

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591278

研究課題名（和文）Cas-Lノックアウトマウスを用いたリウマチ及び  
感染症モデルの病態・遺伝子解析研究課題名（英文）Analysis of collagen-induced arthritis and bacterial colitis  
using Cas-L null mice

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

研究者番号：00396871

研究成果の概要（和文）：Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L)は、 $\beta 1$  インテグリン依存性の細胞遊走能に必須のドッキング蛋白質である。我々は、本研究において関節リウマチモデル及び病原性大腸菌感染症モデルの病態解析を行い、Cas-Lノックアウトマウスでは、野生型マウスに比較して関節リウマチの重症度は低下する一方、感染症の重症度は悪化することを見出した。関節炎モデルにおいてはリンパ球機能の低下が、感染症モデルにおいては、好中球を初めとする自然免疫系の機能低下との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) is an integrin signaling adaptor protein composed of multiple domains serving as a substrate for a variety of tyrosine kinases. Cas-L functions in diverse biological processes such as cell attachment, migration and invasion, apoptosis, and cell cycle progression. To elucidate the function of Cas-L in autoimmune diseases and host defence, we employed Cas-L knockout mice. It was shown that these mice relatively resistant to collagen-induced arthritis, on the other hands, they were susceptible to *Citrobacter rodentium* infection of colon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

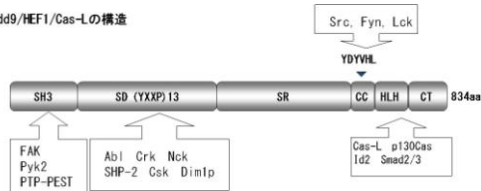
科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：インテグリン・シトロバクター・病原性大腸菌・コラーゲン関節炎

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta 1$  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  $\beta 1$  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) (Sakai R, Yazaki Y, Hirai H, et al. EMBO J 13:3748, 1994) の homologue である事を明らかにし、Cas-L (Cas lymphocyte type) と命名した (Minegishi M, Tachibana K, Sato T, Iwata S, et al. J Exp Med 184:1365, 1996) (図 1)。

図 1 Nedd9/HEF1/Cas-L の構造



Cas family には、p130Cas/BCAR1, Cas-L/HEF-1/NEDD9, 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、インテグリン及びインテグリン由来シグナル伝達蛋白質群との関連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 (Tachibana K, Urano T, Fujita H, Ohashi Y, Kamiguchi K, Iwata S, et al. J Biol Chem 272:29083, 1997)。さらに、Cas-L が TCR/ $\beta 1$  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 (Ohashi Y, Iwata S, et al. J Immunol 163:3727, 1999 / Kamiguchi K, Tachibana K, Iwata S, et al. J Immunol 163:563, 1999)。

Cas-L 分子の構造から、上流のチロシンキナーゼ等によりリン酸化を受けることにより、刺激依存性に種々のエフェクター蛋白質 (アダプター蛋白、GDP-GTP exchange factor、フォスファターゼ等々) が会合し、下流へのシグナルの分岐点となるドッキング蛋白であることが予想された。この点に着目し、Cas-L 結合蛋白質を Yeast Two-hybrid 法等で探査し、HTLV-I 感染細胞において NF- $\kappa$ B 経路の活性化に関与する HTLV-I Tax, TGF- $\beta$  シグナル阻害因子 Smad6, Smad7 を同定した (Inamoto S, Iwata S, et al. Oncogene 26:893, 2007 / Iwata S, Souta-Kuribara A, et al.

Oncogene 24:1262, 2005)。また、主として細胞遊走に関与するアダプター蛋白質 Nck、MAPK 系等を介して細胞の活性化に関与し近年がん遺伝子としての位置づけが定まりつつあるチロシンフォスファターゼ SHP-2 を同定した (発表論文#2)。

Cas-L は、NEDD9 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9) (NM\_006403.2) の名称で NCBI に登録されている。これは、神経組織において胎生期に一過性に発現する遺伝子群のひとつとして報告された NEDD9 と Cas-L が同一遺伝子であったことに由来する (Kumar S, Noda M, et al. Biochem Biophys Res Commun 185:1155, 1992 / Sasaki, T, Iwata S, et al. Stroke 36:2457, 2005)。

一方、関節リウマチ (RA) の炎症反応に  $\beta 1$  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  $\beta 1$  インテグリンのリガンドである fibronectin 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  $\beta 1$  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-I 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 の発現上昇とチロシンリン酸化状態の亢進を明らかにするとともに (Iwata S, Miyake-Nishijima R, et al. Arthritis Rheum 48:1890, 2003)、骨のリモデリングや RA の骨破壊に重要な役割を持つ破骨細胞においても p130Cas の発現が亢進しているという知見を得た。Cas-L の in vivo での炎症性疾患における役割についてさらに明らかにするため、東京大学・血液腫瘍内科瀬尾博士より Cas-L ノックアウトマウスの供与を受け、繁殖・維持を行っている。そして、このマウスの遺伝的背景である C57BL/6 マウスを用いる collagen-induced arthritis とその評価法について確立した。さらに我々は、ヒト病原性大腸菌感染症のモデルとされる、Citrobacter rodentium の経口感染実験を Cas-L ノックアウトマウスを用いて行い、このマウスでは野生型マウスと比較して、炎症反応の遷延・重症化が起こるといふ知見を得た。

## 2. 研究の目的

本研究は、前述した学術的背景に基づき、以下の諸点を明らかにすることを目的とした。

- 1) Cas-L ノックアウトマウスを用いた collagen-induced arthritis モデルの病態解析
- 2) Cas-L ノックアウトマウスを用いた

## Citrobacter 感染モデルのサイトカイン解析・遺伝子発現解析及び病態生理学的検討

### 3. 研究の方法

1) 我々が維持している Cas-L ノックアウトマウスの系統は C57BL/6 である。この系統のマウスは collagen-induced arthritis に対して中等度の感受性があることから、同実験系を用いて関節リウマチに対する Cas-L の in vivo での作用を検討した。

Cas-L ノックアウトマウス、野生型マウス、ヘテロマウスに、type II collagen を Freund's complete adjuvant とともに後背部皮下に免疫し (初日及び 21 日後)、誘発される関節炎の重症度のスコアリング、及びその発症率の検討・単純 X 線写真による評価・病理組織学的検討・血清中の type II collagen に対する抗体価・collagen 初回免疫後 21 日目の血清を採取し、23 種類のサイトカインについて Luminex を用いて測定した。

また、これらのマウスに collagen を免疫後、頸部・腋窩・鼠径リンパ節細胞を単離し、in vitro で collagen 再刺激実験を行い、methyl-<sup>3</sup>H-thymidine による細胞増殖反応の解析を行なった。

さらに、Cas-L ノックアウトマウス骨髄と野生型マウス、野生型マウス骨髄と Cas-L ノックアウトマウスの組み合わせで、骨髄キメラを作成し、Cas-L 遺伝子の欠損により collagen-induced arthritis に対する感受性が低下する原因が、免疫系・血球系に由来するのか、(例えば関節滑膜のような) それ以外の部位の異常に由来するのかを検討した。

また、Cas-L ノックアウトマウス及び野生型マウス脾細胞から CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体 + fibronectin 共刺激に対する methyl-<sup>3</sup>H-thymidine による細胞増殖反応の解析を行なった。

2) Cas-L ノックアウトマウスは、SPF 環境下においては野生型マウスと同様に発育するが、これまで conventional な環境下での発育、並びに病原菌に対する抵抗性については知られていなかった。Collagen-induced arthritis の場合と同様に、C57BL/6 系統のマウスは、Citrobacter rodentium 感染に対する中等度の感受性を示すことが知られている。そこで我々は、Citrobacter を Cas-L ノックアウトマウス、野生型マウスに経口的に接種し、体重減少、大腸における定着菌数、腸管粘膜の病理組織学的検討を行った。

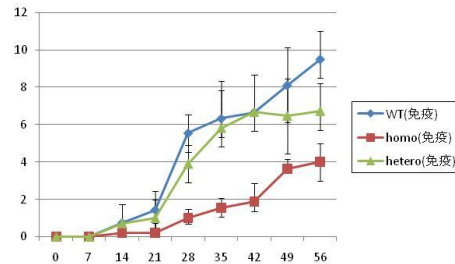
そして、Cas-L ノックアウトマウスと野生型マウスで、Citrobacter 感染前、感染後 1W、感染後 2W の各時点で、大腸を採取し RNA を抽出後、mRNA アレイ解析を行った。

また、同様の時間経過で、血清を採取し 23 種類のサイトカインについて、Luminex を用いて定量した。

### 4. 研究成果

1) Cas-L ノックアウトマウス、野生型マウス、ヘテロマウスで比較検討したところ、関節炎の発症率は三群で差を認めなかったが、Cas-L ノックアウトマウス群では、関節炎の発症が遅れる傾向が認められた。関節炎の重症度については、Cas-L ノックアウトマウス群が、他の 2 群に比較して、有意に低い重症度を示した (図 2)。

図2 Cas-L ノックアウトマウスにおけるCIA感受性低下



さらに、関節滑膜の病理学的所見では、炎症細胞浸潤の程度が低下し、滑膜の増生・肥厚、骨破壊像を認めず、エックス線写真でも同様に、関節破壊を認めなかった。同マウスでは、野生型に比較して血清中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A) の低下・抑制性サイトカイン (IL-10) の上昇が認められた (図 3, 4)。

図3 Cas-L ノックアウトマウスにおける炎症性サイトカインの減少

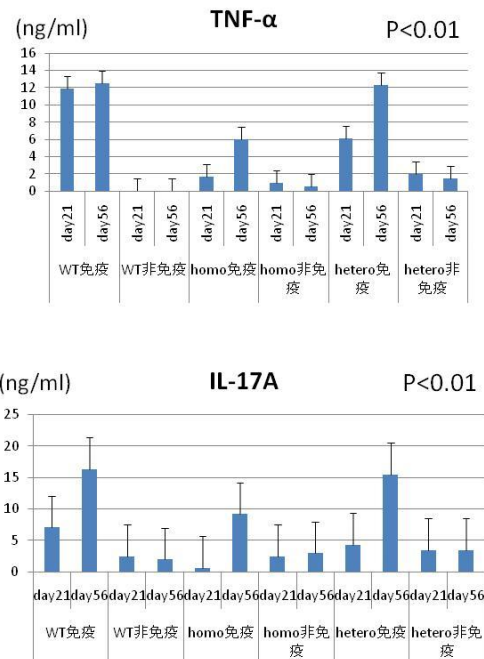
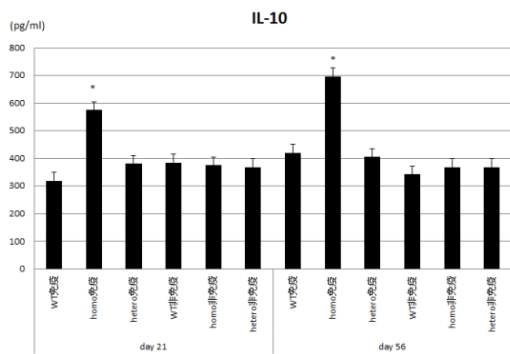


図4 Cas-LノックアウトマウスにおけるIL-10の上昇



これらのサイトカインバランスの異常は、同マウスでの炎症の遅延と関節炎の軽症化の一因とも考えられる。このことから Cas-L は関節リウマチ発症において重要な病態生理学的意義をもつ分子であることが明らかになるとともに、Cas-L が細胞接着・遊走のみならず、サイトカイン産生の制御にも関与していることが示唆された。

Cas-L KO マウスと WT マウスの血清中抗 II 型コラーゲン抗体価を比較した結果、Cas-L KO マウスではコラーゲン抗体価が有意に低値であり、II 型コラーゲン再刺激後の脾細胞の増殖反応も低下していた。また、Cas-L KO マウスでは、二次リンパ器官における T・B 細胞数・比率の異常を認め、T・B 細胞の機能異常の存在が示唆された。

さらに、Cas-L KO マウスと WT マウス間での骨髓細胞移植実験では、Cas-L KO マウス骨髓を致死量の放射線を照射した WT マウスへ移植した群 [KO→WT] と、WT マウス骨髓を致死量の放射線を照射した Cas-L KO マウスへ移植した群 [WT→KO] に collagen-induced arthritis を誘導したところ、[KO→WT] では、[WT→KO] に比較して関節炎重症度の低下を認めた。この結果から、Cas-L ノックアウトマウスの関節炎重症度の低下の一因として、骨髓細胞レベルの異常が示唆された。

Cas-L KO マウスと WT マウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞に対し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体、或いは、抗 CD3 抗体と fibronectin で共刺激を行い、その細胞増殖反応を評価した。その結果、抗 CD3 抗体/fibronectin による共刺激系では、Cas-L KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では、WT マウス由来細胞の場合に比較して、細胞増殖反応が低値であった。このことから、Cas-L は  $\beta 1$  インテグリンリガンドである fibronectin と CD3 との共刺激系のシグナル伝達系において、重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体での共刺激では Cas-L KO マウスにおいて、WT マウスと比較して細胞増殖反応が高値であった。Cas-L は、 $\beta 1$  インテグリン下流のシグナル伝達に深く関わっている

蛋白質であり、以上の結果から、Cas-L ノックアウトマウスでは、リンパ球におけるインテグリン刺激の減弱していることが示唆され、そのことが、同マウスの collagen-induced arthritis に対する感受性低下に寄与していることが考えられた。CD3/CD28 共刺激では  $\beta 1$  インテグリン刺激の場合と逆の結果が得られたことは予想外であった。今後そのメカニズムに関してはさらなる検討が必要と思われる。

2) *Citrobacter rodentium* 感染モデルにおいて、C57BL/6 系統のマウスは、致死性的なことはないが、感染後一週間くらいをピークとして感染性の大腸炎をおこし、その後 10 日から二週間語くらいには次第に回復していく。Cas-L ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、この菌を効率的に排除できず、重症の大腸炎を発症することが明らかとなった。

即ち、感染後 10 日の時点でも野生型と比較して体重減少を認め、*Citrobacter* の大腸における定着菌数も野生型の場合に比較して、10 倍程度高値を示した。血清中のサイトカインの定量では、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40 レベルが、Cas-L ノックアウトマウスにおいて、野生型に比較して高値を示した。マイクロアレイ解析においても、これら炎症性サイトカイン及びその産生にかかわるような pathway に所属する分子群の mRNA 発現レベルの増加が認められた。病理組織学的検討によると、野生型マウスと比較して、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、好中球の浸潤と腸管粘膜の破壊像が顕著に認められた。中でも好中球については、野生型マウスでは一部肝臓に膿瘍形成を認めたのに対し、Cas-L ノックアウトマウスにおいては好中球の浸潤は認めるものの、膿瘍形成を示した個体は認められず、同マウスでは好中球の機能異常が存在する可能性が示唆された。最近、好中球にも Cas-L が発現しており、fMLP、TNF- $\alpha$ 、lipopolysaccharide 刺激により好中球内の Cas-L がチロシンリン酸化されるという報告がなされている (Nakamoto T, Seo S, Sakai R, et al. *J Cell Biochem* 105:121, 2008)。今後、in vitro での好中球機能における Cas-L の役割についてさらなる検討が必要である。

#### 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 10 件)

1. Yamazaki, H., Naito, M., Ghani, F. I., Dang, N. H., Iwata, S., and Morimoto, C. 2012. Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive

human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 419:529-536.

2. Yamazaki, H., Xu, C. W., Naito, M., Nishida, H., Okamoto, T., Ghani, F. I., Iwata, S., Inukai, T., Sugita, K., and Morimoto, C. 2011. Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 409:14-21.

3. Ghani, F. I., Yamazaki, H., Iwata, S., Okamoto, T., Aoe, K., Okabe, K., Mimura, Y., Fujimoto, N., Kishimoto, T., Yamada, T., et al. 2011. Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 404:735-742.

4. Otsuki, N., Dang, N. H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., and Morimoto, C. 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of ethnopharmacology* 127:760-767.

5. Arimoto-Miyamoto, K., Kadowaki, N., Kitawaki, T., Iwata, S., Morimoto, C., and Uchiyama, T. 2010. Optimal stimulation for CD70 induction on human monocyte-derived dendritic cells and the importance of CD70 in naive CD4(+) T-cell differentiation. *Immunology* 130:137-149.

6. Yo, K., Iwata, S., Hashizume, Y., Kondo, S., Nomura, S., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Dang, N. H., and Morimoto, C. 2009. SHP-2 inhibits tyrosine phosphorylation of Cas-L and regulates cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*.

7. Yamazaki, H., Nishida, H., Iwata, S., Dang, N. H., and Morimoto, C. 2009. CD9 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*.

8. Nishida, H., Yamazaki, H., Yamada, T., Iwata, S., Dang, N. H., Inukai, T., Sugita, K., Ikeda, Y., and Morimoto, C. 2009. CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*.

9. Hashimoto-Okada, M., Kitawaki, T., Kadowaki, N., Iwata, S., Morimoto, C., Hori, T., and Uchiyama, T. 2009. The CD70-CD27 interaction during the stimulation with dendritic cells promotes naive CD4(+) T cells to develop into T cells producing a broad array of immunostimulatory cytokines in humans.

*Int Immunol* 21:891-904.

10. Okamoto, T., Iwata, S., Ohnuma, K., Dang, N. H., and Morimoto, C. 2009. 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* 157:27-34.

[学会発表] (計3件)

1. 吉川理子, 岩田哲史, 片寄智規, 永井武, 三室仁美, 後藤明輝, 河崎寛, 細野治, 田中廣壽, 森本幾夫 Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウスを用いた *Citrobacter rodentium* 感染に対する Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) の防御機構について 第40回日本免疫学会 平成22年11月29日 千葉幕張メッセ

2. Otsuki, N., Iwata, S., Kumagai, S., Yamada, T., Katayose, T., Kichikawa, Y., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Dang, N. H., and Morimoto, C. A New Derivative of Roxithromycin Modulates Immunological Responses and Ameliorates Collagen-Induced Arthritis. 2011 Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology November 7, 2011. Chicago, Illinois

3. 片寄智規, 岩田哲史, 村上聡, 吉川理子, 細野治, 河崎寛, 金井芳之, 田中廣壽, 森本幾夫 Cas-L/Nedd9 ノックアウトマウスを用いた関節炎の解析 第54回日本リウマチ学会総会・学術総会 平成22年4月23日 神戸

[図書] (計1件)

岩田哲史, 森本幾夫 *Medical Bio 特集 がん細胞の生物学* オーム社 2011年 p35-39.

[その他]

ホームページ等

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

<http://www.h.ims.u-tokyo.ac.jp/gairai/depts-03.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

研究者番号：00396871

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：