

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591158

研究課題名 (和文) Cas ファミリー蛋白質の関節リウマチ及び骨粗鬆症における病態生理学的意義の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the role of Cas family proteins in pathophysiology of rheumatoid arthritis and osteoporosis

研究代表者

氏名 (アルファベット) 岩田 哲史 (IWATA SATOSHI)

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：00396871

研究成果の概要： 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、細胞の生存シグナル等の様々な生物学的機能を担っており、これらの過程において、接着シグナルを細胞内シグナルに変換するレセプターとして働く。一方、関節リウマチ(RA)の炎症反応に 1 インテグリンを介する T 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。また、RA 患者における滑膜細胞、滑液細胞や血管内皮細胞では 1 インテグリン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事が報告されている。本研究は、それらの知見に基づき、我々が確立した Cas-L 分子について、以下の検討を行った。

1) Cas-L/NEDD9 結合蛋白 Nck のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義:我々は、Cas-L のチロシンリン酸化依存的に結合する分子として、SH2 ドメインと SH3 ドメインのみからなるアダプター蛋白質 Nck と、SH2 ドメインを持つチロシンフォスファターゼである SHP-2 を同定した。我々は、Nck が、Cas-L のチロシンリン酸化された substrate domain に SH2 ドメインを介して結合すること、T 細胞において、Cas-L が lipid raft に恒常的に一部存在し、TCR 及び 1 インテグリン刺激により Nck が raft 内でチロシンリン酸化された Cas-L にリクルートされること、Cas-L 欠損マウスの脾細胞を用いて Nck の raft への刺激依存性の移行の低下を見出した。また、RA 滑膜患者検体において、Nck 高発現細胞の炎症局所への浸潤が認められた。

2) Cas family 遺伝子ノックアウトマウスと関節リウマチモデルマウス・骨粗鬆症モデルマウスとの交配による、関節リウマチ・骨粗鬆症における Cas family 遺伝子の病態生理学的意義の検討: Cas-L 欠損マウスを用いてコラーゲン関節炎モデルマウスを作成し、関節リウマチの発症率・重症度を腫脹関節数とその程度によるスコアリングを行った。その結果、Cas-L 欠損マウスにおいては、関節炎の発症は野生型マウスよりもやや早いものの、その重症度は有意に減少していた。さらに強いコラーゲン関節炎をおこす DBA/1 background に遺伝的背景を変換して、Cas-L 遺伝子の影響を解析するため、Cas-L 欠損マウス (C57/B6) と、DBA/1 野生型マウスとの交配を行っている。また、骨粗鬆症モデルマウス(OPG 欠損マウス)と、同一バックグラウンドの野生型マウスを用いて、骨密度の評価を行い、OPG 欠損マウスでは有意に骨密度の減少が確認できた。現在、OPG 欠損マウスと、Cas-L 欠損マウスの交配を行っており、Cas-L 遺伝子の欠失による、骨密度の減少に対する影響を検討する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：リウマチ学・Cas・インテグリン・破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

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、細胞の生存シグナル等の様々な生物学的機能を担っており、これらの過程において、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。我々はこの点に着目し、T細胞において 1 インテグリン刺激により強くチロシンリン酸化される分子(pp105)の cDNA クローニングを行い、この分子が p130Cas (Crk associated substrate) の homologue である事を明らかにし、Cas L (Cas lymphocyte type) と命名した。平井らがクローニングした p130Cas は、がん遺伝子 v-Src, v-Crk により繊維芽細胞において強くチロシンリン酸化される 130kD の蛋白として同定された。Cas family は、p130Cas, Cas L, Efs/Sin の 3 つの遺伝子が知られており、分子量 90-130kD の大きな細胞内蛋白であり、インテグリンを初めとする細胞接着分子・細胞骨格系分子が集積する接着班(focal adhesion)に局在を示すとともに、Cas family 蛋白とインテグリン及びインテグリン由来シグナル伝達蛋白群との関連性が相次いで報告されている。我々は、FAK (focal adhesion kinase) と Src family チロシンキナーゼ (Src, Fyn, Lck) による 2 段階の Cas L リン酸化モデルを提示した。さらに、Cas L が TCR (T cell receptor)/ 1 インテグリン共刺激下での T 細胞による IL-2 産生及び細胞遊走能の亢進に必須の分子であることを報告した。

一方、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の炎症反応に 1 インテグリンを介する T 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。また、RA 患者における滑膜細胞、滑液細胞や血管内皮細胞では 1 インテ

グリン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事が報告されている。我々は Cas L が 1 インテグリン分子を介する細胞遊走能に必須の分子である点に着目し、RA モデルマウスである HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスの脾細胞・リンパ節リンパ球における Cas L の発現上昇とリン酸化状態の亢進を明らかにするとともに、骨のリモデリング及び RA の骨破壊に重要な役割を持つ破骨細胞様の細胞においても Cas の染色性が亢進しているという知見を得た。

2. 研究の目的

本研究は、上述の知見に基づき、以下の諸点を明らかにすることを目的とした。

- 1) Cas L 結合蛋白 Nck のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義
- 2) Cas L 結合蛋白 SHP-2 のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義
- 3) Cas family 遺伝子ノックアウトマウスと関節リウマチモデルマウス・骨粗鬆症モデルマウスとの交配による、関節リウマチ・骨粗鬆症における Cas family 遺伝子の病態生理学的意義の検討

3. 研究の方法

- 1) Cas L 結合蛋白 Nck のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義

我々は、Cas L のチロシンリン酸化依存的に結合する分子として、SH2 ドメインと SH3 ドメインのみからなるアダプター蛋白質 Nck と、SH2 ドメインを持つチロシンフォスファターゼである SHP-2 を同定した。Cas L と Nck との結合部位、結合様式を解析する目的で、まず、293T 細胞を用いた過剰発現系を採用した。Cas L のチロシンリン酸化を起こさせる、キ

ナーゼとして、Fyn, Lck, FAK の野生型及び恒常的活性化型遺伝子の cDNA を組み込んだ発現プラスミドを co-transfection した (FuGENE6 を使用)。遺伝子導入後、1% Triton lysis buffer で可溶化し、Cas-L, Nck それぞれの tag に対する抗体で免疫沈降し、イムノブロットングにより解析した。その後、H9 T 細胞株を用いた内在性の Cas-L/Nck の結合について、インテグリンリガンドであるファイブロネクチン(FN)刺激、或いは抗 CD3 抗体刺激下で同様の検討を行った。さらに、Cas-L と Nck の局在については、293T 及び H9 を用いて免疫染色を行い、コンフォーカル顕微鏡により解析した。Cas-L の lipid raft への局在については、ショ糖密度勾配による超遠心法により分画し、イムノブロットング及び免疫沈降法で解析した。さらに、Cas-L の生物学的機能の解析のため、Cas-L shRNA を用いて Cas-L 発現を減少させた H9 細胞を用いて Transwell による細胞遊走能の評価、CD3/CD28, CD3/FN 共刺激による IL-2 産生誘導を ELISA により定量した。さらに、Cas-L ノックアウトマウスの脾臓 T 細胞を用いて、ケモカイン SDF-1 刺激による Nck の raft 移行を比較検討した。

2) Cas-L 結合蛋白 SHP-2 のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義

SHP-2 はチロシンフォスファターゼである。Cas-L と SHP-2 との結合については、Nck の場合と同様の実験手法を用いて検討した。また、SHP-2 の基質捕捉性・活性部位変異体 (CS) は、Cas-L との結合が増強していることから、Cas-L がその基質である可能性が考えられた。そこで、チロシンリン酸化させた Cas-L 蛋白を免疫沈降し、SHP-2 の各ドメインと GST との融合タンパクを大腸菌で作成して精製し、in vitro phosphatase assay を行い検証した。

3) Cas family 遺伝子ノックアウトマウスと関節リウマチモデルマウス・骨粗鬆症モデルマウスとの交配による、関節リウマチ・骨粗鬆症における Cas family 遺伝子の病態生理学的意義の検討

i) 破骨細胞の分化と機能を制御する RANKL のデコイ受容体である OPG (osteoprotegerin) の遺伝子欠損マウスは、破骨細胞の形成が促進し骨吸収が亢進することにより、骨粗鬆症の症状を呈することが知られている。破骨細胞の骨吸収機能発現においては、podosome による刷子縁形成が重要で骨基質に緊密に接着することが必要となる。我々は、この破骨細胞における細胞接着能・podosome 形成に対する Cas 蛋白質の役割を解析する目的で、骨粗鬆症モデルマウス(OPG 遺伝子欠損マウス) と Cas-L 欠損マウスならびに p130Cas 欠損マウスとの交配を行い、その表現型(骨量・骨

密度・骨吸収マーカー/NTX, DPD)を検討するための予備的検討を行った。

ii) 現在各種の関節リウマチモデルマウスが知られているが、MHC ハプロタイプにより発症率が異なっており、より適切なバックグラウンドを選択する必要がある。現状で当利用可能なモデルマウスは、Collagen-induced arthritis (CIA) マウス (DBA/1 及び C57BL/6)、Tax transgenic マウス (BALB/c)、Proteoglycan-induced arthritis マウス (BALB/c) である。現在飼育中の Cas-L 欠損マウス及び p130Cas 欠損マウスは C57BL/6 background であり、CIA モデルマウス (C57BL/6 background) の系を用いてまず関節リウマチに対する Cas-L 及び p130Cas の in vivo での作用を検討する。また、DBA/1 background マウス及び BALB/c background マウスと Cas-L 欠損マウス及び p130Cas 欠損マウスとの交配を行った。

4. 研究成果

1) Cas-L/NEDD9 結合蛋白 Nck のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義

我々は、293FT を用いた過剰発現系、及び H9 を用いた内因性蛋白レベルでの検討により、Nck と Cas-L が、Cas-L のチロシンリン酸化依存性に結合すること、また Nck と Cas-L の結合部位として、それぞれ、SH2 ドメインと substrate domain を特定した (図 1)。

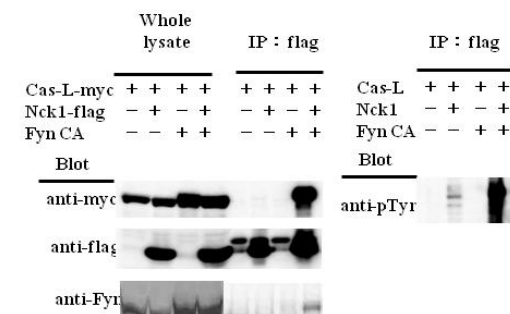


図 1 : 293FT 細胞における、Cas-L と Nck の共沈

興味深いことに、Cas-L は、主として細胞質に多く存在するが、シグナル伝達、接着、物質の細胞内輸送等の細胞機能に重要な役割を果たしている細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン即ち、lipid raft にも存在することを明らかにした。さらに、Cas-L ノックアウトマウスの脾臓由来 T 細胞において、Nck の raft への刺激依存性の移行の低下を見出した (図 2)

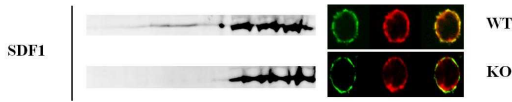


図2 : Cas 1 ノックアウトマウスにおけるケモカイン依存性 Nck の raft 移行の低下

また、Nck と Cas 1 は、293FT 細胞及び H9 細胞において、Src ファミリーチロシナーゼ依存性に、或いはインテグリンリガンド刺激 (FN) により、主として細胞質において共局在することを見出した。我々は、これらリンパ球の細胞遊走に関わる分子の RA における役割を検討するため、RA 患者滑膜検体を用いて、免疫染色を行った。その結果、Nck 高発現細胞の炎症局所への浸潤が認められた (図3)

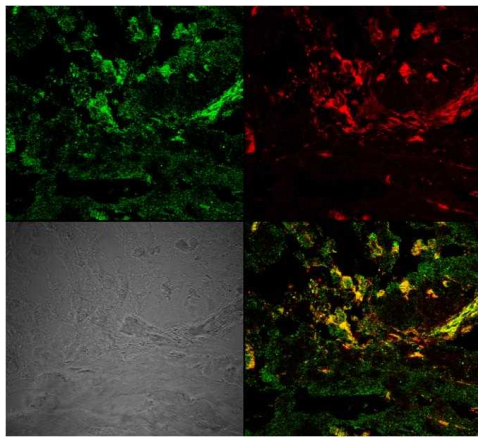


図3 : リウマチ滑膜における、Cas 1 と Nck の共局在 (FITC: Cas 1, TR: Nck, 右下: merge)

2) Cas 1/NEDD9 結合蛋白 SHP-2 のインテグリン由来シグナル及び生物学的意義

また、SHP-2 及びその DN (ドミナントネガティブ型) 及び CA (恒常的活性化型) 変異体を導入した A549 細胞株を作成し、SHP-2 導入により、そのフォスファターゼ活性依存的にインテグリン依存性細胞遊走能の低下を認めた (図4)

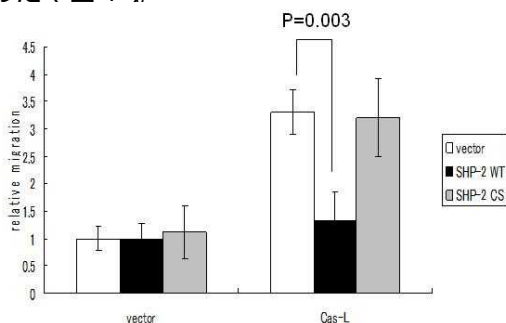


図4 : A549 細胞における Cas 1 依存性細胞遊走増強効果の SHP-2 による抑制

また我々は、293T 細胞に共発現させた Cas 1 と SHP-2 が細胞辺縁部の leading edge に共局在することを見出している (図5)

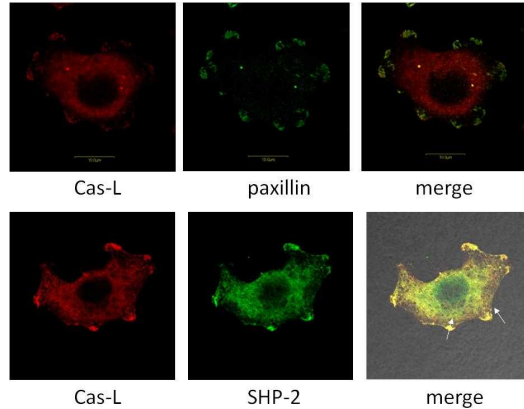


図5 : 293FT 細胞における、Cas 1 と SHP-2 の共局在

さらに、SHP-2 RNAi の導入により ERK の活性化低下が確認された。サイトカイン産生能・細胞遊走能が亢進している Cas 1 導入 T 細胞株において、MAPK 経路のうち、ERK, p38 の活性化は不変だが、JNK の恒常的活性化が起きている事を見出した。

3) Cas family 遺伝子ノックアウトマウスと関節リウマチモデルマウス・骨粗鬆症モデルマウスとの交配による、関節リウマチ・骨粗鬆症における Cas family 遺伝子の病態生理学的意義の検討

Cas 1 欠損マウスを用いてコラーゲン関節炎モデルマウスを作成し、関節リウマチの発症率・重症度を腫脹関節数とその程度によるスコアリングを行った。その結果、Cas 1 欠損マウスにおいては、関節炎の発症は野生型マウスよりもやや早いものの、その重症度は有意に減少していた。さらに強いコラーゲン関節炎をおこす DBA/1 background に遺伝的背景を変換して、Cas 1 遺伝子の影響を解析するため、Cas 1 欠損マウス (C57/B6) と、DBA/1 野生型マウスとの交配を行っている。また、骨粗鬆症モデルマウス (OPG 欠損マウス) と、野生型マウスを用いて、骨密度の評価を行い、OPG 欠損マウスでは有意に骨密度の減少が確認できた。現在、OPG 欠損マウスと、Cas 1 欠損マウスの交配を行っており、Cas 1 遺伝子の欠失による、骨密度の減少に対する影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

- 1) Okamoto T, Iwata S, Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Histamine H1-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. *Clin Exp Immunol. in press*
- 2) Iwata S, Morimoto C. BCAR1. Targeted Protein Database 1. 2009. *in press*
- 3) Iwata S, Nori M, Hashizume Y, You K, Morimoto C. Effect of H-1-receptor antagonists on proliferative response, cytokine production, and cellular migration of human T cells and macrophages. *Clin Exp Allergy Reviews*. 2009. 8:21-29.
- 4) Yo K, Iwata S, Hashizume Y, Kondo S, Nomura S, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. SHP-2 inhibits tyrosine phosphorylation of Cas-L and regulates cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 382:210-4.
- 5) Nishida H, Yamazaki H, Yamada T, Iwata S, Dang NH, Inukai T, Sugita K, Ikeda Y, Morimoto C. CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 382:57-62.
- 6) Yamazaki H, Nishida H, Iwata S, Dang NH, Morimoto C. CD90 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 382:172-7.
- 7) Inamoto S, Iwata S, Inamoto T, Nomura S, Sasaki T, Urasaki Y, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7. *Oncogene*. 2007 26:893-904.

[学会発表](計 7件)

- 1) Yo K, Iwata S, Hashizume Y, Kondo S, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. SHP-2 dephosphorylates Cas-L and negatively regulates beta-1 integrin mediated cell migration of lung adenocarcinoma cells. 日本免疫学会 2008年12月2日 国立京都国際会館
- 2) Otsuki N, Yamochi T, Hashizume Y, Iwata S, Morimoto C. Immunomodulatory effects of

RXM and its analog. 日本免疫学会総会 2008年12月 国立京都国際会館

- 3) Iwata S, Hashizume Y, Yo K, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Tyrosine phosphorylated Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L)/neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9) associates with adaptor protein Nck in lipid raft. アジア太平洋リウマチ学会議 (APLAR) 2008年9月24日 パシフィコ横浜
- 4) 西田浩子, 山崎裕人, 岩田哲史, 池田康夫, 森本幾夫 B細胞急性リンパ性白血病におけるCD9関連癌幹細胞特性 日本血液学会 2008年10月11日 国立京都国際会館
- 5) Hashizume Y, Iwata S, Yo K, Ohnuma K, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Cas-L associates with adaptor protein Nck. Role of Cas-L/Nck interaction in beta1 integrin- and TCR mediated cell signaling and migration. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2007. 2007年11月10日 Boston, U.S.A.
- 6) 橋爪裕, 岩田哲史, 姚皇治, 大沼圭, 細野治, 河崎寛, 田中廣壽, 森本幾夫 1インテグリン下流分子Cas-L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 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会/第16回国際リウマチシンポジウム 2007年4月27日 パシフィコ横浜
- 7) 姚皇治, 岩田哲史, 橋爪裕, 森本幾夫 1インテグリンシグナルにおける非受容体型チロシンフォスファターゼ・SHP-2の役割 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会/第16回国際リウマチシンポジウム 2007年4月 パシフィコ横浜

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cimmuno/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 哲史(IWATA SATOSHI)

東京大学・医科学研究所・特任講師
00396871

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし