

審査の結果の要旨

氏名 橋爪 裕

本研究はT細胞において細胞遊走やIL-2産生に重要な役割を演じているCas-Lの脂質ラフトにおけるNckとの相互作用の重要性を明らかにするため、293T細胞を用いた過剰発現系、ヒトT細胞株にshRNAを導入しCas-Lを減少させた系及びCas-Lノックアウトマウスを用いNckとの会合部位、会合メカニズム及びその生物学的意義について解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. Fyn、Lck、Src及びFAKの存在下でのCas-LとNckの共沈実験により解析したところ、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により解析したところ、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示された。
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により解析したところ、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解析したところ、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したところ、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細胞株を樹立し解析したところ、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解析したところ、Cas-L ノックアウトマウスにおいて 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。

以上、本論文は $\beta 1$ 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を明らかにした。本研究は、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、学位の授与に値するものと考えられる。