

氏名	いわいはら ゆり 祝原 由莉		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1643 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	<b>Marked Reduction in FoxO1 Protein by its Enhanced Proteasomal Degradation in Zfat-deficient Peripheral T- Cells</b> （Zfat 欠損末梢 T 細胞におけるプロテアソームを介した分解の 亢進による FoxO1 タンパク質の顕著な減少）		
論文審査委員	（主 査） 福岡大学	教授	白澤 専二
	（副 査） 福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	教授	安永 晋一郎
	福岡大学	准教授	瀬川 波子

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

Zfat (Zinc finger gene in AITD susceptibility region) は、自己免疫性甲状腺疾患の感受性遺伝子として同定された遺伝子で、そのアミノ酸配列は魚類からヒトに至るまで非常に高度に保存されている。Zfat は DNA 結合ドメインである AT フックドメインと 18 個のジンクフィンガードメインを持ち、核移行シグナル配列を有していることから、転写制御因子ではないかと考えられているが、その機能と役割については未だ明らかになっていない。Zfat は脾臓や胸腺などの T 及び B 細胞に高く発現している。T 細胞特異的に Zfat を欠損させた Zfat のコンディショナルノックアウトマウス、Zfat<sup>f/f</sup>-CD4Cre マウスを作成し、その機能解析を行ったところ、末梢免疫組織において CD4+T 及び CD8+T 細胞数の有意な減少を示した。Zfat 欠損末梢 T 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) 刺激に応答したインターロイキン 2 受容体  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ ) の誘導能及び細胞増殖能の低下を示し、また末梢 T 細胞の恒常性維持に重要な役割をもつ、インターロイキン 7 受容体  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) の細胞表面発現レベルの減少を示した。したがって、Zfat が IL-7R $\alpha$  の発現調節を介して、末梢 T 細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆されたが、Zfat が IL-7R $\alpha$  の発現を制御する分子メカニズムは不明のままである。

FoxO1 は、細胞周期、生存及び代謝を含む、多くの細胞内プロセスを調節するフォークヘッドボックス 0 (FoxO) ファミリーに属する転写因子である。近年、末梢 T 細胞の恒常性維持やホーミングなど、免疫系における FoxO1 の役割が注目され、研究が進んでいる。さらに、末梢 T 細胞において FoxO1 が IL-7R $\alpha$  の発現に必須の転写因子であることが明ら

かにされている。そこで本研究では、*Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの T 細胞における FoxO1 の発現、及び *Zfat* との機能的関連性を明らかにすることを目的とした。

## 【方法と結果】

### *Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの脾臓 CD4+T 及び CD8+T 細胞において FoxO1 タンパク質レベルの著しい減少が見られた

*Zfat* 欠損による IL-7R $\alpha$  の細胞表面発現低下の分子機構を解明するために、まず、T 細胞における Il7r $\alpha$  mRNA の発現を制御する転写因子である、FoxO1 及び FoxP1 の発現レベルを調べた。ナイーブ CD4+T 細胞における FoxO1 及び FoxP1 の mRNA の発現には、*Zfat* 欠損による影響は見られなかった。一方で、*Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの脾臓 CD4+T 及び CD8+T 細胞において、FoxP1 タンパク質レベルには影響はなかったが、FoxO1 タンパク質の発現レベルは、コントロールマウスと比べて、劇的に減少した。これらのデータは *Zfat* 欠損が mRNA の発現に影響を与えることなく、脾臓の CD4+T 及び CD8+T 細胞における FoxO1 タンパク質レベルの著しい減少を引き起こしたことを示している。これにより、*Zfat* 欠損末梢 T 細胞における IL-7R $\alpha$  の発現低下は、FoxO1 タンパク質の減少が関与していることが示唆された。

### *Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの脾臓 CD4+T 及び CD8+T 細胞において FoxO1 のプロテアソームによる分解が亢進している

FoxO1 タンパク質レベルは、主にプロテアソームによる分解を介して調節される。したがって、次にプロテアソーム阻害剤、エポキシオミシンの存在下で、脾臓 CD4+T 及び CD8+T 細胞の ex vivo 培養を行った。エポキシオミシンで 6 時間、T 細胞を処理することで、*Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの脾臓 CD4+T 及び CD8+T 細胞における FoxO1 タンパク質レベルは大幅に回復した。これらの結果より、*Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの末梢 T 細胞において、*Zfat* 欠損によって FoxO1 のプロテアソームによる分解が亢進している可能性が示された。

### *Zfat* 欠損 T 細胞における FoxO1 の分解に関与する分子の解明

FoxO1 のプロテアソームによる分解は、Akt によるリン酸化とそれに続く Skp2 を含む SCF E3 ユビキチンリガーゼ複合体によるユビキチン化が必要である。したがって、*Zfat* 欠損が Skp2 と Akt、同じく FoxO1 の E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 の発現にどのような影響を与えるのかを調べた。その結果、コントロールマウスと *Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウス由来 T 細胞との間に、Skp2 及び Akt、MDM2 のタンパク質の発現レベルに差は見られなかった。また、*Zfat* と FoxO1 や Skp2 との間の相互作用も確認されなかった。これらの結果より、FoxO1 のユビキチン化やリン酸化は、*Zfat*<sup>f/f</sup>-*CD4Cre* マウスの T 細胞における FoxO1 のプロテアソームによる分解の亢進には重要ではないと考えられる。

## 【結論】

本研究では、T細胞特異的 *Zfat* 欠損マウスの末梢 T 細胞において FoxO1 タンパク質が著しく減少することを明らかにした。*Zfat* 欠損は FoxO1 の mRNA レベルには影響を与えず、プロテアソーム阻害剤により FoxO1 タンパク質レベルが回復したことから、*Zfat* 欠損により FoxO1 のプロテアソームによる分解が亢進している可能性が示唆された。しかしながら、その分子メカニズムは不明であり、今後さらなる詳細な解析が必要である。以上より、*Zfat* は、FoxO1 タンパク質レベルを制御することにより、IL-7R $\alpha$  の発現を通じて、末梢 T 細胞のホメオスタシスに重要な分子であると考えられる。

本研究の結果から、*Zfat* は FoxO1 タンパク質の発現を制御することにより末梢 T 細胞の生存およびホーミングに重要な因子であることが示唆された。*Zfat* による FoxO1 の分解制御機構の解明は、末梢 T 細胞の恒常性をより深く理解することに繋がると考えられる。

## 審査の結果の要旨

*Zfat* は自己免疫疾患の感受性遺伝子として申請者のグループによって同定され、T細胞特異的 *Zfat* 欠損マウスでは末梢 T 細胞数が著しく減少することをこれまでに報告している。一方、FoxO1 は、細胞周期、生存及び代謝など、様々な細胞内プロセスの制御に関与する転写制御因子であり、末梢 T 細胞においても、恒常性維持やホーミングなど、重要な役割を担っていることが知られているが、その発現制御の分子メカニズムについては不明な点が多い。本論文では、*Zfat* 欠損 T 細胞において、末梢 T 細胞の生存に重要な役割を担う IL-7R $\alpha$  の転写制御因子として知られている FoxO1 が、プロテアソームによるタンパク質分解の亢進により、著しく減少することを初めて明らかにした。また、*Zfat* 欠損が PI3K/Akt シグナル経路とオートファジーの過剰な活性化を引き起こすことを示した。従って、本論文は、T細胞において、*Zfat* が転写制御因子 FoxO1 のタンパク質レベルの維持に必須の因子であり、PI3K/Akt シグナル経路とオートファジーの制御に関与することを明らかにした最初の報告であり、T細胞における *Zfat* の分子機能を明示し、*Zfat* が関与する免疫関連疾患の分子レベルでの更なる解明に発展していくことが期待される。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、主な質疑応答は以下のとおりである。

### 1. 斬新さ

*Zfat* 欠損 T 細胞において、末梢 T 細胞の生存に重要な役割を担う IL-7R $\alpha$  の転写制御因子として知られている FoxO1 が、そのタンパク質分解の亢進により、著しく減少すること

初めて明らかにした。さらに、末梢 T 細胞において、FoxO1 のタンパク質分解にリソソームが関与すること、及び Zfat が PI3K/Akt シグナル経路とオートファジーの活性制御に関与するという全く新しい知見についても報告した。

## 2. 重要性

FoxO1 は、細胞周期、生存及び代謝など、様々な細胞内プロセスの制御に関与する転写制御因子である。近年、末梢 T 細胞の恒常性維持やホーミングなど、T 細胞における FoxO1 の役割が注目されているが、その発現制御の分子メカニズムについては未だ不明な部分が多い。本論文において、末梢 T 細胞の FoxO1 タンパク質レベルが、Zfat によって制御されていることが明らかとなり、Zfat が関与する免疫関連疾患の分子レベルでのより良好な理解へと発展していくことが期待される。

## 3. 実験方法の正確性

本研究に使用したコンディショナルノックアウトマウスは既に確立されたものであり、ウエスタンブロッティング法や阻害剤を用いた試験についても実験手法としてこの分野において汎用されている。また、複数回の実験において再現性のある信憑性の高い結果であり、実験方法の正確性は保たれているものと考えられる。

## 4. 表現の明確さ

研究目的、方法、実験結果、考察は、いずれも明確に記載された英語論文と判断される。

## 5. 主な質疑応答

Q1:

*Zfat* 欠損による Akt の過剰な活性化のメカニズムは？

A1:

PI3K の阻害剤を用いた実験の結果から、PI3K の異常により Akt の過剰な活性化が起きている可能性が示唆されます。しかし、*Zfat* 欠損により PI3K が活性化するメカニズムについては不明です。T 細胞において PI3K を活性化する機序としては TCR、CD28、IL-2 受容体からのシグナルなどが知られているため、それらのシグナル伝達制御に *Zfat* がどのように関与しているのかを今後検討する予定です。

Q2:

FoxO1 の核から細胞質への輸送の亢進について、Akt の過剰な活性化以外に考えられる要因は？

A2:

FoxO1 の翻訳後修飾は Akt によるリン酸化以外に PRMT1 によるメチル化などが知られております。FoxO1 の翻訳後修飾の影響に関しては今現在、検討を行っております。

Q3:

*LckCre* や *CD4Cre* のように Cre-loxp システムを用いて B 細胞で *Zfat* を欠損させた場合でも同様の現象がみられるのか？

A3:

今回はまず T 細胞に着目し、実験を行いました。*Zfat* は B 細胞にもその発現が認められますので、*CD19Cre* マウスなどを用いて、B 細胞特異的 *Zfat* 欠損マウスを作製し、B 細胞における *Zfat* の役割等についても今後検討していきたいと考えています。

Q4:

*Zfat* をノックアウトすることにより、T 細胞の分化に影響はあるのか？

A4:

胸腺における T 細胞の分化は、DN 細胞→DP 細胞→CD4SP、CD8SP 細胞と進んでいきますが、*Zfat* 欠損により DP 細胞の割合が減少すること、ポジティブセレクションの障害が起こるという過去の報告があります。

Q5:

T 細胞における *Zfat* 欠損は B 細胞には影響を及ぼさないのか？

A5:

T 細胞特異的 *Zfat* 欠損マウスである *Zfat<sup>f/f</sup>-LckCre* マウス、*Zfat<sup>f/f</sup>-CD4Cre* マウスにおいては、そのいずれにおいても、*Zfat* 欠損により B 細胞数に影響は見られませんでした。また、オートファゴソームレベルも B 細胞では変化していないことを確認しております。

Q6:

オートファジーによるタンパク質分解の亢進は、FoxO1 に特異的なのか？

A6:

いえ、*Zfat* 欠損 T 細胞において、FoxO ファミリーの FoxO3 など、他のいくつかのタンパク質発現も低下していることを確認しております。しかしながらある程度の選択性はあるものと考えています。近年、オートファジーによる分解経路において、ユビキチンシステムを利用した分解基質の選択があるという報告がありますので、そのような機構についても今後検討する予定です。

Q7:

FoxO1 のウェスタンブロッティングのバンドは 2 本なのか？1 本なのか？

A7:

今回用いた FoxO1 抗体によるウェスタンブロッティングで検出されるバンドは 2 本です。ただし、実験系の誤差として、2 本のバンドの濃淡にばらつきがあります。分解経路の阻害により回復するバンドは、上のバンドです。移動度の違いについては翻訳語修飾によるものではないかと考えています。

Q8:

In vivo においても、今回用いた様々な阻害剤の投与により FoxO1 タンパク質レベルの回復が見られるのか？

A8:

今回、in vivo での検討は行っておりませんが、その可能性は十分にあると考えています。また、T 細胞特異的 *Zfat* 欠損マウスに阻害剤を投与することにより、T 細胞数の回復に繋がる可能性も考えられます。

Q9:

FoxO1 はインスリンシグナルによって制御されていることが知られているが、マウスの栄養状態が FoxO1 タンパク質レベルに影響を与えている可能性は？

A9:

その可能性は考えられます。今回実験に使用したマウスは、普通飼料によって飼育しておりますが、マウス飼料を高脂肪食などに変更する実験なども今後検討いたします。

Q10:

*Zfat* 欠損による FoxO1 タンパク質の減少は胸腺では見られないのか？

A10:

*Zfat* をノックアウトすることで、FoxO1 タンパク質レベルが低下するのは末梢でのみ認められる現象です。FoxO1 は、胸腺と末梢で異なる発現制御を受けていると考えられます。

以上の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。