

アレルギー応答を司る新規制御因子の同定と機能解析

福岡歯科大学 口腔歯学部 機能生物化学講座 感染生物学分野

田中 芳彦

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

細胞の分化や動きは、最も基本的な細胞機能の一つであり、それを制御するシグナル分子は重要な役割をしています。なかでも免疫細胞は高次機能を担っており、ユニークな発現制御を受けるシグナル分子が疾患の病態に関わることが知られていますが、不明な点が多く残されています。

T細胞の成熟、活性化、分化や遊走などの機能発現において、T細胞受容体 (T cell receptor; TCR) から細胞内へ伝わるシグナルが重要な役割をはたしています。TCRは $\alpha\beta$ のヘテロダイマーからなり、樹状細胞などの抗原提示細胞の細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) /ペプチド抗原を直接認識しますが、細胞質部分にはシグナル伝達に必要な部位をもたないために、CD3 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ とともにTCR/CD3複合体を形成することで、CD3分子を介して細胞内へシグナルを伝達しています。これらCD3分子の細胞質部分には免疫受容体チロシン活性化モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM) と呼ばれる配列があり、この配列を介して細胞内のプロテインキナーゼと結合します。補助受容体であるCD4とCD8の細胞質部分にはLckと呼ばれるプロテインキナーゼが会合しており、これら補助受容体、TCR、MHC/ペプチドが複合体を形成すると、LckがITAM内のチロシン残基をリン酸化します。リン酸化したITAMにZAP-70と呼ばれる次のプロテインキナーゼが結合すると、LckがZAP-70を活性化します。このようにして活性化されたZAP-70は膜結合型のシグナル足場蛋白であるLAT (linker for activation of T cell) をリン酸化します。リン酸化されたLATにはSLP76、PLC γ 1、GADS、Itkなど様々なシグナル伝達分子がリクルートされます。PLC γ 1は膜脂質PIP₂を分解し、IP₃ (inositol 1, 4, 5-triphosphate) とDAG (diacylglycerol) を産生し、カルシウムシグナルを引き起こすとともに、セリン/スレオニンキナーゼであるPKC θ を活性化することでシグナルを伝えます。細胞増殖、活性化、アクチン再構築、免疫シナプス形成などの機能発現には、Rac1やCdc42といったRhoファミリー低分子量G蛋白質の活性化が不可欠です。T細胞におけるRac1の活性化にはVav1、DOCK2、SLATという3つの分子が関与しています (1)。

申請者はこれまでにディファレンシャルディスプレイ法によってマウスTh2細胞から新しい遺伝子を単離しました。この蛋白質はマウスSWAP-70とアミノ酸レベルで45%の高い相同性をもつことからSWAP-70-like adapter of T cells (SLAT) と命名しました (2)。マウスとヒトの間ではアミノ酸レベルで92%の高い相同性を持ちます。

SLATは胸腺細胞や末梢のT細胞に多く発現しており、マクロファージ (3, 4) や破骨細胞 (5) にも発現しています。一方、SWAP-70はB細胞特異的な遺伝子として単離され、B細胞 (6, 7) や肥満細胞 (8) に多く発現しています。SLATはSWAP-70とともに第3のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として分類され、PHドメインとDH-likeドメインをタンデムにコードします (1)。SLATはN末端からカルシウム結合ドメインであるEF hand、ITAM-likeシークエンス、PHドメインとDH-likeドメインを有します (2)。SWAP-70にRacを活性化するGEFとしての機能があり、それまでに知られていたDHともDHR2とも異なるドメインをもつことが報告されています (6)。また、SLATにも同様にRac1、Cdc42、RhoAに対するGEFとしての機能があることが報告されています (9-12)。

SLATは未刺激状態では細胞質に局在しますが、TCR刺激にともない免疫シナプスに局在するようになります。SLATのPHドメインはリン脂質PIP₃と会合することが示されていたため、TCR刺激後に細胞形質膜に産生されるPIP₃によってSLATの細胞内局在が制御されていると予想されましたが、免疫シナプスへの局在はPHドメインを介したものではありませんでした。ITAM-likeシークエンス内のTyr-133とTyr-144がLck依存的にチロシンリン酸化を受けて、SLATは免疫シナプスへ局在することが明らかになっています (11)。また、SLATノックアウトマウスの解析により、SLAT欠損T細胞では細胞内カルシウムシグナルと転写因子NFATの核移行が著しく障害されていました (13)。しかし、PLC γ 1のリン酸化や活性化、ならびにIP₃の産生に異常を認めないことから、SLATはそれよりも下流に位置するところで小胞体からのカルシウム放出を制御していると考えられます。さらに、Lck依存的なSLATの免疫シナプス局在が、NFAT活性化に不可欠であることが明らかにされています (11)。

このような免疫細胞の一連の研究から、申請者はT細胞がアレルギーに関連した細胞へ分化する過程において新規SLAT関連分子SLAT2が発現することを見出しました。本研究は、SLAT2を切り口として免疫細胞の分化や動きの制御機構を明らかにすることで、アレルギーの病態解明と新しい治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目的としています。

2. 方法

1) 細胞培養と刺激

野生型C57BL/6マウスの末梢リンパ節、脾臓からCD4抗体磁気ビーズを用いてCD4⁺T細胞を単離して、脾細胞（抗原提示細胞）と抗CD3抗体存在下に、Th1細胞（IL-12 + 抗IL-4抗体）あるいはTh2細胞（IL-4 + 抗IL-12抗体 + 抗IFN- γ 抗体）の分化条件で5日間培養しました。再刺激はCD3抗体+CD28抗体を固相化した24穴プレートを使用しました。

2) 新規SLAT関連分子の単離

Th2細胞を再刺激し、48時間後の細胞からRNAを採取し、逆転写酵素とオリゴdTを用いてcDNAを作成した後、SLAT由来のプライマーで増幅して約750kbpの遺伝子を単離しました。

3) Western blotting

各種サブセットの分化条件下で培養・刺激後のマウスT細胞、あるいはSLAT2遺伝子導入後のJurkat細胞の細胞溶解液を1%SDS-PAGEにて展開後、抗SLAT抗体を用いてタンパク質発現を可視化しました。

4) サイトカイン産生

Jurkat細胞に遺伝子導入することでNFAT活性化を測定しました(2)。マウスT細胞をTh2細胞に分化後、レトロウイルスにてSLAT2遺伝子を導入し、細胞内サイトカイン染色を行い、FlowcytometryにてIL-4産生を測定しました。

3. 結果 研究成果

1) 新規SLAT関連分子SLAT2の単離・同定

野生型マウスから分離したT細胞をTh2細胞への分化誘導した後、再刺激をすることにより、分子量35kDaの新たなSLAT関連分子が発現することを見出しました。また、より生理的な条件で解析するために、OVAを認識するT細胞受容体トランスジェニック (TCR Tg) マウスを用いて確認したところ、この抗原特異的なTh2細胞においても同様の結果を得ました。この分子は初期刺激によるTh2細胞への分化では認められず、再刺激後2日目から強く発現してくることが明らかになりました。一方で、Th1細胞には全く発現していませんでした。Th2細胞を再刺激後2日目のcDNAから新しいSLAT関連遺伝子を単離することに成功し、SLAT2と命名しました。

2) ヘルパーT細胞サブセットにおけるSLAT2の発現パターン

ヘルパーT細胞の各種サブセットTh1、Th2、Th17、Treg（制御性T細胞）への分化条件で、SLAT2の発現パターンをウェスタンブロッティングにより蛋白レベルで詳細に解析したところ、Th1、Th17、Tregでは発現を認めず、SLAT2の発現が再刺激後のTh2に特異的であることが明らかになりました。

3) サイトカイン産生におけるSLAT2の役割

完全長のSLATはIL-4産生を増強し、IFN- γ 産生を抑制することが明らかになっています(2)。また、一過性にSLATを過剰発現させたヒトT細胞株Jurkatでは転写因子NFATの活性を増強することが明らかになっています(11)。一過性にSLAT2を過剰発現させたヒトT細胞株Jurkatを用いて、NFATの活性化への影響をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、NFAT活性を増強することを見出しました。

さらに、より生理的な条件で解析するために、野生型マウスから分離したT細胞をTh2細胞に分化させた後、レトロウイルスにてSLAT2を過剰発現させて、サイトカインIL-4産生への影響を細胞内サイトカイン染色によるFlowcytometryを用いて比較検証したところ、SLATと同様にIL-4の産生を増強する結果が得られました。

4) SLAT2の細胞内局在と細胞形態

Jurkat細胞株を用いてSLAT2の細胞内局在を観察したところ、完全長のSLATが細胞膜に局在することに比較して、細胞質内に限局して存在することが観察されました。さらに、SLAT2の過剰発現によりアクチン集積による細胞突起を観察するようになり、細胞形態に変化が生じる可能性が示唆されました。

4. 考察 まとめ

本研究では、アレルギーに関連することが知られるTh2細胞を再刺激することによって、新規SLAT関連分子SLAT2が発現することを見出し、ヘルパーT細胞における発現パターンとサイトカイン産生に及ぼす影響といった機能について詳細に解析を進めました。ヘルパーT細胞におけるSLAT2の発現パターンはTh2細胞に限定されるものであり、他のサブセットでは発現を認めることはありませんでした。このような発現パターンを示すことから、Th2細胞においてタイプ2サイトカイン産生に影響を及ぼすことが予想されました。実際、Jurkat細胞株を用いた実験系ではNFATの活性化を増強し、マウスから分離したT細胞をTh2細胞に分化させた後にSLAT2を過剰発現させたより生理的な条件下での実験系ではIL-4の産生に影響

を及ぼすことが示唆されており、アレルギー応答の制御に重要な役割をもつ可能性が認められました。さらに詳細な検証を続けていく予定です。

今後の取り組みとして、SLAT2を介したシグナル伝達機構を明らかにしていきます。具体的には、細胞局在を制御する機構、ターゲットとなる低分子量G蛋白質といったことを解明することで、シグナル伝達機構におけるSLAT2の役割を特定していきます。また、生体内でのアレルギー反応におけるSLAT2の生理的役割を、アレルギー実験動物モデルの解析を通して明らかにしていく予定です。

本研究で得られた知見に基づき、アレルギーに関わるSLAT2を標的としたT細胞の分化と遊走の制御機構の詳細な解析を通して、アレルギーの病態メカニズムの解明を進めます。将来的には、産業界と協力して創薬による新しい治療法の開発につながる研究を展開していきます。

5. 発表論文、参考文献

1. Tybulewicz, V. L., and R. B. Henderson. 2009. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 630-644.
2. Tanaka, Y., K. Bi, R. Kitamura, S. Hong, Y. Altman, A. Matsumoto, H. Tabata, S. Lebedeva, P. J. Bushway, and A. Altman. 2003. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells. *Immunity* 18: 403-414.
3. Mehta, H., M. Glogauer, S. Bécart, A. Altman, and K. M. Coggeshall. 2009. Adaptor protein SLAT modulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 284: 11882-11891.
4. Chen, Q., S. Gupta, and A. B. Pernis. 2009. Regulation of TLR4-mediated signaling by IBP/Def6, a novel activator of Rho GTPases. *J. Leukoc. Biol.* 85: 539-543.
5. Youn, B. U., K. Kim, J. H. Kim, J. Lee, J. B. Moon, I. Kim, Y. W. Park, and N. Kim. 2013. SLAT negatively regulates RANKL-induced osteoclast differentiation. *Mol. Cells* 36: 252-257.
6. Shinohara, M., Y. Terada, A. Iwamatsu, A. Shinohara, N. Mochizuki, M. Higuchi, Y. Gotoh, S. Ihara, S. Nagata, H. Itoh, Y. Fukui, and R. Jessberger. 2002. SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature* 416: 759-763.
7. Gross, B., T. Borggreffe, M. Wabl, R. R. Sivalenka, M. Bennett, A. B. Rossi, and R. Jessberger. 2002. SWAP-70-deficient mast cells are impaired in development and IgE-mediated degranulation. *Eur. J. Immunol.* 32: 1121-1128.
8. Sivalenka, R. R., and R. Jessberger. 2004. SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. *Mol. Cell. Biol.* 24: 10277-10288.
9. Gupta, S., J. C. Fanzo, C. Hu, D. Cox, S.Y. Jang, A.E. Lee, S. Greenberg, and A. B. Pernis. 2003. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor to the immunological synapse. *J. Biol. Chem.* 278: 43541-43549.
10. Mavrakis, K. J., K. J. McKinlay, P. Jones, and F. Sablitzky. 2004. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and Rho A. *Exp. Cell Res.* 294: 335-344.
11. Bécart, S., A. J. Canonigo Balancio, C. Charvet, S. Feau, C. E. Sedwick, and A. Altman. 2008. Tyrosine-phosphorylation-dependant translocation of the SLAT protein to the immunological synapse is required for NFAT transcription factor activation. *Immunity* 29: 704-719.
12. Feau, S., S. P. Schoenberger, A. Altman, and S. Bécart. 2013. SLAT regulates CD8⁺ T cell clonal expansion in a Cdc42- and NFAT1-dependent manner. *J. Immunol.* 190: 174-183.
13. Bécart, S., C. Charvet, A. J. Canonigo Balancio, C. D. Trez, Y. Tanaka, W. Duan, C. Ware, M. Croft, and A. Altman. 2007. SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling Ca²⁺/NFAT signaling. *J. Clin. Invest.* 117: 2164-2175.

6. 謝辞

本研究は第47回アステラス病態代謝研究会の研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚くお礼申し上げます。