

論文の内容の要旨

論文題名 免疫担当細胞及び前駆細胞の機能制御と Lnk ファミリーアダプタータンパク質群

指導教官 高津 聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 久保 千代美

【序】

免疫担当細胞は主に骨髄で造血前駆細胞から分化し様々な段階を経て成熟し機能を発揮する。免疫担当細胞の分化・増殖・機能は抗原受容体やサイトカイン受容体ファミリー等のシグナルによって調節され、免疫担当細胞の反応性の制御に関わるシグナルの増幅や異なったシグナル間の仲立ちにおける細胞内アダプター蛋白質群の重要性が注目されている。

Lnk ファミリーアダプター蛋白質群は Lnk、APS、SH2-B で構成される細胞内

アダプター蛋白質である。Lnk は骨髓造血前駆細胞と B 細胞で強く発現しており、Lnk の欠損によって c-kit シグナル依存性の B 前駆細胞の過剰産生、骨髓造血前駆細胞群の増加と造血能の亢進が見られる。APS は c-kit の基質となりうる分子としてクローニングされたが、insulin-R や BCR のシグナルに関わっていることが示唆されている。SH2-B は FcεRIγ鎖の ITAM モチーフに結合する分子として報告されたが、アクチン再構築に関わって GH-R を介した細胞運動性への関与が示唆されている。しかし、これらの Lnk ファミリーアダプター蛋白質群依存性制御の生理的意義及び作用機序についてはまだ不明な点が多い。

私は Lnk ファミリーアダプター蛋白質群による免疫担当細胞の機能調節機構を明らかにするために次の二点を検討した。Lnk、APS、SH2-B それぞれの単独欠損及び野生型マスト細胞株を樹立し、それらの細胞性反応を比較して Lnk ファミリーアダプター蛋白質群が c-kit 又は FcεRI シグナルを介してマスト細胞の機能に関与する可能性を検討した。Lnk 及び SH2-B の欠損はマスト細胞の分化及び機能に影響を与えなかった。一方、APS の欠損はマスト細胞の IL-3 及び c-kit 依存性の反応に影響を与えないものの FcεRI を介した脱顆粒反応の亢進を引き起こした。更に APS の欠損において FcεRI 架橋刺激後に誘導される様々な細胞内反応は正常であったが、定常状態でのアクチン重合量が減少していたため、APS はマスト細胞のアクチン細胞骨格再編成と FcεRI を介した脱顆粒の程度を調節していると考えられた。次に、脾臓 B 細胞と骨髓造血前駆細胞の遊走及び接着反応に対する *lnk* 欠損の影響を調べ、細胞運動における Lnk の役割について検討した。Lnk の欠損は脾臓 B 細胞のケモカインに対する遊走及び接着分子等へ

の接着を亢進させ、*in vivo* でも脾臓 B 細胞を血中から脾臓及び骨髄中へ早く移動させることが分かった。更に Lnk を欠損した骨髄造血幹細胞を多く含む Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺ (KSL) 細胞分画においても接着分子への接着増加が観察されたことから、Lnk は脾臓 B 細胞及び骨髄造血前駆細胞における接着分子依存性の運動を制御していることが示唆された。

【結果と考察】

① Lnk ファミリーアダプター蛋白質群による骨髄由来マスト細胞株の機能制御

Lnk、APS 及び SH2-B を単独欠損した骨髄由来マスト細胞株 (BMMCs) の細胞性反応を調べた。いずれの欠損マスト細胞株においても IL-3 及び c-kit のリガンドである SCF に対する反応は正常であった。*lnk* 及び *SH2-B* 欠損 BMMCs では FcεRI 架橋刺激後に誘導される反応は正常であったが、*APS* 欠損 BMMCs では FcεRI 依存性の脱顆粒が亢進していた。

Lnk は B 前駆細胞及び骨髄造血前駆細胞において c-kit シグナルを負に制御しているが、BMMCs での Lnk mRNA の発現は B 細胞や骨髄造血前駆細胞と比較して低いことから Lnk の単独欠損はマスト細胞の機能にほとんど障害を与えないものと思われる。APS は c-kit の基質になりうるものとしてクローニングされたが、BMMCs における APS の欠損は c-kit 依存性の刺激に正常に反応した。ところが、APS の欠損は FcεRI 依存性の脱顆粒を促進した。この *APS* 欠損 BMMCs

での脱顆粒亢進のメカニズムについて FcεRI 架橋刺激後に誘導されるカルシウムの流入、チロシンキナーゼの活性化等の細胞内反応を調べたが、*APS* 欠損と野生型 BMMCs との間で明らかな差は認められなかった。*APS* は考えられる既知のものとは違う機序で FcεRI 依存性脱顆粒を制御していると思われる。最近、Lnk ファミリーがアクチン細胞骨格再編成に関わっているとの知見が集まりつつあり、SH2-B では GH-R を介した細胞運動への関与が示唆されている。一方、RBL-2H3 マスト細胞株においてアクチン再構築とマスト細胞の FcεRI 依存性脱顆粒は負の相関関係にあることが報告されている。*APS* がアクチン細胞骨格再構築を調節することによって FcεRI を介した脱顆粒反応を制御している可能性について検討するため、アクチン重合化抑制剤 latrunculin による感作 BMMCs のアクチン再構築の抑制と FcεRI 依存性脱顆粒への影響を調べた。野生型 BMMCs では latrunculin 処理によって F-actin 量の減少と脱顆粒の増大が認められた。*APS* 欠損 BMMCs では定常状態から F-actin 量が減少しており、この細胞を latrunculin で処理すると、未処理時に観察された F-actin 量の減少に加えて FcεRI 依存性の脱顆粒の増大も認められなかった。*APS* 欠損 BMMCs においてアクチン重合量と FcεRI を介した脱顆粒がいずれも latrunculin に抵抗性を示したことから、*APS* の欠損は BMMCs のアクチン重合量を減少させることによって脱顆粒を促していると考えられる。SH2-B は FcεRIγ鎖の ITAM モチーフに結合する分子として同定されたが、*SH2-B* 欠損 BMMCs の FcεRI 依存性の反応は正常であったことから SH2-B の欠損はマスト細胞の機能に影響しないと思われる。

BMMCs における Lnk ファミリーアダプター蛋白質群の役割について検討し

た。Lnk 及び SH2-B はマスト細胞の分化及び機能に影響を与えなかったものの、APS は FcεRI を介した脱顆粒反応に関わっていることが分かった。APS はマスト細胞のアクチン細胞骨格制御を介して FcεRI 依存性の脱顆粒の調節に加担することが考えられる。

② 脾臓 B 細胞及び骨髓造血前駆細胞における Lnk 依存性細胞運動制御機構

Lnk を欠損した脾臓 B 細胞及び骨髓造血前駆細胞の細胞遊走及び細胞接着反応を調べた。*lnk* 欠損群のケモカインに対する遊走は脾臓 B 細胞では亢進が認められたものの、造血幹細胞を多く含む KSL 細胞分画では強い影響が見られなかった。フィブロネクチン又は VCAM-1 への接着は *lnk* 欠損脾臓 B 細胞及び骨髓 KSL 細胞分画のどちらも亢進していた。更に、*lnk* 欠損骨髓 KSL 細胞分画は未刺激の状態から非常に強く VCAM-1 に接着することも分かった。Lnk は脾臓 B 細胞及び骨髓造血前駆細胞の接着分子上での運動を調節していると考えられる。また、*lnk* 欠損による脾臓 B 細胞と骨髓造血前駆細胞の運動性への影響は程度の差はあるものの非常に似ていることから、両者には類似した *lnk* 制御機構が働いていると思われる。

脾臓 B 細胞の *in vivo* homing 試験において、*lnk* 欠損脾臓 B 細胞は脾臓及び骨髓中に早く移動することが観察された。この結果は脾臓 B 細胞で認められた遊走及び接着反応亢進を反映していると推察される。細胞遊走及び接着を誘導するインテグリン及びケモカイン受容体シグナルは B 細胞、造血幹細胞及び前駆細胞のホーミング・生着・増殖にも重要であることから、Lnk は接着分子やケモカインに対する受容体を介したシグナルに関わって B 細胞や骨髓造血前駆細胞

の増殖及び機能を制御しているかもしれない。また、transwell migration assay の結果から *lnk* 欠損 KSL 細胞は VCAM-1 やその他骨髄内の細胞外基質等に捕捉されやすい可能性が推察された。骨髄造血幹細胞及び前駆細胞では *Lnk* の欠損によって骨髄再建能が亢進することが明らかになっているが、*lnk* 依存性シグナルの障害はこれらの細胞と骨髄細胞外基質等との相互作用を促進し、ニッチへの生着率やニッチでの細胞増殖に影響しているかもしれない。

脾臓 B 細胞及び骨髄造血前駆細胞の遊走及び接着反応における *Lnk* の役割について検討した。*Lnk* は脾臓 B 細胞のケモカインに対する遊走、接着分子等への接着、脾臓 B 細胞の生体内でのホーミングに関与していることが分かった。更に *Lnk* は骨髄造血幹細胞を多く含む KSL 細胞分画の接着分子への接着反応にも関わっていることが分かった。*Lnk* は脾臓 B 細胞及び骨髄造血前駆細胞における接着分子依存性の運動を制御していることが示唆された。

【展望】

Lnk ファミリーメンバーである APS がマスト細胞のアクチン細胞骨格再編成に関与し FcεRI 依存性脱顆粒反応を負に調節すること、*Lnk* が接着分子を介した脾臓 B 細胞及び骨髄造血前駆細胞の運動性を負に制御していることを明らかにした。本研究で得られた結果は、*Lnk* ファミリーアダプター蛋白質群が c-kit 反応性増殖に加えて細胞骨格及び細胞運動の制御への関与を示唆するものであり、免疫担当細胞の働きを制御するシグナル及び免疫応答の誘導におけるアダプター分子の重要性を示した例として更にアダプター分子の作用機構を理解する上

で意義深いと思われる。Lnk ファミリーは c-kit、増殖因子及び抗原受容体シグナルの制御及びインテグリンシグナルへの関与に加え、アクチン細胞骨格関連分子群の足場となって、細胞の分化・増殖・免疫応答・運動を調節していることが推察される。増殖因子による細胞の運動・増殖の促進において増殖因子受容体シグナルとインテグリンシグナルが協調的に作用していることが報告されているが、協調作用の分子機構には不明な点が多く残されている。Lnk ファミリーが免疫担当細胞及び骨髄造血前駆細胞の増殖・免疫応答・運動に関わるシグナル間の協力作用にどのように関わっているのかは非常に重要な研究課題である。この課題を解明することで、アダプター蛋白質の役割についての情報が更に加わるものと期待する。