活性を発揮するだけでなく、サイトカイン産生を介して B 細胞や自然免疫担当細胞などの活性を高めることによって、感染防御において中心的な役割を担っている。T 細胞による抗原特異的な反応は、感染防御以外にも腫瘍免疫や経口寛容を担う一方で、異常に活性化すると自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫疾患を引き起こす。そのため T 細胞の適切な活性化や維持は、生体の恒常性維持に重要であり、T 細胞制御の全貌を明らかにすることは免疫疾患治療法の開発に不可欠である。

アルギニンは、側鎖のグアニジノ基に 5 つの水素結合供与体を持つため、DNA や RNA、タンパク質上の水素結合受容体との相互作用が生じやすいアミノ酸である。タンパク質のアルギニン残基にメチル基が導入されると、他のタンパク質との結合親和性が変化し、転写の促進や終結、pre-mRNA のスプライシングに影響を与える。

アルギニンメチル化は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (Protein arginine methyltransferase: PRMT) によって触媒される。ほ乳類では 9 つの PRMT が報告されており、メチル化様式の違いから、非対称性ジメチル化を触媒する type I (PRMT1, 2, 3, CARM1, PRMT6, PRMT8)、対称性ジメチル化を触媒する type II (PRMT5, 9)、モノメチル化を触媒する type III (PRMT7) の 3 つに分類される。

近年、PRMT が乳がん、肺がん、大腸がんやリンパ腫等の腫瘍の進行に寄与する可能性が示唆されており、PRMT ががんの治療標的として注目されている。生体に本来備わる免疫系が、強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかになっているが、抗腫瘍免疫応答で中心的な役割を担う T 細胞に対する PRMT 阻害剤の影響はほとんどわかっていない。さらにどのアルギニンメチル化タンパク質が、どのように T 細胞系列全体に影響を及ぼすかという分子メカニズムは不明な点が多い。そこで本研究では、T 細胞におけるアルギニンメチル化の生理的機能の理解を目的とした。

まず、ヒトの CD3⁺ 細胞の活性化に伴う PRMT ファミリー分子の mRNA 発現変動を解析したところ、抗 CD3/CD28 抗体による TCR 刺激により、アルギニン対称性ジメチル化を触媒する PRMT5 の発現が増加し、PRMT ファミリー分子の中で最も高く発現することが判明した。マウスの T 細胞においても

PRMT5 発現が増加し、対称性ジメチルアルギニンレベルが顕著に増加した。従って、T 細胞の活性化により発現上昇した PRMT5 が、アルギニン対称性ジメチル化を促進することが示唆された。

T 細胞における PRMT5 の役割を理解するために、T 細胞特異的に *Prmt5* 遺伝子を欠損するマウスを作製した。T 細胞特異的 *Prmt5* 遺伝子欠損マウスでは、胸腺の DP、CD4SP 及び CD8SP 細胞数は正常であったが、脾臓やリンパ節における T 細胞数が顕著に減少していた。制御性 T (regulatory T; Treg) 細胞数も、胸腺では正常な一方、脾臓では著しく減少した。さらに当該マウスの invariant NKT (iNKT) 細胞は、胸腺、脾臓及び肝臓のいずれにおいてもほぼ完全に欠失していた。以上の結果から、PRMT5 は胸腺における iNKT 細胞の分化と、末梢の CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞、Treg 細胞の維持に重要であることが示された。

PRMT5 が細胞間相互作用を介さずに細胞内部で機能するかどうかを検証するために、野生型マウスと T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスの骨髓細胞を等量ずつ移入し、混合骨髓キメラマウスを作製した。同キメラマウスでは、T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスの骨髓細胞由来の iNKT、CD4⁺ T 及び CD8⁺ T 細胞のいずれも、野生型骨髓細胞由来の細胞より顕著に減少していた。従って、PRMT5 は iNKT 細胞、CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の内部で機能することが示された。

次に、PRMT5 が iNKT 細胞のどの分化段階を制御するかを解析した。DP 細胞から正に選択された iNKT 細胞は、stage 0、1、2、3 の分化段階を経る。T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスの胸腺では、stage 1、stage 2、そして stage 3 の細胞数がほぼ欠失していたため、stage 1 における iNKT 細胞の分化が障害されていることが明らかになった。iNKT 細胞分化に必須のサイトカインである IL-7 及び IL-15 の受容体の発現を解析した結果、T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスの stage 1 iNKT 細胞では、 γ_c 発現が顕著に低下していた。T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスでは、 γ_c をコードする *Il2rg* 遺伝子の T 細胞特異的欠損マウスと同程度に iNKT 細胞がほぼ消失することから、 γ_c 発現の顕著な減少が *Prmt5* 欠損による iNKT 細胞の激しい分化障害を導くことが強く示唆された。

T 細胞の活性化における PRMT5 の役割を解析するために、ナイーブ T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体、及び IL-2 存在下で培養した。*Prmt5* 欠損 T 細胞は増殖が認められず、死細胞の割合が有意に増加していたことから、PRMT5 は、TCR 刺激に応じた CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の増殖や生存に必須であることが判明した。また、*in vitro* における *Prmt5* 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞の induced Treg (iTreg) 細胞への分化が激しく阻害され、特に IL-2 シグナル伝達が障害されていることが示唆された。

T 細胞特異的 *Prmt5* 欠損マウスの各 T 細胞分画における γ_c 発現解析を行った結果、胸腺 CD4SP 細胞、Treg 細胞ではコントロールマウスと同程度の発現が認められたものの、末梢 CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞、

Treg 細胞では、 γc の発現が穏やかではあるが有意に低下した。さらに、PRMT5 を欠損した活性化 CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞、そして iTreg 細胞では、 γc 発現が著しく低下していた。よって、PRMT5 は iNKT 細胞のみならず末梢の T 細胞においても、 γc の発現を制御することが示された。また、TCR 刺激による JAK3 発現上昇が、*Prmt5* 欠損 T 細胞ではほとんど認められなかったため、PRMT5 は γc と JAK3 の発現を制御することが考えられた。

Prmt5 欠損 T 細胞では、IL-7 及び IL-2 に応じたリン酸化 STAT5 が有意に低下していたことから、 γc ファミリーサイトカインシグナルの強度が低下していることが示された。*Prmt5* 欠損 T 細胞に恒常活性化型 STAT5 を過剰発現させた結果、CD25 発現がコントロール細胞と同レベルまで回復した。さらに、*Prmt5* 欠損 T 細胞に γc と JAK3 を遺伝子導入すると、T 細胞の増殖や生存が有意に回復した。従って、PRMT5 は γc と JAK3 の発現促進を介して、iNKT 細胞分化、T 細胞の維持や活性化に必要な γc ファミリーサイトカインシグナルの強度を制御することが考えられた。

最後に、PRMT5 による γc と JAK3 の発現制御メカニズムを検証した。*Prmt5* 欠損 T 細胞では、Sm タンパク質の一つである SmD3 のアルギニンメチル化が認められなかった。SmD3 は、アルギニンメチル化されるとスプライソソーム形成が促進されと考えられているため、*Il2rg* と *Jak3* のスプライシングにおける PRMT5 の関与を解析した。その結果、CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞、stage 1 iNKT 細胞のいずれにおいても *Il2rg* と *Jak3* の恒常的スプライシングが障害されていた。近年、*Il2rg* の選択的スプライシングにより産生される可溶型 γc が、サイトカイン特異的受容体サブユニットに結合してサイトカインシグナルを阻害することが報告されたが、*Prmt5* 欠損 T 細胞において可溶型 γc の mRNA の有意な増加が認められた。以上の結果より、PRMT5 は SmD3 にアルギニンメチル化を施し、pre-mRNA のスプライシング制御を介して、 γc と JAK3 の発現を促進することが示された。

本研究により、PRMT5 を介したタンパク質アルギニンメチル化は、 γc と JAK3 の発現制御を通して、iNKT 細胞の分化と CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の維持や活性化に必要な γc ファミリーサイトカインシグナルを促進することが明らかになった。 γc や JAK3 は、1990 年代前期にクローニングされて以来、免疫系の発生および機能における確固たる重要性が示されてきたが、その発現促進機構は不明であった。本研究において、Sm タンパク質のアルギニン対称性ジメチル化による pre-mRNA のスプライシング制御が、 γc と JAK3 の発現を促進させることが証明された。pre-mRNA スプライシングレベルでの *Il2rg* の発現制御は、可溶型と膜型の γc のバランス調節を可能にし、適切な γc ファミリーサイトカインシグナル強度の制御に重要であると考えられた。

本研究結果によって、T細胞の異常な活性化を認める自己免疫疾患に対して、PRMT5の阻害が抑制効果をもたらす可能性が考えられた。また、PRMT5は免疫監査を担うiNKT細胞やCD8⁺T細胞に重要であることが示されたため、PRMT5阻害剤は抗腫瘍活性を抑制する可能性が示唆された。以上より、本研究成果は、T細胞におけるアルギニンメチル化の生理的機能の一端を明らかにし、PRMT阻害剤のがん或いは自己免疫疾患治療薬の研究開発に際して重要な知見となることが期待される。