

論文の内容の要旨

論文題目 サイトカインシグナリングにおける CD45 の機能解析

氏 名 佐 々 木 純 子

タンパク質のリン酸化および脱リン酸化反応は、細胞内シグナル伝達において中心的な役割を果たしており、この両反応における新たな基質の同定およびそれらのシグナル伝達における生理機能の解明は、細胞や個体の生理応答あるいは病態の成立機構を分子レベルで理解することにつながる。

CD45 は赤血球と血小板以外の血球系細胞とそれらの前駆細胞に発現している膜貫通型タンパク質チロシンホスファターゼ (PTPase) である。CD45 の基質としては、Src ファミリーのタンパク質チロシンキナーゼ (Src PTK) が同定されている。Src PTK には活性化または不活性化に関与する 2 カ所のチロシン残基が存在するが、CD45 は両者を脱リン酸化することが可能で、細胞や刺激の種類に応じてどちらか一方または両方を脱リン酸化する。CD45 欠損細胞やマウスの解析により、この PTPase は、リンパ球の成熟や抗原受容体からのシグナル伝達を制御する重要な分子であることが明らかとなっている。この他にも CD45 の関与が示唆される細胞応答や CD45 のノックアウトマウスの表現型には、Src PTK の制御だけでは説明できないものもあり、CD45 は Src PTK のみならず、他の分子も

をも脱リン酸化制御することが推察された。そこで本研究では、CD45 の新規標的分子を探索し、その生理的意義について検討した。

新たな基質同定への足がかりとして、CD45 ノックアウトマウス骨髄由来マスト細胞 (BMBC) を利用した。この細胞は IL-3 依存的に増殖するが、*cd45*^{-/-} BMBC では増殖が亢進していた。IL-3 受容体の下流では、JAK/STAT 経路や PI3K/Akt 経路、ERK 経路のシグナリング分子がリン酸化 (活性化) される。このうち、WT BMBC と比較して *cd45*^{-/-} BMBC においてリン酸化が亢進していたのは、JAK/STAT 分子のみであった (図 1)。これと符号して *cd45*^{-/-} BMBC では、IL-3 誘導性の JAK2 キナーゼ活性の上昇、STAT3 の DNA 結合活性の促進、STAT によって発現誘導される *cyclin D1 mRNA* の発現上昇が確認された。以上の結果より、CD45 は JAK/STAT 経路を負に調節することが示唆された。

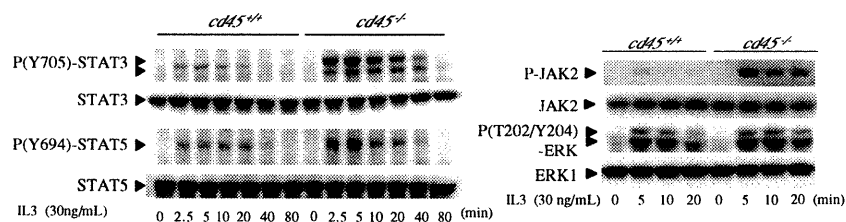


図1 IL-3刺激によるマスト細胞内シグナル分子の活性化。

BMBCをIL-3 (30 ng/ml) にて種々の時間刺激した。リン酸化STAT3、STAT5およびERKは、リン酸化部位特異的抗STAT3抗体 (Tyr705)、抗STAT5抗体 (Tyr694)、抗ERK抗体 (Thr202/Tyr204) にて検出した。JAK2のリン酸化は、cell lysatesから抗JAK2抗体により免疫沈降した沈降物を、抗リン酸化チロシン抗体で検出した。

cd45^{-/-} BMBC で認められた JAK/STAT 経路の活性化亢進と、CD45 による Src PTK 活性制御の関連を解析するために、Src PTK の阻害剤である PP2 を用いた。IL-3 刺激によって誘導される Lyn (BMBC で発現の高い Src PTK) のキナーゼ活性は、両 genotype ともに PP2 存在下ではほぼ 100% 阻害されたのに対し、JAK2 のキナーゼ活性や JAK1、JAK2、STAT3 のチロシンリン酸化レベルは全く影響を受けなかった。その上 PP2 存在下でも、JAK/STAT 分子のチロシンリン酸化レベルは *cd45*^{-/-} BMBC の方が亢進していた。従って、*cd45*^{-/-} BMBC における JAK/STAT 経路の活性化亢進は、CD45 による Src PTK 制御とは独立した事象であると考えられた。

次に考えられる可能性は、CD45 による JAK もしくは STAT の直接の脱リン酸化である。そこで *in vitro* の CD45 PTPase アッセイを行ったところ、CD45 は JAK ファミリー分子を直接脱リン酸化した (図 2)。さらに、CD45 の trap-mutant (PTPase-dead) とリン酸化 JAK2 は *in vitro* において直接結合した。一方、リン酸化 STAT3 は全く脱リン酸化されなかった (図 2)。CD45 によって脱リン酸化された JAK2 のキナーゼ活性は有意に低下した

こと、および JAK ファミリー間で相同性が高い kinase activation loop のチロシン残基 (JAK2 の Y1007/Y1008、JAK1 の Y1022/Y1023) の脱リン酸化が確認されたことから、少なくとも CD45 は JAK の活性調節部位の脱リン酸化を媒介し、JAK キナーゼ活性低下を導くと考察される。

CD45 欠損マウスから単離した胸腺細胞や

B 細胞およびマクロファージを、IFN- α や IL-4 で刺激すると、JAK ファミリー分子の高いリン酸化レベルが確認された。また、ヒト T 細胞株である Jurkat 細胞においても、IFN- α 刺激による JAK1 のリン酸化が CD45 の PTPase 活性依存的に変化した。以上より、BMMC のみならず様々な細胞における種々のサイトカイン応答においても、CD45 による JAK/STAT 経路の制御が確認された。

サイトカインによって誘導される JAK/STAT シグナル伝達系の活性化は、増殖、分化、生存、病原体に対する抵抗性といった広範囲にわたる生理応答において重要である。本研究から、JAK は CD45 の制御を受けることが明らかになったので、それらの生理応答に CD45 が関与することが推察された。

CD45 欠損 BMMC では、IL-3 や stem cell factor による増殖が亢進し、骨髓細胞ではエリスロポエチンや IL-3 依存的な血液系細胞への分化が、CD45 欠損細胞で増大していた。

IFN- α は JAK/STAT 経路を介してウイルス感染の感受性を制御しており、picomavirus である Coxsackievirus B3 (CVB3) の感染を抑制する。そこで CVB3 感染への CD45 の関与を解析した。まず種々の Jurkat 細胞株を用いた *in vitro* の感染実験では、図 3 に示すように、CD45 が発現している細胞 (WT および

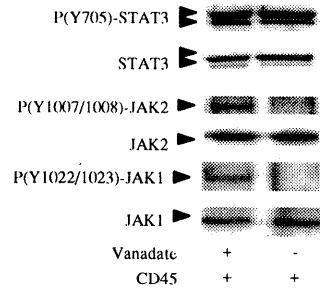


図2 CD45 による JAK ファミリーキナーゼの脱リン酸化
CD45 の PTPase アッセイ。JAK や STAT の免疫沈降物と CD45 の細胞内ドメインのリコンビナントタンパク質を vanadate 存在下または非存在下で反応させた。活性は、各々の基質のリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロットングで検出した。

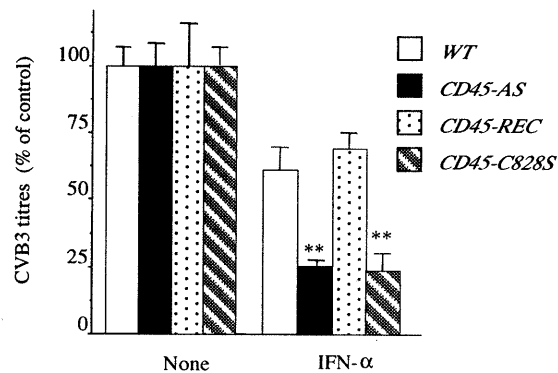


図3 CD45欠損による抗ウイルス活性の上昇

Jurkat細胞親株 (WT)、CD45欠損Jurkat細胞 (CD45-AS)、wild type CD45をCD45-ASに戻したJurkat細胞 (CD45-REC)、PTPase-dead CD45をCD45-ASに戻したJurkat細胞 (CD45-C828S)を未処理 (none) またはIFN- α 処理した (IFN- α)後に CVB3を添加し、各種細胞に感染したCVB3の力価をHeLa細胞を用いたブラック形成能で検出した。**; $p < 0.01$ vs WT。

CD45-REC) では、IFN- α は約 25%の CVB3 増幅抑制活性を示したのに対し、CD45 の発現が欠損した細胞 (CD45-AS) や PTPase-dead CD45 のみを発現した細胞 (CD45-C828S) では、この活性は約 75%にまで有意に増強した。さらに、Jurkat 細胞で得られた *in vitro* での知見が、マウス個体における CVB3 感染時の病体改善効果として観察されるかどうか検討した。コントロールの *cd45*^{+/+}マウスにおいて、接種 7 日後には脳脊髄炎、膵炎、心筋炎、肝炎により約 50%のマウスが死亡する用量の CVB3 を接種したところ、*cd45*^{-/-}マウスでは全例生存しており (図 4)、急性 (7 日後) や慢性 (28 日後) の炎症も認めなかった。以上の結果より、CD45 は IFN の抗ウイルス活性を負に制御しており、CD45 の欠損はマウス個体レベルにおいても CVB3 感染への抵抗性を賦与した。よって CD45 による JAK/STAT 経路の制御は、マウス個体レベルにおいても重要な機能を有すると考えられる。

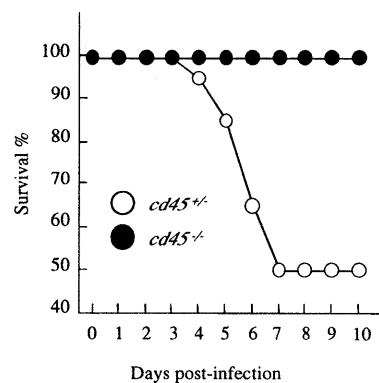


図4 CVB3感染後のマウスの生存曲線

これまで CD45 は、Src PTK 活性制御を媒介して、リンパ球の抗原受容体刺激を調節することが知られていたが、本研究により、CD45 の新規機能、すなわち『JAK ファミリーキナーゼの脱リン酸化を介して、サイトカインシグナルを負に調節する』ことが明らかになった。この作用は、CD45 による Src PTK の制御とは独立した事象である。また JAK/STAT 経路は細胞の増殖、分化、生存、感染への抵抗、癌化といった様々な細胞機能に関与することが知られているが、CD45 が JAK/STAT 経路の活性化を促進して BMMC の増殖、骨髄細胞から血球細胞への分化、Jurkat 細胞や CD45 欠損マウスの CVB3 感染に対する抵抗性に関与していることを見いだした。ヒトの急性リンパ性白血病患者の 10%以上で、ホジキンリンパ腫ではほとんどの患者で CD45 の発現が欠損していること、また CD45 に遺伝的変異が認められるヒトが B リンパ腫で死亡したことが報告されている。マウスにおいても、癌が誘発しない程度に活性型 Lck を発現したトランスジェニックマウスを *cd45*^{-/-}にすると胸腺腫になることが報告されている。今回発見した CD45 の新たな機能は、病気のメカニズム解明の一助になる重要な知見を得たものと確信している。