

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 β_1 インテグリン下流シグナル分子 Crk-associated substrate

lymphocyte type(Cas-L)の関節リウマチの病態における役割について

指導教官 森本 幾夫 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 三宅 ~~(西島)~~ 里歌子

背景・目的

β_1 インテグリンは細胞接着、細胞遊走、細胞増殖、サイトカイン産生、アポトーシス等の様々な生物学的機能に関与するだけでなく、細胞内シグナル伝達にも重要な役割を担っており、接着シグナルを細胞内シグナルに変換するシグナル伝達レセプターとして働く。関節リウマチ(RA)の炎症反応に β_1 インテグリンを介する細胞の活性化やその後の T 細胞遊走能の亢進が関与するという証拠が多数蓄積している。RA 患者における滑膜細胞、滑液細胞や血管内皮細胞では β_1 インテグリン及びそのリガンドであるフィブロネクチンや VCAM-1 等の発現が高まっている。本研究は、 β_1 インテグリン下流のシグナル分子であり、T 細胞の活性化に続く IL-2 産生および細胞遊走能に重要な Crk-associated substrate lymphocyte type(Cas-L)の RA での病態における意義を明らかにすることを目的とした。そこでまず、RA 様病態を呈する HTLV-I Tax transgenic mouse を用いて細胞遊走能と Cas-L の発現及

びそのチロシンリン酸化、免疫組織学的検討を行った。更にそこで得られた知見に基づいて関節リウマチ患者滑膜を用いた免疫組織学的検討を行った。

実験材料及び方法

1) 動物

HTLV-I Tax transgenic mouse 関節炎発症前の 4 週齢マウス、関節炎発症後の 14 週齢マウスおよび対照群として Littermate Control マウス (Ct) を各群 3 匹ずつ用いた。14 週齢マウスでは、関節炎を発症したマウスを Atg、発症していないマウスを Ntg と分別した。

2) 細胞遊走能の測定

細胞遊走能は各群のマウスより脾細胞を分離し、マウス内皮細胞を単層に撒いたケモタキシスチャンパー(Transwell)に無刺激下で遊走した細胞数をフローサイトメーターで測定した。

3) Cas-L 蛋白質及び β_1 インテグリン下流シグナル蛋白質発現とチロシンリン酸化

蛋白質発現及びチロシンリン酸化は各群のマウスより脾細胞、脾臓、リンパ節、胸腺を採取しライセートを作製後、免疫沈降に続くウエスタンブロット法により解析した。

4) Cas-L mRNA 発現

14 週齢のマウス脾臓より tRNA を抽出後、ノーザンブロット法により解析した。

5) 細胞表面分子の発現

β_1 インテグリンを始めとする細胞表面分子の発現は、14 週齢のマウス脾細胞を蛍光ラベル抗体で免疫染色後、フローサイトメーターにより陽性細胞率を解析した。

6) マウス関節組織、関節リウマチ患者滑膜組織における Cas-L 蛋白質発現

14 週齢のマウスより関節組織切片を作製後、ヘマトキシリン&エオジン染色と免疫染色(酵素抗体法)により解析した。関節リウマチ患者滑膜に関しても同様に解析した。対照として変形性関節症患者滑膜を用いた。

結果

1) Tax transgenic mouse における脾細胞遊走能は、関節炎発症前の 4 週齢のマ

ウスにおいて脾細胞遊走能の亢進が認められた。更に関節炎発症後の 14 週齢のマウスにおいても、脾細胞遊走能の亢進が認められた。

- 2) Tax transgenic mouse における Cas-L 蛋白質発現とチロシンリン酸化も、関節炎発症前の 4 週齢のマウスにおいて亢進が認められ、関節炎発症後の 14 週齢のマウスにおいても亢進が認められた。
- 3) Tax transgenic mouse における Cas-L mRNA 発現は 14 週齢の関節炎を発症したマウスで特に亢進が認められた。
- 4) β_1 インテグリンを始めとする接着分子の発現及び T 細胞マーカの発現は変化が認められなかった。
- 5) β_1 インテグリン下流チロシンキナーゼの発現は、14 週齢の関節炎を発症した Tax transgenic mouse において Src ファミリーチロシンキナーゼ fyn, lck 蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。
- 6) Tax transgenic mouse の関節組織における Cas-L 蛋白質発現は、関節炎を起こしたマウスにおいて特に小結性集簇が認められる部分や関節腔と思われる部位に Cas-L 陽性細胞の浸潤、集積が認められた。
- 7) 関節リウマチ患者滑膜における Cas-L 蛋白質発現は、主として滑膜に浸潤した CD3 陽性 T 細胞に認められた。一方対照とした変形性関節症患者滑膜においては Cas-L 蛋白質の発現が認められなかった。

考察

本実験では、リウマチモデルマウスの Tax transgenic mouse を用いて脾細胞遊走能、脾臓、リンパ節における Cas-L 発現およびチロシンリン酸化、関節における Cas-L 発現を検討した。その結果、関節炎発症前及び関節炎発症後において脾細胞遊走能の亢進、Cas-L 蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。Cas-L 蛋白質の発現が亢進した理由として、臓器へのリンパ球浸潤による可能性が考えられたが、関節炎を発症したマウスにおいて Cas-L mRNA 発現が亢進していたことから、単一細胞レベルで Cas-L 発現が亢進していたと考えられる。また、 β_1 インテグリンを始めとする接着分子の発現及び T 細胞マーカの発現は変化が認め

られなかったことから、Cas-L の発現亢進が関節炎の発症及び炎症反応の遷延に
関与した可能性が考えられる。Cas-L 蛋白質は従来 β_1 インテグリンから FAK また
は Src family チロシンキナーゼよりチロシンリン酸化を受けて下流へシグナルを伝
達する。関節炎を発症したマウスで認められた Cas-L 蛋白質のチロシンリン酸化は、
主として Src family チロシンキナーゼによりチロシンリン酸化を受けていた可能性
が考えられた。更に関節炎症部位における Cas-L 蛋白質発現を検討した結果、浸潤
した全ての細胞が Cas-L 陽性細胞ではなく、小結性集簇が認められる部分や関節腔
と思われる部位に浸潤した細胞で特に Cas-L 陽性反応が認められたことから炎症
部位への細胞浸潤に Cas-L が重要である可能性が考えられた。

最後に、関節リウマチ患者の炎症反応の場である滑膜における Cas-L 蛋白質の発
現を検討した結果、滑膜に浸潤した CD3 陽性 T 細胞に Cas-L 蛋白質の発現が認め
られた。このことから、ヒトにおいても Cas-L 蛋白質は関節リウマチにおいて関節部
位への細胞浸潤や炎症の増悪、遷延に関与している可能性が考えられる。

以上の結果より、 β_1 インテグリンのシグナル分子である Cas-L が関節リウマチ
の炎症に深く関与する可能性が示唆された。今後、関節リウマチモデルマウスにお
ける Cas-L 遺伝子アンチセンスの治療効果の検討、また野生型及びドミナントネガ
ティブ Cas-L 遺伝子トランスジェニックマウスや Cas-L 遺伝子ノックアウトマウ
スの解析等の更なる検討を行うことは、関節リウマチの病因、病態を解明するのみ
ならず、Cas-L 分子に基づく新しい治療法、治療薬の開発等臨床応用を可能にする
と考えられる。

結論

本研究では、関節リウマチモデルマウスの HTLV-I Tax transgenic mouse と関節
リウマチ患者検体を用いた解析により、関節炎発症と炎症反応の遷延にはリンパ球
における β_1 インテグリン下流アダプター蛋白である Cas-L の発現とチロシンリン
酸化が関与する可能性が示唆された。