細胞膜機能分子, $\beta 1$ インテグリンとT細胞免疫調節機構

森本 幾夫

Jpn. J. Clin. Immun., 22 (6) : 371~377, 1999. $\beta 1$ integrin molecule and its immunoregulatory function of T cells

Chikao Morimoto

*Department of Clinical Immunology and AIDS Research Center,
Institute of Medical Science, University of Tokyo***Key words :** $\beta 1$ integrin,
T cell costimulation,
pp 105/Cas-L,
pp 125/FAK,
Tyrosine phosphorylation

I. はじめに

ヒト CD4 T 細胞は機能的多様性に富んでおり CD29/ $\beta 1$ インテグリン, CD45 アイソフォームの発現の差異により CD4 T 細胞をナイーブ, メモリー T 細胞に分けることができる¹⁾. 特にメモリー T 細胞は $\beta 1$ インテグリン分子が選択的に発現され, ナーブ T 細胞と異なり炎症局所に集積しやすく, エフェクター T 細胞として免疫系をポジティブに制御していると考えられる. $\beta 1$ インテグリンは CD29 ($\beta 1$) 分子を β サブユニットとして共有する一群で少なくとも 9 種類の α サブユニットが知られ^{2,3)}, 別名 VLA (very late activation antigen) とも呼ばれるが, 特に VLA-4, VLA-5 および VLA-6 は末梢血 T リンパ球に恒常的に発現している³⁾. $\beta 1$ インテグリンの主なりガンドは, 細胞外マトリックス (コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンなど) であるが, VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) のように細

胞表面に発現している分子もリガンドである.

慢性関節リウマチや中枢神経系の代表的免疫疾患である多発性硬化症では, 浸潤 T 細胞や滑液, 髄液中 T 細胞は $\beta 1$ インテグリン分子を強く発現している^{4,5)}. また, 血管内皮細胞表面には VCAM-1 などの発現が増加し, メモリー T 細胞の炎症部位への遊走と定着に関与している⁵⁾.

$\beta 1$ インテグリン分子は単なる接着剤としてのみでなく, T 細胞を含む様々な細胞において外からの刺激を伝えるシグナル伝達分子であることが明らかにされてきた. 我々は 1989 年初めて $\beta 1$ インテグリン分子が CD3/TCR 由来の T 細胞 costimulation に関わることを明らかにした⁶⁾. さらに 1992 年に $\beta 1$ インテグリン分子の架橋により 105 KDa の蛋白 (pp 105) がヒト T 細胞でチロシンリン酸化されることを報告し⁷⁾, 1996 年, この 105 KDa 蛋白の遺伝子のクローニングに成功した. pp 105 は p 130 Cas 関連蛋白で, その分布は p 130 Cas は接着系細胞に発現し, 一方 pp 105 はリンパ系細胞に発現されることから pp 105 を Cas-L (Cas-lymphocyte type) と名付けた⁸⁾.

図 1 FAK の構造

中央のKの部分はチロシンキナーゼの活性部位、および斜線分は paxillin 結合部位、即ち FAT (focal adhesion targeting) ドメイン、黒線部は Cas および PI 3 K, GRAF 結合部位である proline rich site, 2つのYは各々Src および GRB2 の SH2 ドメイン結合部位であるチロシン 397 と 925 を示してある。

慢性関節リウマチなどの炎症部位へのT細胞の遊走およびエフェクターT細胞機能発現に、重要な役割を果たしている細胞接着分子である $\beta 1$ インテグリン分子とそのT細胞免疫調節機構について、我々の最新のデータを中心として説明したい。

1. pp 125/FAK および pp 105 について

focal adhesion kinase (pp 125/FAK) は、v-Src でトランスフォームしたトリ胎児線維芽細胞で、チロシンリン酸化されている 125 kD の蛋白質として同定・クローニングされた⁹⁾。この蛋白質は、前述したように focal adhesion (接着斑) に局在していることからその名がある。pp 125/FAK は図 1 のように、Src ファミリーのチロシンキナーゼのように保存されたモチーフの見あたらない大きなN末端領域とC末端領域の間にはさまれた形で、分子の中央にチロシンキナーゼとしての活性部位を持つ。我々は FAK のC末端ドメインが paxillin との結合に必須であり、FAK の paxillin 結合能と接着斑局在能とに強い相関関係が存在することも見出した¹⁰⁾。

pp 105 は HTLV-I 感染T細胞株である H9 細胞において、VLA-4, 5 インテグリンのリガンドである FN, CS-1 や、抗 VLA 抗体による $\beta 1$ インテグリン分子の架橋により、顕著にチロシンリン酸化される蛋白質として初めて我々により記載された¹¹⁾。pp 105 は抗 FAK 抗体を用いて検討した結果、チロシンリン酸化のカイネティックスは pp 125/FAK と同じだが、FAK とは異なる蛋白質であることが判明している¹²⁾。

さらに我々の解析で pp 125/FAK の paxillin 結合ドメインと pp 105 結合ドメインは明確に分離できる

こと、pp 105 は直接 FAK に結合している可能性が示された⁸⁾。

2. pp 105 の遺伝子とその構造

p 130/Cas は p 60^{v-Src} および p 47^{v-Crk} でトランスフォームした線維芽細胞においてチロシンリン酸化され、v-Crk と結合している蛋白質として同定された¹³⁾。p 130/Cas は 874 個のアミノ酸からなり、ひとつの SH3 ドメインと 15 個の SH2 結合モチーフ（この部分で Crk-SH2 と結合する）が繰り返し配列する、substrate ドメインを持つ（図 2）¹⁴⁾。

注目すべきことに Hanks ら¹⁵⁾は、p 130 Cas がその SH3 ドメインを介して FAK と結合することを報告した。さらに彼らの報告により、pp 105 の結合に十分な FAK のアミノ酸 706-904 のドメインが、FAK 側の p 130 Cas 結合配列を全て含んでいることが明らかとなった。

以上のような理由から、我々は pp 105 が p 130 Cas の関連蛋白ではないかという可能性を検討した。まず、H9 の cell lysate より GST-C-terminal FAK (CT) を用いて pp 105 を共沈させたものを抗 p 130 Cas 抗体でプロットしたところ、p 130 Cas に対する抗体は pp 105 を認識することが明らかになった。さらに H9 の cell lysate から抗 p 130 Cas 抗体を用いて免疫沈降したものを同抗体でプロットすると、予想されたように 105 kD 付近にバンドが検出された。これらのことより pp 105 が p 130/Cas のホモログであるか、少なくとも非常に類似したエピトープを持つことが明らかとなった。

pp 105 の持つこのような抗 p 130/Cas 抗体との交

図2 Casファミリー蛋白質の構造

数字は、p 130/Cas ともうひとつの Cas ファミリー蛋白質である Efs の pp 105/Cas-L とのアミノ酸レベルでの相同性を示す。P は proline rich site を、* は YDYVHL 配列を示す。この配列は Src および SHPTP 2 の SH 2 ドメインの結合配列と弱い相同性をもつ。

又反応性を、その cDNA クローニングに応用した。λgt 11 をベクターとしたヒト T lymphoblastoid cell line (Hut 78) の cDNA ライブラリーを用い、 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を発現させ pp 105 とクロスする抗 p 130/Cas 抗体でスクリーニングを行った。得られた cDNA クローンから、pp 105 は 834 アミノ酸からなり、p 130/Cas にみられるようなひとつの SH 3 ドメインと 13 個の SH 2 結合モチーフからなる substrate ドメインを持つことが判明した (図 2)⁸⁾。予想に反して p 130/Cas と pp 105 の核酸レベルでのホモロジーは低く、SH 3 ドメインでは 78%、substrate ドメインでは 32% であった。

蛋白レベルでの pp 105 と p 130/Cas の発現分布を検討してみると、3 Y 1, T 47 D といった付着系の細胞や、HL-60, K 562 等の骨髓系細胞では p 130/Cas を発現したが、H 9 を初めとする T 細胞系細胞、B 細胞や胸腺細胞では pp 105 が発現し、比較的リンパ球系の細胞に発現が多く認められるということから、この蛋白質を Cas-L (Cas-Lymphocyte type) と命名した。

3. Cas-L 結合蛋白

pp 105/Cas-L は、v-Src 等によりチロシンリン酸化されることにより、Crk, Nck, SHPTP 2, Src 等のアダプター蛋白、フォスファターゼおよびチロシンキナーゼとそれらの SH 2 ドメインを介して結合する

ことが明らかとなった。また我々は、最近 FAK が Cas-L を直接チロシンリン酸化することを発見した¹⁰⁾。このことからインテグリンの刺激による Cas-L のリン酸化には、Src ファミリーチロシンキナーゼと FAK との双方が関与していると考えられる。

さらに Cas-L はリンパ球に選択的に発現していることから、CD 3/TCR 刺激による Cas-L のリン酸化を検討した¹⁷⁾。Cas-L は β 1 インテグリン刺激のみならず、CD 3 クロスリンクでもチロシンリン酸化された。しかし CD 3 刺激では Cas-L は急速にリン酸化され、すぐに脱リン酸化されるが β 1 インテグリン刺激による Cas-L のリン酸化はゆっくりで、安定して持続した。一方、CD 3/TCR 刺激では FAK のチロシンリン酸化は認められなかった。このように Cas-L チロシンリン酸化のカイネティックの違いは、CD 3/TCR 由来 T 細胞反応と β 1 インテグリン由来免疫反応とで異なった調節機能に関わることを強く示唆している。

さらに、FAK への結合部位である SH 3 ドメインを欠いた Cas-L 変異体は CD 3 刺激ではチロシンリン酸化されたが、 β 1 インテグリン刺激ではチロシンリン酸化されないことから、FAK は CD 3 刺激 Cas-L チロシンリン酸化には関与しないことが考えられる。このように CD 3/TCR 刺激による Cas-L のチロシンリン酸化は、 β 1 インテグリン刺激とは異なるユニークなシグナル伝達経路をとっていることが明らか

図 3 FAK および Cas-L を中心とするシグナル伝達とその生物学的機能

となった。

図 3 にまとめたように、FAK および Cas は他の色々な刺激によってもそのチロシリン酸化の亢進あるいは活性化が引き起こされる。このように、FAK および Cas を介するインテグリンのシグナル伝達系は、様々な細胞内シグナル伝達系とクロストークしながらその多様な生物学的機能を発揮していると考えられる。

4. Cas-L の生物学的機能について^{18,19)}

Jurkat T 細胞株は IL-2 を産生する数少ないヒト T 細胞株の一つであるが、CD 3, CD 29, CD 49 d (VLA-4), CD 28 を強く発現しているが、 $\beta 1$ インテグリンは TCR/CD 3 との架橋化により costimulatory signal を誘導できない。つまり、 $\beta 1$ インテグリンの抗体あるいはそのリガンドと抗 CD 3 抗体を組み合わせても IL-2 を産生しない。しかし、CD 28 刺激である抗 CD 3 と抗 CD 28 抗体では IL-2 を産生する。このように Jurkat T 細胞株は $\beta 1$ インテグリンを発現しているにもかかわらず、末梢血 T 細胞と異なり、

$\beta 1$ インテグリン由来 costimulatory signal が誘導できないことが明らかとなった。 $\beta 1$ インテグリン由来 costimulatory signal では FAK および Cas-L が重要と思われることからこの発現を調べたところ、FAK は発現しているものの Cas-L は殆ど発現していなかった。これらの結果から、Jurkat T 細胞株で $\beta 1$ インテグリン刺激により IL-2 産生が誘導されないのは、Cas-L の発現が欠損していた為という可能性が示唆された。この点を解明のために、幾つかの Cas-L の Jurkat トランスフェクタントを樹立した。その中から無差別に CD 3, CD 29, CD 49 d, CD 28 の発現はほぼ同じである Cas-L トランスフェクタントおよびベクターコントロールを選択して、固相化した抗 CD 3 抗体および CD 49 d のリガンドである CS-1 蛋白で刺激して、IL-2 産生を検討した¹⁸⁾。

図 4 に示すように、代表的な Cas-L トランスフェクタントはベクターコントロールを用いた実験と比較して GST-CS-1 の濃度依存性に IL-2 を産生した。10 $\mu\text{g/ml}$ の GST-CS-1 蛋白では、Cas-L トランスフェクタントは抗 CD 3 抗体のみの刺激の場合と比較

図 4 $\beta 1$ インテグリン由来 costimulation による Jurkat T 細胞株の IL-2 産生

Cas-L トランスフェクタント (黒棒) およびベクターコントロール (白棒) は固相化抗 CD 3 抗体 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および様々な濃度の GST-CS-1 とで 24 時間培養され, 培養上清の IL-2 を CTLL-2 assay にて調べた。可溶性 CD 29 抗体および CD 49 d 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は IL-2 産生を抑制する。

して, 約 5 倍の IL-2 の産生が認められた。さらに, この IL-2 産生は可溶性抗 CD 49 d 抗体および CD 29 抗体処理により抑制された。一方, Cas-L トランスフェクタントおよびベクターコントロールとも CD 28 由来 costimulation では両者ともほぼ同レベルの IL-2 を産生した。さらに, これらの結果がクローナルバリエーションから得られたという可能性を否定するため, Cas-L トランスフェクタントおよびベクターコントロール細胞株を 5 つずつ選択して, 固相化した抗 CD 3 抗体および GST-CS 1 で刺激して IL-2 産生を検討した。図 5 で表したように Cas-L トランスフェクタントの平均 IL-2 産生はベクターコントロールと比較して約 15 倍も多く IL-2 を産生した (35.4 $\pm$ 5.2 U/ml VS 2.4 $\pm$ 1.3 U/ml)。さらに抗 CD 3 抗体と抗 CD 49 d 抗体との架橋化でも同様の結果を得ている。これらの結果から, 1) Cas-L トランスフェクションにより Jurkat T 細胞株の $\beta 1$ インテグリン由来 IL-2

産生を誘導すること。2) Cas-L は CD 28 由来 T 細胞 costimulation には関与せず, $\beta 1$ インテグリンによる T 細胞 costimulation に鍵となる分子である。さらに Cas-L を発現させた Jurkat T 細胞はトランスウェルに抗 CD 3 抗体および FN を別々に coat しても遊走を起こさないが, 抗 CD 3 抗体と FN を同時に coat すると強い遊走能を獲得することを観察している¹⁹⁾。このように Cas-L は $\beta 1$ インテグリン刺激による T 細胞活性化のみならず, 細胞遊走にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

II. おわりに

Cas-L 分子は, $\beta 1$ インテグリン由来 T 細胞 costimulation や T 細胞遊走に関与するシグナル伝達に鍵となる分子である。自己免疫疾患の 1 つである慢性関節リウマチや多発性硬化症では炎症部位や滑膜, 髄液中で $\beta 1$ インテグリン強陽性 T 細胞が集積してい

図 5 異なった Cas-L トランスフェクタントおよびベクターコントロール株による IL-2 産生

5 つの異なった Cas-L およびベクターコントロール株は固相化した CD 3 抗体と GST-CS-1 (10 μ g/ml) で 24 時間培養され、その上清の IL-2 を CTLL-2 assay にて調べた。

る。一方、VCAM-1 を始めとする β 1 インテグリン分子のリガンドの発現亢進も RA の血管内皮細胞、滑膜細胞、マクロファージなどに認められる。これらの環境下では、浸潤 T 細胞の β 1 インテグリン刺激カスケードが活性化を受けて、IL-2 を産生し、さらに様々な炎症性サイトカインを産生して炎症をさらに増

悪させていると考えられる。今後更に、Cas-L をはじめとする β 1 インテグリンのシグナル伝達機構の解析は慢性関節リウマチや多発性硬化症の免疫病態のみならず、新しい type の抗炎症剤の開発にもつながることと思われる。

文 献

- 1) Morimoto, C., Schlossman, S.F.: Human naive and memory T cells revisited: new markers (CD 31 and CD 27) that help define CD 4+ T cell subsets. Clin. Exp. Rheum., 11: 241~247, 1993.
- 2) Hynes, R.O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell., 69: 11~25, 1992.
- 3) Hemler, M.E.: VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. Annu. Rev. Immunol., 8: 365~400, 1990.
- 4) Hafler, D.A., Weiner, H.L.: MS: a CNS and systemic autoimmune disease. Immunol Today., 10: 104~107, 1989.
- 5) Mojcik, C.F., Shevach, E.M.: Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. Arthritis Rheum., 40: 991~1004, 1997.
- 6) Matsuyama, T., Yamada, A., Morimoto, C., et al.: Activation of CD 4 cells by fibronectin and anti-CD 3 antibody. A synergistic effect mediated by the VLA-5 fibronectin receptor complex. J. Exp. Med., 170: 1133~1148, 1989.
- 7) Nojima, Y., Humphries, M.J., Morimoto, C., et al.: VLA-4 mediates CD 3-dependent

- CD 4+ T cell activation via the CS 1 alternatively spliced domain of fibronectin. *J. Exp. Med.*, 172 : 1185~1192, 1990.
- 8) Minegishi, M., Tachibana, K., Morimoto, C., et al. : Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 184 : 1365~1375, 1996.
- 9) Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., et al. : pp 125 FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89 : 5192~5196, 1992.
- 10) Tachibana, K., Sato, T., Morimoto, C., et al. : Direct association of pp 125 FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp 125 FAK. *J. Exp. Med.*, 182 : 1089~1099, 1995.
- 11) Nojima, Y., Rothstein, D.M., Morimoto, C., et al. : Ligation of VLA-4 on T cells stimulates tyrosine phosphorylation of a 105-kD protein. *J. Exp. Med.*, 175 : 1045~1053, 1992.
- 12) Nojima, Y., Tachibana, K., Morimoto, C., et al. : Focal adhesion kinase (pp 125 FAK) is tyrosine phosphorylated after engagement of α 4 β 1 and α 5 β 1 integrins on human T-lymphoblastic cells. *Cell. Immunol.*, 161 : 8~13, 1995.
- 13) Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y., et al. : Binding of transforming protein, P 47 gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science*, 248 : 1537~1539, 1990.
- 14) Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., et al. : A novel signaling molecule, p 130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, 13 : 3748~3756, 1994.
- 15) Polte, T.R. and Hanks, S.K. : Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p 130 Cas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92 : 10678~10682, 1995.
- 16) Tachibana, K., Urano, T., Morimoto, C., et al. : Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate by focal adhesion kinase : a putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Cas and the recruitment of Src family protein kinases to Cas. *J. Biol. Chem.*, 272 : 29083~29090, 1997.
- 17) Ohashi, Y., Tachibana, K., Morimoto, C., et al. : T cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of Cas-L, a 105-kDa Crk-associated substrate-related protein, and its association of Crk and C 3 G. *J. Biol. Chem.*, 273 : 6446~6451, 1998.
- 18) Kamiguchi, K., Tachibana, K., Morimoto, C., et al. : Cas-L is required for β 1 integrin-mediated costimulation in human T cells. *J. Immuno.*, 163 : 563~568, 1999.
- 19) Ohashi, Y., Iwata, S., Kamiguchi, K., Morimoto, C. : Tyrosine phosphorylation of Cas-L is a critical element in T cell receptor- and β 1 integrin-induced T lymphocyte migration. *J. Immuno.*, 163 : 3727~3734, 1999.
-