

## 論文の内容の要旨

論文題目      Analysis of c-Cbl deficient fibroblasts  
                    (c-Cbl ノックアウトマウスの線維芽細胞の解析)

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 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 松村 有子

c-Cbl は、マウスに感染すると B リンパ系腫瘍を発症するレトロウイルスの遺伝子より、proto-oncogene として同定された分子である。RING フィンガードメイン、SH2、SH3 ドメインより構成される 120 kDa のタンパクで、全身の組織に普遍的に発現している。c-Cbl は T 細胞受容体や B 細胞受容体、EGF 受容体、PDGF 受容体、IL-2 等のサイトカイン受容体、インスリン受容体等を通じた様々な細胞外刺激によりリン酸化され、シグナル伝達経路で重要な役割を担う。また、Syk、Zap、Src、Grb2、Nck、Crk、PI-3 kinase 等と結合することが知られている。上記の受容体下流のシグナル伝達において、c-Cbl は RING フィンガードメインを介してユビキチン化に関与し、負の制御を行うことが明らかにされている。

近年、c-Cbl が細胞形態やアクチンの細胞骨格形成においても重要な役割を担う事がわかってきた。インテグリン下流のシグナル伝達経路においては、c-Cbl は SH3 ドメインを介して PI-3 K にシグナルを伝達し、正に制御すると考えられているが、未だ不明な点が多い。これまでの多くの実験は c-Cbl を細胞に過剰発現させた系で行われており、特に生理的な条件下における c-Cbl の役割の解析については報告されていなかった。

そこで、c-Cbl ノックアウトマウスから得た胎児線維芽細胞を用いて、フィブロネクチンによるインテグリン刺激を行い、細胞の接着、伸展、運動能について野生型同胞マウスの胎児線維芽細胞と比較する実験を行った。その結果、c-Cbl 欠損線維芽細胞では、フィブロネクチン刺激による細胞の移動 (migration) が有意に低下していた。一方、フィブロネクチンをコートした培養皿への細胞の接着伸展 (spreading) は、ノックアウトマウス由来細胞は野生型に比べて迅速であった。細胞のフィブロネクチンへの固着 (adhesion) や *in vitro* での損傷回復には両者に明らかな差はみられなかった。

次に抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) を用いたウェスタンブロットを行い、インテグリン刺激後のタンパクリン酸化を、c-Cbl ノックアウトマウスと野生型マウスの線維芽細胞で比較した。c-Cbl 欠損細胞ではインテグリン刺激後の FAK、Cas、Crk のチロシンリン酸化が正常細胞に比べて有意に低下していた。Paxillin、Src、Akt、JNK、Erk のリン酸化には明らかな差を認めなかった。以上より c-Cbl は線維芽細胞において、FAK、Cas、Crk を介したインテグリンシグナル伝達に関与していると考えられた。免疫共沈降法にて、c-Cbl と FAK、c-Cbl と Cas、Cas と Crk が共沈された事から、これらのタンパクが集合体を形成している事が示唆された。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に属する Rac、Rho は、アクチン細胞骨格を再構成し、細胞運動と接着を制御している。c-Cbl 欠損細胞と野生型細胞において、インテグリン刺激後の Rac、Rho の活性を調べた。正常細胞ではインテグリン刺激後に Rac、Rho の活性が上昇し、数十分後にピークを迎えた後は活性が低下する時間的推移がみられた。しかし c-Cbl 欠損細胞では、インテグリン刺激前の Rac、Rho の活性が正常細胞に比べて有意に高く、さらにインテグリン刺激後の活性上昇が見られなかった。このことから、c-Cbl 欠損細胞では、インテグリン刺激による Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の経時的な活性制御が障害されていると考えられる。正常細胞の細胞運動においては、インテグリン刺激後に Rho ファミリータンパクが正確な時間的秩序に沿って活性化・不活性化される結果、アクチン細胞骨格の再編成が動的に制御されると考えられている。c-Cbl 欠損細胞では、時間的な Rho

ファミリータンパクの活性化の制御が障害され、結果として細胞移動能が低下していると考えられる。活性型の Rac や Rho を強制発現させた細胞ではアクチン骨格の再構成は認められるものの運動能は低下することがこれまでに報告されているが、c-Cb1 欠損細胞で、移動能が低下しても接着伸展能は高くなるのは、インテグリン刺激前後を通じて Rho の活性が高いことから、活性型の Rac、Rho を強制発現させた細胞と類似の状況にあることが推測される。これまでに、Rho ファミリータンパクは Cas/ Crk の結合により調節を受けていることが明らかにされているため、c-Cb1 は Cas のシグナル伝達経路に関与してこれを正に制御し、Cas を介して Rho ファミリータンパクの活性化を調節している事が示唆される。

MAPK の一つである p38 のインテグリン刺激によるリン酸化も、c-Cb1 欠損細胞では野生型細胞に比較して有意に低下していた。p38 も細胞運動に重要な役割を果たすことが報告されているが、そのシグナル伝達経路については不明である。p38 の薬理的阻害物質存在下では、フィブロネクチン刺激による細胞運動能が低下した。よって、c-Cb1 は p38 のリン酸化を正に制御し、細胞運動を正に調節している可能性がある。