

論文の内容の要旨

論文題目 Cas-L (Crk-associated substrate lymphocyte type) is essential for retention of marginal zone B cells
Cas-L は辺縁帯B細胞の保持に不可欠である

指導教官 平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 瀬尾 幸子

インテグリンは接着分子の中の1つのファミリーであり、細胞間あるいは細胞と細胞外マトリックスとの間の相互作用に重要な働きを担っている。インテグリンに関する報告は数多くなされており、細胞接着、遊走、細胞分化・増殖、さらには細胞死にまで関与していると言われている。インテグリンファミリーの中で最も多様な亜群を形成しているのは、 $\beta 1$ インテグリンである。 $\beta 1$ インテグリンはそのリガンドであるフィブロネクチンやコラーゲンと結合することにより、多数の細胞内蛋白質をチロシンリン酸化させ、細胞内にシグナルを伝達している。そのインテグリン刺激によってリン酸化される蛋白質の一つに Cas (Crk-associated substrate) がある。Cas は元々癌遺伝子 v-crk による形質転換細胞内チロシンリン酸化蛋白質として同定されたアダプター分子であり、動物の発生、炎症、癌の浸潤・転移などに重要な役割を担っている。Cas のノックアウトマウスは心臓低形成による全身鬱血と成長遅延により胎生 11.5 日に死亡する。

Cas-L (Cas-lymphocyte type) は Cas ファミリーの1つであり、 $\beta 1$ インテグリンによりチロシンリン酸化される 105KD の蛋白として同定された。また同時に出芽酵母に偽菌糸を誘導する蛋白質としても同定され、HEF1 (human enhancer of filamentation) としても知られている。Cas-L はN末端に SH3 領域、続いて基質領域、セリン豊富領域、そしてC末端にヘリックスターンヘリックス領域があり、Cas との強い相同性を保持している。しかしながら、Cas が全身の細胞に発現しているのに対して、Cas-L はリンパ球と一部の上皮細胞に発現が限局しているのが特徴である。現

在までの研究で Cas-L は接着斑でのアダプター分子としての機能に加えて、細胞核内に移行して、細胞周期やアポトーシスに関与していることも明らかにされている。また、T細胞上ではインテグリンを介してのT細胞受容体 (TCR) 刺激の co-stimulation (副刺激) に作用するだけではなく、Lck や Fyn に結合して、TCR からのシグナル伝達に直接関与することも分かっている。B細胞における解析は比較的少ないが、B細胞受容体 (BCR) 刺激により直接チロシンリン酸化されることが報告されている。

従来の Cas-L の研究はすべて細胞レベルでの解析であり、本研究で私は Cas-L ノックアウトマウスを作成することにより、生体内での Cas-L 遺伝子の機能を解析することを試みた。

ノックアウトマウスは Cas-L 遺伝子N末端の SH3 領域をコードするエクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作成された。Cas-L ノックアウトマウスは、正常に出生し、外観、血算、各臓器の組織学的検査では異常は認められなかった。次に骨髄、脾臓、胸腺、リンパ節、腹腔洗浄液、および末梢血に関して、Flow cytometry を用いた一般的なリンパ球分画の解析を行った。脾臓において総細胞数の軽度減少が認められた以外は、コントロールマウスに比べて明らかな違いは認められなかった。

一般にB細胞は、骨髄で細胞表面に IgM を呈した未熟B細胞まで分化すると、その分化の場所を脾臓に変える。脾臓では未熟B細胞は濾胞B細胞 (IgD 陽性、IgM 弱陽性) および marginal zone B細胞 (IgD 陰性、IgM 陽性) へとさらに分化し、前者は白脾髄の濾胞部分に、後者は白脾髄と赤脾髄の境界の辺縁帯とよばれる部分に局在する。Cas-L ノックアウトマウスに関して末梢B細胞の分化を解析したところ、marginal zone B細胞の消失が明らかとなり、同時に濾胞B細胞の軽度増加が認められた。この marginal zone B細胞の消失を組織レベルで確認するため、免疫染色を行った。IgM 陽性、IgD 陰性細胞である marginal zone B細胞がコントロールマウスでは認められるのに対して、ノックアウトマウスでは消失していることが確認された。

この marginal zone B細胞の消失が血球系細胞由来のものであるのか、あるいは支持組織などの環境因子によるものであるのかを鑑別するため、骨髄移植実験が施行された。その結果、野生型マウスに移植されたノックアウトマウス由来の骨髄からは marginal zone B細胞はほとんど検出されなかったが、ノックアウトマウスに移植されたコントロールマウス由来の骨髄からは正常に marginal zone B細胞が認められた。従って、Cas-L ノックアウトマウスにおける marginal zone B細胞の消失は Cas-L 欠損B細胞自身に由来することが分かった。

現在までに marginal zone B細胞が消失する表現型を示した遺伝子改変マウスは多数報告されている。未だその消失の原因は明らかとはなっていないが、いくつかの可能性が示唆されている。第1の可能性は、marginal zone B細胞の前駆体の消失によるものである。BAFF あるいは BAFF-R のノックアウトマウスでは未熟B細胞以降の分化が止まっており、濾胞B細胞が消失することで marginal zone B細胞も消失したものと考えられている。第2の可能性は BCR からの刺激の強さによって、濾胞B細胞と marginal zone B細胞の分化の振り分けが決定するというものである。Aiolos のノッ

クアウトマウスや Notch-RBP-J の B 細胞特異的ノックアウトマウスで提示された仮説であり、著者らは何らかの negative regulator の関与を指摘している。第 3 は marginal zone B 細胞の局在部位である辺縁帯への遊走と接着が障害された結果、marginal zone B 細胞が保持できないという可能性であり、Pyk2 あるいは Dock2 のノックアウトマウス等により提示された。今回私が作成した Cas-L ノックアウトマウスは、marginal zone B 細胞以外明らかな異常を呈していないことから、第 1 の可能性は否定されるものと考えられる。第 2 の可能性に関しては、Cas-L が Lyn と結合して BCR からのシグナル伝達に関与していることを考慮すれば、否定はできない。従って Cas-L ノックアウトマウスにおいて、BCR を介したシグナル伝達に異常がないかを検索するため、各種抗原刺激に対する細胞内カルシウム濃度の測定と B 細胞増殖実験を行った。その結果、BCR からのシグナル伝達に明らかな異常は認められなかった。

第 3 の可能性である辺縁帯への移動と同部への接着異常は、細胞レベルでの解析により Cas-L が発現していない T 細胞では著しく遊走能が低下するという報告があることから最も可能性が高いと考えられた。まず私は Cas-L ノックアウトマウスのリンパ球の遊走能を確認するため、末梢リンパ球に対する強い遊走活性化因子である SDF (Stromal cell derived factor) -1 α と BLC (B-lymphocyte chemokine) を用いた遊走実験を試みた。その結果、Cas-L 欠損 B 細胞で明らかに遊走能が低下していることが分かった。さらに辺縁帯での接着能が正常か否か確認するため、辺縁帯における接着に関連していると考えられている ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) と VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) を用いて解析を行ったところ、予想どおり接着能の低下が認められた。これらの機能低下が各種ケモカインや接着因子に対する受容体の発現の低下と関連しているかどうか調べるため、flow cytometry により各分画ごとに各種受容体の発現を調べた。その結果、インテグリン受容体の発現はどの分画でも明らかな差異は認められなかったが、SDF-1 α の受容体、CXCR4 は marginal zone B 細胞で有意に上昇していることが判明した。このデータの再確認のため、メッセンジャー RNA レベルでの CXCR4 の発現を定量 PCR で調べたところ、flow cytometry の結果と同様、ノックアウトマウスで発現の上昇が認められた。

以上の解析より、Cas-L は marginal zone B 細胞の維持に重要な役割を担っており、Cas-L ノックアウトマウスにおける marginal zone B 細胞の消失は、辺縁帯への遊走および同部への接着異常により生じているものと考えられた。辺縁帯への接着が低下することにより、marginal zone B 細胞が脾臓外へ流出する可能性も考えられたが、他部位での marginal zone B 細胞の異常増加は認められておらず、私は辺縁帯での接着以前の、同部への移動の障害が最大の原因ではないかと考えている。辺縁帯への遊走のメカニズムは未だ解明されていないが、今回、私の解析で Cas-L ノックアウトマウスの marginal zone B 細胞において、CXCR4 の発現が著明に上昇していることは、SDF-1 α の関与を強く示唆するものである。