

論文の内容の要旨

論文題目 $\beta 1$ インテグリン下流分子 Cas-L (Crk-associated substrate lymphocyte type) とアダプター蛋白 Nck との相互作用による T 細胞活性化及び遊走能の解析

指導教員 森本幾夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 橋爪 裕

背景・目的

$\beta 1$ インテグリンは、 $\alpha \beta$ ヘテロダイマーからなる細胞表面に発現する接着分子であり、細胞外基質あるいは VCAM-1 分子などのリガンドとの特異的な相互作用を介して細胞接着、細胞遊走、サイトカイン産生、増殖、分化、アポトーシスの回避といった様々な生物学的機能を発揮することが示されている。

当研究室は VLA-4 あるいは VLA-5 とフィブロネクチンのように $\beta 1$ インテグリンとそのリガンドとの相互作用がヒト T 細胞において、CD3/TCR 刺激に対する共刺激シグナルを惹起することを報告してきた。その過程で、T 細胞において $\beta 1$ インテグリン刺激によりチロシンリン酸化される蛋白 (pp105) として、Cas-L の cDNA をクローニングした。Cas-L が $\beta 1$ インテグリン刺激のみならず、TCR や BCR における刺激により強いチロシンリン酸化を受けるドッキング蛋白であること、そのリン酸化は、FAK や Src ファミリーチロシンキナーゼにより引き起こされることが当研究室や他の研究者により明らかにされた。Cas-L は TCR や $\beta 1$ インテグリン刺激により誘導される T 細胞の遊走や IL-2 産生にとって重要な役割を果たす分子であることも当研究室は明らかにした。当研究室や他の研究者らは以前に Nck と Cas ファミリー蛋白 (Cas-L 及び p130Cas) の結合を報告したが、その結合の生物学的な意義はこれまで完全には明らかにされていない。

本研究は、当研究室独自に cDNA をクローニングした Cas-L と Nck との会合部位、

会合メカニズム、及びその T 細胞における生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

実験材料及び方法

1)免疫蛍光染色法

293A 細胞へ各プラスミドをトランスフェクトした。細胞は固定、透過、ブロッキングし、Cy3-標識抗-c-myc mAb、FITC-標識抗-Flag mAb を用いて染色した。

2)内在性 Cas-L に対する shRNA 発現ベクターの作製と導入

U6 プロモーターを用いる、レトロウイルスプラスミドを用いて、Cas-L ヘアピン RNA 発現ベクターを作製した。パッケージング細胞 GP2-293 にトランスフェクトし、培養上清中のレトロウイルスを回収し、H9T細胞株に感染させ puromycin 選択により Cas-L shRNA 導入株を樹立した。

3)細胞遊走能の解析

細胞遊走能は Transwell insert を使用し評価した。

4)IL-2 の ELISA による測定

H9 細胞を刺激後 24 時間培養し、100 μ l の上清を回収した。培養上清中の IL-2 濃度は ELISA Kit を用い添付プロトコールに従い測定した。

5)等密度スクロース勾配遠心法による脂質ラフトの分離

細胞を溶解後にホモジネートした。その後スクロースを重層し超遠心を行い分離した。

6)Cas-L ノックアウトマウス

Cas-L ノックアウトマウスは瀬尾らによって作製されたものを供与された。解析は主に 8~12 週齢の性別の一致した同腹仔を用いた。動物実験を行うに当たり医科学研究所動物実験委員会の審査を受け承認されている。

結果

1)Fyn、Lck、Src 及び FAK の存在下での Cas-L と Nck の共沈実験において、Src ファミリーチロシンキナーゼあるいは FAK により、チロシンリン酸化を受けた Cas-L が Nck とチロシンリン酸化依存性に結合することが示された。

2) Cas-L の Nck との結合領域を特定するため、Cas-L の欠失変異体と Nck SH2 変異体を使用し共沈実験を行った。その結果、Cas-L と Nck が Cas-L の substrate domain と Nck の SH2 domain において、Cas-L のチロシンリン酸化依存性に結合することが明らかとなった。

3) Cas-L と Nck が細胞内のどこで相互作用するかを調べるため、293A 細胞を用いた過剰発現系を使用し、Cas-L と Nck の細胞内局在を免疫蛍光染色法を用いて検討した。その結果、Cas-L と Nck はチロシンリン酸化依存性に細胞質に共局在することが示された。

4) 内在性 Cas-L と Nck が H9 細胞において結合するかどうかを共沈実験により検討した。その結果、H9 細胞において、内在性 Cas-L は β 1 インテグリンあるいは TCR/CD3 刺激によりチロシンリン酸化されることで、Nck と結合することが示された。

5) Cas-L と Nck の脂質ラフトにおける結合について解析を行った。その結果、H9 細胞の内在性 Cas-L は Nck と脂質ラフトにおいて TCR/CD3 刺激により結合することが示された。

6) Cas-L と Nck の相互作用の生物学的意義を明らかにするため、Cas-L の shRNA を導入し、内在性 Cas-L の発現レベルを減少させた H9 細胞株を樹立した。Cas-L の shRNA を導入した H9 細胞は細胞遊走能及び IL-2 産生能が減少することが示された。

7) In vivo での Cas-L と Nck の相互作用の生物学的重要性を解析するため、Cas-L ノックアウトマウスを用い、脂質ラフトにおけるこれら蛋白の刺激依存性相互作用を検討した。その結果、Cas-L ノックアウトマウスにおいては TCR/CD3 及びケモカイン刺激による Nck の脂質ラフト移行が減少していることが示された。

考察

本研究において、私はチロシンリン酸化された Cas-L と Nck が結合し、その結合が T 細胞における β 1 インテグリンあるいは TCR/CD3 を介する刺激によって誘導される細胞遊走や IL-2 産生において重要な役割を果たすことを示した。Cas-L のチロシンリン酸化レベルはチロシンリン酸化酵素及びチロシン脱リン酸化酵素により制御される。このリン酸化、脱リン酸化依存性の足場蛋白としての機能は、細胞外刺激に由来する多彩なシグナルの中継や、収束・拡散にとり非常に重要である。更に本研究により FAK や Src ファミリーチロシンキナーゼはインテグリンや TCR/CD3 を介したシグナル伝達において Cas-L のチロシンリン酸化にとって重要な役割を果たす事が示された。細胞遊走に関して、Nck は重要な役割を果たしており、WASP をはじめとするエフェクター蛋白との複合体形成がアクチン細胞骨格の制御に関与していることが示唆されている。本研究で示されたように、チロシンリン酸化された Cas-L は、Nck の SH2 domain と結合することにより、これらの蛋白質複合体を安定化するか、あるいは

更なる超分子の複合体を構成する可能性が考えられる。Cas-L の shRNA を導入した H9 細胞を用いた解析において、Cas-L の発現が減少した H9 細胞では細胞遊走や IL-2 産生が有意に低下していることが明らかとなった。Cas-L の発現低下は Nck と同様に他の Cas-L と結合するシグナル伝達分子に対しても影響を与えている可能性が考えられ、今後 RNAi による個々の Cas-L 結合分子のターゲティングあるいはノックアウトマウスを用いた解析が重要である。Cas-L が細胞のシグナル伝達において重要な機能を持つ脂質ラフトに局在することも明らかにしたが、最近の知見では、脂質ラフトが集合したマクロドメインは T 細胞シグナル伝達系において非常に重要であることが報告されている。Nck-SLP76-Vav 複合体や Nck-WASP-Arp2/3 複合体は脂質ラフトや免疫シナプスに関連して特に重要である。また、Nck-WASP-Arp2/3 複合体は TCR とアクチン骨格系を結びつける。更に、TCR と $\beta 2$ インテグリンは成熟した免疫シナプスを形成し維持するためにともに必要であることが報告されている。本研究において、TCR や $\beta 1$ インテグリン刺激あるいはケモカイン SDF-1 の刺激により、Nck は脂質ラフトへリクルートされ、Cas-L とチロシンリン酸化依存性に結合することが明らかとなった。最近、瀬尾らによって樹立された Cas-L ノックアウトマウスでは、辺縁帯 B 細胞の欠損、二次リンパ組織の細胞数の減少が認められ、Cas-L 欠損リンパ球は、インテグリンのリガンドである VCAM-1、ICAM-1 に対する接着能や、ケモカインに対する遊走能の低下を示した。本研究で得られた結果は、同マウス由来リンパ球の細胞接着能や細胞遊走能の低下の理由を部分的にはあるが説明できると考えられる。関節リウマチの関節滑液のリンパ球において Cas-L のチロシンリン酸化が亢進し、滑膜においても浸潤した CD3 陽性 T 細胞に Cas-L が強発現していることを当研究室は報告してきた。関節リウマチではインテグリンのリガンドである VCAM-1 や ICAM-1 が発現した関節滑膜への T 細胞浸潤がみられ、Cas-L と Nck の相互作用が関節リウマチの病態解明に重要な意義を有すると考えられる。

結論

本研究において、 $\beta 1$ インテグリン及び TCR を介した刺激により Cas-L と Nck が T 細胞の脂質ラフトにおいてチロシンリン酸化依存性に結合し、細胞遊走や IL-2 産生において重要な役割を果たしていることが示唆された。この知見は、T 細胞が滑膜に浸潤している関節リウマチの病態解明や新たな治療開発にも寄与すると考えられる。