

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 齋藤 卓
学位 位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 647 号
学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 RASAL3, a novel hematopoietic RasGAP protein, regulates the number and functions of NKT cells
(RASAL3 は血球系細胞に特異的に発現する新規の RasGAP であり、NKT 細胞の数と機能を制御する)

論文審査委員 主査 教授 片貝 智哉
副査 教授 藤井 雅寛
副査 教授 小松 雅明

博士論文の要旨

《背景と目的》Ras 蛋白は発生、細胞増殖、細胞分化および活性化に関与するシグナル伝達分子である。Ras 蛋白は活性化型 (Ras-GTP) から不活性化型 (Ras-GDP) に瞬時に変換され、シグナル伝達における分子スイッチとして機能する。細胞外からのシグナルに応答し、Ras-GDP はグアニンヌクレオチド交換因子により Ras-GTP へ変換され、シグナルを下流へ伝える。その後、Ras-GTP は RasGAP (Ras GTPase activating protein) によって、Ras-GDP に変換される。従って、RasGAP による Ras 機能の抑制的制御は組織および個体の恒常性の維持において重要であり、Ras 経路の過剰な活性化は細胞の分化異常あるいは過剰増殖をもたらす、癌を含む様々な病態に関与する。これまでに 14 個の RasGAP が同定されているが、血球系細胞において特異的に機能する RasGAP は同定されていない。申請者は、血球系特異的に発現する新規の RasGAP として RASAL3 を同定した。RASAL3 のノックアウトマウスを作製し、RASAL3 の機能について明らかにした。

《方法》・マウスの臓器、組織およびリンパ球から mRNA を調製し、RASAL3 mRNA 量をリアルタイム PCR により定量した。

・ヒトリンパ球細胞株から細胞抽出液を調製し、RASAL3 蛋白の発現量をウェスタンブロット法により解析した。

・293T 細胞に RASAL3 発現ベクター (FLAG-RASAL3) を導入し、免疫蛍光染色により RASAL3 蛋白の細胞内局在を調べた。

・RASAL3 ノックダウン細胞および親株の Ras-GTP 量を定量し、RASAL3 の RasGAP 活性を調べた。

・マウスを α -GalCer で処理し、血清中のサイトカイン (IL-4, IFN- γ) 量を ELISA により定量した。

・マウスを α -GalCer で処理し、NKT 細胞中のサイトカイン (IL-4, IFN- γ) 量を細胞内染色により定量した。

・マウスの肝臓から調整した NKT 細胞を α -GalCer で処理し、NKT 細胞中で発現するリン酸化 Erk 量を細胞内染色により定量した。

《結果》マウスにおいて RASAL3 mRNA はリンパ系器官である胸腺、脾臓および血液において特異的に高発現を示した。マウスの脾臓と肝臓から精製した T 細胞および NKT 細胞においても RASAL3 mRNA は高発現していた。また、13 種類のヒトリンパ球系細胞株は全て RASAL3 蛋白を発現していた。

ヒト B 細胞株 Raji を用いて RASAL3 のノックダウン細胞を作製した。RASAL3 ノックダウン細胞は野生型細胞よりも Ras-GTP 量が増加しており、RASAL3 はヒトの B 細胞株において RasGAP 活性を有することが示された。

全身で RASAL3 を欠損したマウス (RASAL3-KO マウス) を樹立した。RASAL3-KO マウスの血球系細胞数をフローサイトメトリーにより解析したところ、3 種類の血球系細胞で異常が観察された。それらは、肝臓特異的な NKT 細胞の減少、肝臓の B 細胞の増加および骨髄の顆粒球の増加だった。これらの中で最も顕著だったのは、NKT 細胞の減少であった。肝臓特異的な NKT 細胞数の減少機構を解明することを目的として、胸腺での NKT 細胞の分化を、NKT 細胞の分化マーカーである CD44 と NK1.1 を用いて調べたが、RASAL3-KO マウスに顕著な異常は観察されなかった。また、胸腺から肝臓への NKT 細胞の移行に関与する CXCR6 と LFA-1 の発現にも RASAL3-KO と野生型マウスとの間に違いは観察されなかった。

α -GalCer は NKT 細胞の T 細胞受容体を特異的に活性化し、サイトカイン産生を誘導する。RASAL3-KO マウスに α -GalCer を投与したところ、NKT 細胞より産生されるサイトカイン (IL-4, IFN- γ) 量が血清中および肝臓の NKT 細胞中で低下していた。更に、RASAL3-KO マウスでは、NKT 細胞依存性に α -GalCer によって誘導される急性の肝障害が軽減した。

RASAL3-KO マウスの肝臓から調製した NKT 細胞を α -GalCer により活性化したところ、リン酸化 Erk の発現量が野生型 NKT 細胞よりも増加していた。Erk のリン酸化は Ras の活性化により誘導されることから、RASAL3 欠損 NKT 細胞では Ras 経路の活性化が亢進することが示された。

《結語》申請者は、血球系細胞特異的に発現している新規 RasGAP として、RASAL3 を同定した。RASAL3 を B 細胞株においてノックダウンすると、Ras-GTP 量が増加した。従って、RASAL3 は B 細胞において主たる RasGAP として機能することが示された。RASAL3-KO マウスの解析から、RASAL3 が肝臓の NKT の細胞数の維持と機能において重要な役割を果たすことが明らかになった。RASAL3 ノックアウトマウスにおいては、 α -GalCer 投与によって発症する急性の肝障害が軽減した。この肝障害は NKT 細胞に依存することから、NKT 細胞数の低下と機能不全が発症の軽減に関与することが示唆された。

申請者は、RASAL3 が NKT 細胞の機能において重要な役割を果たすことを明らかにしたが、RASAL3 は NKT 細胞以外の血球系細胞にも発現することから、RASAL3 は他の血球系細胞においても重要な機能を有する可能性を持つ。

審査結果の要旨

本論文は、RasGAP タンパク質の一種である RASAL3 がマウスのリンパ器官および血球系細胞に高発現することを発見した。また、ヒト B 細胞株において RASAL3 のノックダウンすることにより Ras-GTP 量が増加することを確認し、実際に RasGAP 活性を有することを示した。

RASAL3 欠損マウスを作成したところ、肝臓特異的に NKT 細胞が著減していたが、胸腺から肝臓への NKT 細胞の移行に関与する分子の発現には異常は観察されなかった。

RASAL3 欠損マウスに NKT 細胞を活性化する α -GalCer を投与すると、野生型に比べ NKT 細胞の IL-4, IFN- γ 産生量が低下するとともに、NKT 細胞依存的に誘導される急性肝障害が軽減した。RASAL3 欠損肝臓 NKT 細胞は α -GalCer 刺激により、リン酸化 Erk が増加することから、Ras 経路の活性化が亢進していることが示

唆された。

以上の結果は、RASAL3 が NKT 細胞の機能に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、他の血球系細胞においても重要な機能を有する可能性も示唆することから、免疫学的にも重要な成果であり学位論文として十分に価値のあるものであると判断する。