

リンパ球動態を制御する S1P 受容体の内在化機構

滋賀医科大学 生命科学講座 生物学
平田 多佳子

1. はじめに

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、細胞の増殖や遊走、分化などさまざまな細胞応答を引き起こす脂質メディエーターであり、その作用は G タンパク質に共役する受容体 (GPCR) である S1P 受容体 (S1PR1~S1PR5) を介して発現する。なかでも、S1PR1 はリンパ球の体内循環に必須の役割を果たす受容体であり、リンパ臓器からのリンパ球移出は、リンパ球上の S1PR1 が S1P により活性化されることが必要である。一方、S1PR1 の内在化は、リンパ球が血液中からリンパ臓器に入るのに必要である。また、免疫抑制薬 FTY720 は、S1PR1 の内在化と分解を強力に誘導することにより、リンパ臓器からのリンパ球移出を阻害して末梢血リンパ球減少を引き起こし、免疫抑制作用を発揮する。このように、S1PR1 内在化は生理的なリンパ球トラフィッキングだけではなく薬物の作用発現にも関わる重要なプロセスであるが、その分子機構は未だ明らかではない。私たちはこれまでに、リンパ球の生体内移動の分子機構について解析を進めてきたが、最近、細胞膜を裏打ちする ezrin-radixin-moesin (ERM) タンパク質の一つである moesin を欠損するマウスの解析から、moesin がリンパ球の体内循環に重要な役割を果たすことを見いだした (論文 1)。さらに、moesin を欠損する T 細胞では、S1P 刺激による S1PR1 内在化が障害されていることを見いだした。そこで、本研究では、moesin 欠損リンパ球をツールとして、S1PR1 内在化の分子メカニズムを解明し、その制御により自己免疫疾患などの免疫異常に対して全身的な免疫調節を行う新たな治療を開発する基盤を築くことを目指した。

2. 方法

(1) マウス：moesin 欠損マウスは月田早智子博士 (大阪大学) より供与を受け、C57BL/6 (B6) マウスに 10 世代以上戻し交配した。オスの moesin 欠損マウス (Msn^{-Y}) と野生型同腹仔 (Msn^{+Y}) を実験に使用した。マウスは、滋賀医科大学動物生命科学センターにて飼育した。すべての研究や手順は滋賀医科大学動物実験委員会により承認された。

(2) 細胞の調整：マウスからリンパ節あるいは脾臓を採取し、スリ付きスライドグラスを用いて機械的にすり潰し、ナイロンメッシュに通してリンパ球を調整した。細胞数は血球計算盤で計測した。CD4 T 細胞は、CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて単離した。単離した T 細胞は 10 mM HEPES と 0.1% fatty acid-free BSA を含む RPMI 1640 培地で 3 時間血清飢餓処理した後、実験に使用した。

(3) 免疫蛍光染色：血清飢餓処理した CD4 T 細胞は、10 μ g/ml fibronectin でコートしたカバーグラス上加え、37°C で 10 分静置した。その後、100 nM S1P (Sigma)、100 nM CXCL12 (R&D Systems) あるいは vehicle で刺激した。刺激後 4% paraformaldehyde で 10 分固定し、0.5% Triton-X で 3 分透過処理した。1% BSA でブロッキングした後、4°C で一晩一次抗体と反応させ、洗浄後、室温で 45 分標識二次試薬と反応させた。洗浄後、封入し、レーザスキャン顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss Inc.) で観察した。

(3) 構造化照明顕微鏡法 (SIM)：SIM は共同研究者である Dr. Kanchanawong (National University of Singapore) の研究室において、Nikon N-SIM 顕微鏡システムを用いて行った。観察する細胞は、上記の免疫蛍光染色と同じ方法で染色した。

(4) 電子顕微鏡解析：血清飢餓処理した CD4 T 細胞を 100 nM S1P、100 nM CXCL12 あるいは vehicle で 1 時間刺激し、2% glutaraldehyde で固定した。エポキシ樹脂に包埋後、薄切し、透過電子顕微鏡 (H-7650; Hitachi) を用いて、細胞周縁に沿って x25,000、x30,000、x40,000 で写真をとった。

(4) 共免疫沈降： S1PR1 cDNA をマウス脾臓 CD4 T 細胞から増幅し、pFLAG-CMV4 vector (Sigma) に挿入して pFLAG-S1PR1 を作製した。HEK-293 細胞に pFLAG-S1PR1 またはコントロールベクターを導入し、細胞を可溶化して、抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma) により免疫沈降を行った。免疫沈降物を抗 moesin 抗体 (Q480; Cell Signaling Technology) によるウェスタンブロットにより解析した。

(4) RNAi：マウスの ezrin を標的とする shRNA vector とコントロールの shRNA vector を RNAi-Ready pSIREN-RetroQ vector (Clontech) を用いて作製し、PLAT-E 細胞に導入してウイルスを回収した。IL-2 の存在下で抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体で刺激した CD4 T 細胞にウイルスを感染させ、4 μ g/ml puromycin の存在下で培養することにより導入細胞を選択した。

3. 結果

(1) T 細胞における S1PR1 の細胞内局在

これまでに、マウス CD4 T 細胞を S1P で刺激すると、S1PR1 の局在が細胞膜から細胞内のドット状の構造に移ることを、免疫染色した細胞の共焦点顕微鏡観察により見いだした。一方、moesin を欠損する T 細胞では、S1P 刺激後も S1PR1 内在化がほとんど観察できない。内在化した受容体は、多くの場合エンドソームに移行し、分解経路やリサイクリング経路に入る。そこで、各種エンドソームのマーカとなる Rab タンパク質あるいはそのエフェクタータンパク質を S1PR1 と同時に免疫染色することにより、S1P 刺激後、S1PR1 がどのエンドソームに移行するか調べた。野生型細胞では、S1PR1 は初期エンドソームのマーカである Rab5 のエフェクターである Rabaptin-5 と共局在した。一方、リサイクリングエンドソームのマーカである Rab4 とは共局在しなかった。moesin 欠損細胞では、S1PR1 はどちらも共局在しなかった。

初期エンドソームのサイズは典型的なもので約 200~300 nm なので、通常の共焦点顕微鏡では明瞭な観察が難しい。そこで、S1PR1 がエンドソームに局在することを確かめるために、高解像度顕微鏡法の一つである SIM を用いた。SIM では通常の共焦点顕微鏡の約 2 倍の解像度が得られる。SIM により、S1PR1 と Rabaptin-5 は、共に明瞭な局在が観察され、野生型細胞では S1P 刺激後に S1PR1 と Rabaptin-5 が細胞内の小胞に共局在することが示された (図 1)。

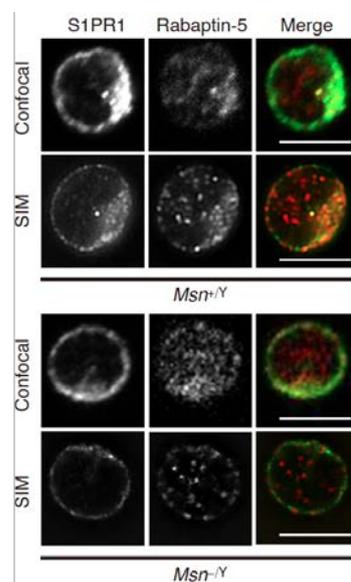


図 1 SIM による S1PR1 と Rabaptin-5 の局在

(2) S1PR1 内在化機構の解析

多くの GPCR は clathrin 依存性エンドサイトーシスにより内在化されることが知られている。そこで、CD4 T 細胞において、S1PR1 と clathrin の局在を共焦点顕微鏡により観察したところ、野生型細胞では、S1P 刺激後に S1PR1 と clathrin が共局在した。

clathrin 依存性エンドサイトーシスにおける moesin の役割を明らかにするために、clathrin 被覆構造として細胞膜が陥入したピットと小胞の数を電子顕微鏡観察により検討した。ピットと小胞は、形態的に小胞、浅いピット、U 型ピット、 Ω 型ピットに分類した。未刺激では、moesin 欠損細胞において、野生型細胞よりピットの数が多く、構成的な clathrin 依存性エンドサイトーシスにも moesin が関与する可能性が示された。S1P 刺激により、野生型細胞では小胞の数が増加した。一方、moesin 欠損細胞では、ピットの数は増加したが、小胞形成に障害が認められた (図 2)。CXCL12 刺激では、moesin 欠損細胞でも野生型細胞より少ないものの小胞形成が誘導された。

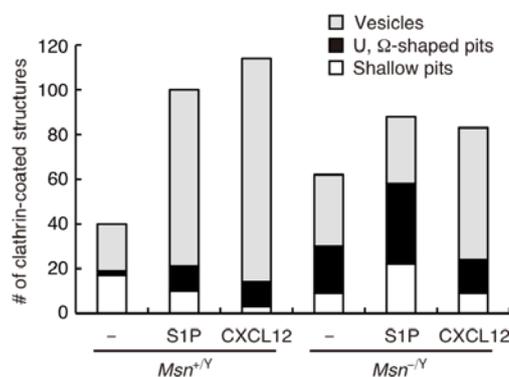


図 2 電子顕微鏡による clathrin 被覆構造の定量

(3) S1PR1 を含む分子複合体の解析

野生型 CD4 T 細胞を低濃度の S1P で刺激すると、S1PR1 と moesin が細胞膜のキャップ様構造に

共局在することをこれまでに共焦点顕微鏡観察により見いだしている。そこで、培養細胞に FLAG タグを付けた S1PR1 を強制発現させ、免疫沈降を行うことにより、moesin が S1PR1 に結合するか検討した。これまでの検討では、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した場合に moesin が非特異的に沈降したため、共免疫沈降の条件をさらに検討する必要があると考えられた。

(4) S1PR1 内在化における ezrin の関与の検討

ERM タンパク質のうち、リンパ球には ezrin と moesin が主に発現している。そこで、S1PR1 内在化における ezrin の役割を調べるため、CD4 T 細胞において ezrin をノックダウンした。野生型細胞、moesin 欠損細胞のいずれにおいても、ezrin のノックダウンは S1P 刺激による S1PR1 の内在化には影響を及ぼさなかった。

4. 考察

本研究では、リンパ球において S1PR1 の動態を観察し、moesin の関与を含めてその分子メカニズムを解析した。CD4 T 細胞では、S1P 刺激により S1PR1 は clathrin 依存的に内在化され、moesin 欠損 T 細胞では内在化が障害されていることから、moesin がこの過程において重要な役割を果たすと考えられた (論文 2)。

多くの GPCR はアゴニスト刺激による内在化により制御され、clathrin 依存性エンドサイトーシスは多くの受容体の内在化において鍵となるステップである。これまでに、ERM タンパク質がエンドサイトーシスに関与することがいくつか報告されている。リンパ球には ERM タンパク質のうち ezrin と moesin が主に発現し、これらは機能的に冗長性を示すと考えられてきた。本研究では、moesin の欠損により S1PR1 の内在化が障害されるのに対し、ezrin のノックダウンでは S1PR1 の内在化に影響がないことが示された。電子顕微鏡による解析では、moesin 欠損は S1P による小胞の形成を障害するが、ピットの形成にはあまり影響を与えないことが示された。これらの結果から、moesin はピットの形成開始には必須ではないが、ピットが成熟する過程や小胞をくびり取る過程において必要である可能性が示唆される。小胞は、細胞表面から dynamin によりくびり取られることにより生成すると考えられているので、moesin と dynamin の相互作用については、今後の検討が必要である。

S1P とその受容体 S1PR1 は、リンパ球をはじめ免疫細胞の生体内での移動に必須の役割を果たすが、S1PR1 の機能は S1P 刺激による内在化により厳密に制御されている。S1PR1 内在化の分子メカニズムの解明は、S1PR1 を介して免疫応答を制御する新たな薬物の開発の基盤となる。さらに、GPCR の多くはリガンド結合による内在化によりその機能が制御されていることから、GPCR の内在化に共通する分子メカニズムの解明は、GPCR を介するさまざまな生命現象や病態の理解につながると思っている。S1PR1 をモデルケースとして、今後さらにその内在化の分子機構を解析していく予定である。

5. 参考文献

- 1) Hirata T, Nomachi A, Tohya K, Miyasaka M, Tsukita S, Watanabe T, Narumiya S (2012) Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *Int Immunol* 24: 705-717.
- 2) Nomachi A, Yoshinaga M, Liu J, Kanchanawong P, Tohyama K, Thumkeo D, Watanabe T, Narumiya S, Hirata T (2013) Moesin controls clathrin-mediated S1PR1 internalization in T cells. *PLoS One* 8: e82590.