

Rassf5-Mst1 シグナルのリンフォーマ、肺癌、肝癌発症を抑制する 分子機構の解明

北里大学 理学部 生体防御学講座
片桐 晃子

はじめに

がん抑制遺伝子（細胞のがん化を押さえる遺伝子）であるRASSFファミリーに属するRAPLが、細胞表面のたんぱく質であるインテグリンを介して、リンパ球と血管内皮や抗原提示細胞との接着を調節していることを明らかにしてきました。一方、近年、RASSFファミリー遺伝子群は、アポトーシス誘導能および増殖抑制機能を持つことから、がん抑制遺伝子として重要であることが示唆されています。しかしRAPLの接着を制御する働きがRASSFファミリー遺伝子群によるがん抑制の働きとどのようにつながっているのかは不明でした。また、生体免疫系の過剰応答に起因する自己免疫疾患やアレルギー疾患で、RAPLがどのような働きをしているのかも分かっていませんでした。

今回、RAPLを持っていないマウス（RAPL欠損マウス）を作製し、そのマウスでは加齢とともに正常な自己細胞を異物と見なす自己抗体ができて、ループス腎炎などの自己免疫疾患やリンパ腫・肺癌・肝癌を発症することを発見しました。さらにその発症メカニズムとして、RAPLが細胞の増殖を抑えているために、RAPLが欠損すると細胞の過剰な増殖を招いていることを明らかにしました。

結果

本研究では、RAPLが免疫システムにおける自己寛容の成立・維持と過剰応答を制御しているのではないかと考え、RAPL欠損マウスを作製し解析しました。あるたんぱく質が機能しないようにさせた場合に、細胞内や体内でどのようなことが起きるのかを解析することで、そのたんぱく質がどういった働きを担っているのかを明らかにする手法は、現代の生物学では非常に良く用いられています。その結果、RAPL欠損マウスでは加齢とともに自己抗体ができて、ループス腎炎などの自己免疫疾患様症状やBリンパ腫だけではなく、肺癌、肝癌を発症することが分りました（図1、図2）。そのメカニズムとして、RAPLが細胞周期の進行に関与するp27^{kip1}（CDKインヒビター^{注5}）というたんぱく質の核と細胞質間の移行を制御しており、p27^{kip1}は核に移行できないと機能しなくなって細胞増殖を抑制できなくなることがわかりました。また、RAPLは抗原刺激に対する免疫反応であるT細胞とB細胞の増殖を抑制していることも分りました。そのためRAPLが欠損すると、リンパ球は過剰な増殖応答を示すようになり、同時にp27^{kip1}は細胞質に異常に蓄積するようになります（図3、図4）。p27^{kip1}の核から細胞質への移行には特定の amino acid として10番目セリン（S10）のリン酸化が必要ですが、RAPLが正常に存在する場合はそのリン酸化が抑制され、p27^{kip1}が細胞質へ移行してしまわないようにしていることも確かめられました（図5、図6）。また、RAPL欠損マウスのp27^{kip1}が正常に核内に移動できるように、p27^{kip1}の一部を変化させてS10のリン酸化が起きないようにしたところ、RAPL欠損による自己免疫疾患発症やリンパ腫が認められなくなりました。これらのことから、接着制御分子RAPLがp27^{kip1}の核内移行を促進し、リンパ球の増殖を抑制するシグナルとして、リンパ球増殖性疾患の発症抑制に重要な機能を果たしていることが明らかになりました（図7）。

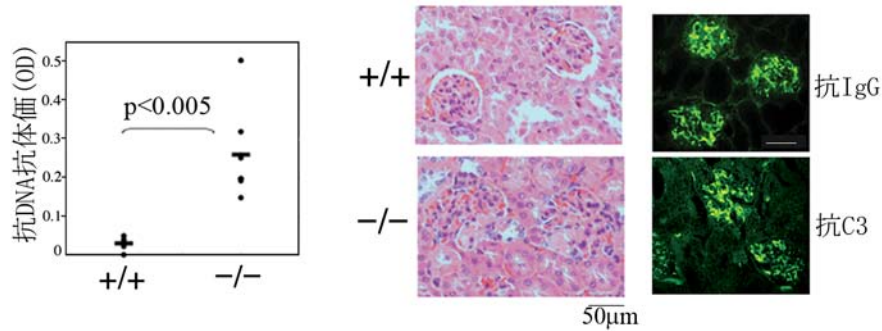


図1 RAPL欠損マウスは加齢するとループス腎炎を発症する
 左側： 10ヵ月令RAPL欠損マウス(-/-)は正常マウス(+/-)に比べ、SLEなどの自己免疫疾患で陽性になる抗dsDNA抗体価が上昇しています。
 右側： 腎臓切片のHE染色像、抗IgG、C3抗体による蛍光染色像。RAPL欠損マウス(-/-)の糸球体は肥大し、免疫複合体が沈着しています。

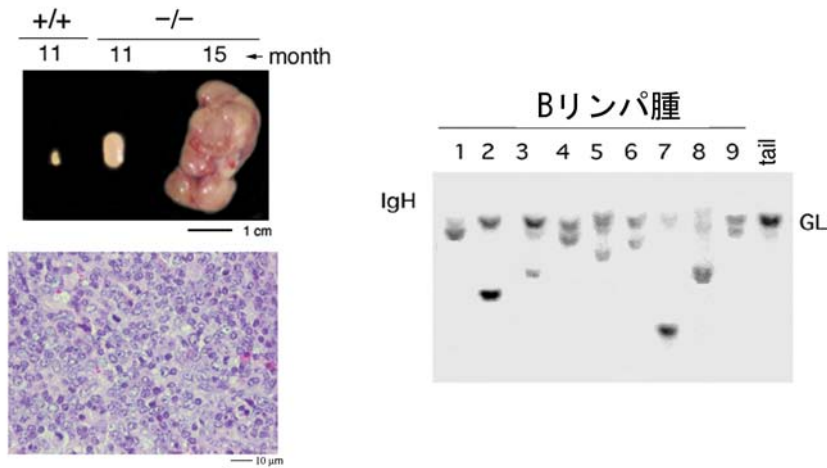


図2 RAPL欠損マウスはBリンパ腫を発症する
 左側： 11ヵ月と15ヵ月令のRAPL欠損(-/-)マウスの腫脹したリンパ節(上)と組織像。リンパ節は巨大化し、組織像からBリンパ腫であることが分かります。
 右側： RAPL欠損マウス由来Bリンパ腫の免疫グロブリンの再編成をサザンブロットで検討したところ、全て1種類のB細胞由来であることが確認されました。

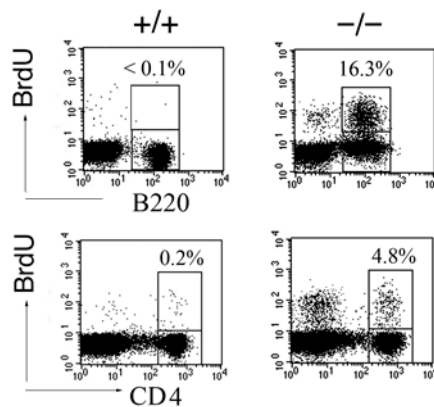


図3 RAPL欠損リンパ球は、生体内で増殖している
 上： B220陽性B細胞のBrdU(プロモデオキシウリジン)取り込みを示しています。BrdUはチミジンのアナログで、細胞周期のS期特異的にDNAに取り込まれます。RAPL欠損B細胞(-/-)は、正常B細胞(+/-)に比べ、BrdU取り込みが亢進しています。

下： CD4陽性T細胞のBrdU取り込みを示しています。RAPL欠損T細胞（-/-）は、正常T細胞（+/+）に比べてBrdU取り込みが充進しています。

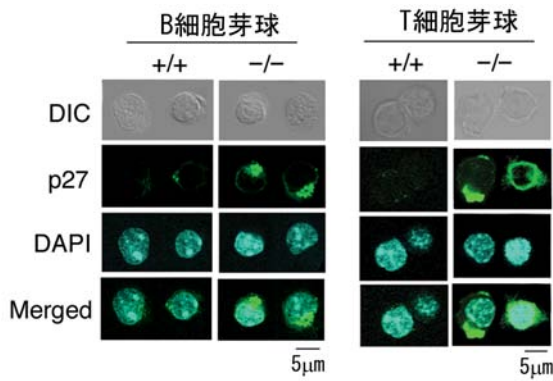


図4 抗原刺激したRAPL欠損リンパ芽球では、p27^{kip1}が細胞質に蓄積している

左側： 正常B細胞芽球（+/+）ではp27^{kip1}は分解されてなくなっていますが、RAPL欠損B細胞芽球（-/-）ではp27^{kip1}が細胞質に蓄積しています。
 右側： 正常T細胞芽球（+/+）ではp27^{kip1}は分解されてなくなっていますが、RAPL欠損T細胞芽球（-/-）ではp27^{kip1}が細胞質に蓄積しています。

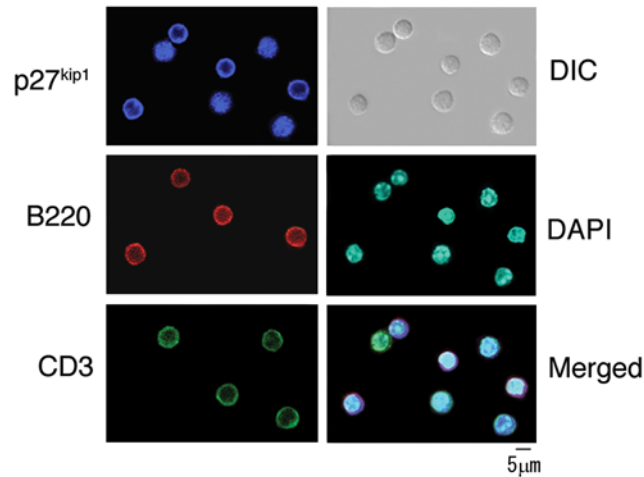


図5 p27^{kip1}の細胞内局在は、B細胞とT細胞で異なる

赤い蛍光色素で示したB細胞ではp27^{kip1}が細胞質に存在しますが、緑の蛍光色素で示したT細胞はp27^{kip1}が核内に存在します。

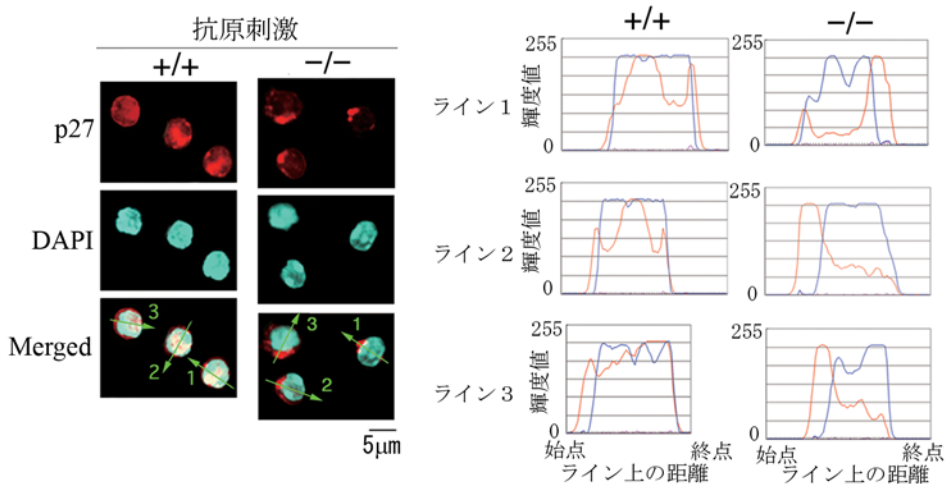


図6 RAPL欠損B細胞では、p27^{kip1}の核内移行が起こらない

左側：赤い蛍光色素は p 2 7^{kip1}、青い蛍光色素は D A P I 染色（核）を示しています。抗原受容体刺激 2 時間後、正常 B 細胞（+ / +）では、核内に p 2 7^{kip1} が存在しますが、R A P L 欠損 B 細胞（- / -）では、細胞質に留まったままです。

右側：赤（p 2 7^{kip1}）と青（核）の蛍光強度を左側の 1 番下のラインに沿って定量した結果を示しています。正常 B 細胞（+ / +）では、青いラインと赤いラインが重なっていて、核内に p 2 7^{kip1} が存在していますが、R A P L 欠損 B 細胞（- / -）では、青いラインと赤いラインが重なっておらず、p 2 7^{kip1} が細胞質に存在することが分かります。



図 7 R A P L の機能

R A P L は、p 2 7^{kip1} の核内移行を促進し、G 1 / S チェックポイントとして、リンパ球増殖性疾患の抑制に重要な働きをしています。

まとめ

この成果は、接着と増殖が連携して制御されており、両者に関与する分子の破綻は、自己免疫疾患や癌の発症につながることを示しています。また、こうした疾患研究のモデルとなるマウスを新しく創出することによって、ヒト自己免疫疾患や発がんの病態解明と新しい治療法の開発に役立つものと期待されます。

“R A P L deficiency caused lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27^{kip1}” Katagiri K, et al., 2011, **Immunity** 34:24-38