

論文の内容の要旨

論文題名 造血細胞における抑制性制御分子 *Lnk* の作用機構と新規造血制御法の確立

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 15 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 滝澤 仁

【序】

造血幹細胞は自己複製を続けながら分化・増殖を繰り返し、毎日数千億もの血液細胞を産生する。各分化段階はそれぞれ異なるサイトカイン及び増殖因子により厳密に調節されている。細胞表面に発現する受容体にリガンドが結合することにより様々なシグナル伝達経路が活性化され、細胞の増殖・分化・細胞死などが制御される。近年、これらのシグナル伝達経路に関与する蛋白質が明らかにされ、その中でも分子内に酵素活性を持たないアダプター蛋白質と呼ばれる分子群に注目が集まりつつある。

アダプター蛋白質に関する研究は、免疫担当細胞における抗原受容体やサイトカイン受容体からのシグナル伝達経路において、それらの活性化や抑制に関わるアダプター蛋白質が数多く単離され、精力的に解析が進められている。私は、免疫担当細胞のみならず造血細胞で発現が見られる細胞内アダプター蛋白質 *Lnk* に注目し、造血制御における機能解析を行った。

Lnk の遺伝子欠損マウスでは B 細胞の過剰産生だけでなく、造血幹細胞数の顕著な増加及びその高い造血能が観察されている。*Lnk* 欠損マウスでは造血系腫瘍の誘発や造血細胞の機能障害は観察されていないことから、*Lnk* 阻害剤の開発及び造血幹細胞・前駆細胞の造血制御への応用を試みた。*Lnk* 欠損マウスは血小板増多傾向も示す。血小板産生における *Lnk* の作用点および血小板における *Lnk* の機能を解析し、それらの解析を通して *Lnk* による造血幹細胞の機能制御と共通のメカニズムを明らかにしようと試みた。

【方法と結果】

(1) Lnk の機能ドメインの同定

Lnk は N 末端にファミリーに相同性の高いプロリンに富んだ領域、PH ドメイン、SH2 ドメイン、C 末端にチロシンリン酸化部位をもつ。これらの部位にミスセンス変異または欠失変異を導入して種々の変異体を作製し、c-Kit 依存性増殖を示す肥満細胞株 MC9 細胞に遺伝子導入して増殖に与える影響を解析した。その結果、野生型 Lnk に見られる増殖抑制が SH2 ドメインのミスセンス変異より消失したことから、SH2 ドメインが c-Kit 依存性増殖抑制に必須の役割を担うことが明らかとなった。

(2) ドミナントネガティブ Lnk 変異体の作製とその作用機序

Lnk を過剰に発現し、c-Kit 依存性増殖をほとんど示さない MC9 細胞のトランスフェクタント (MC9-Lnk) に種々の Lnk 変異体を遺伝子導入し、増殖能の回復が見られるか検討した。SH2 ドメインのミスセンス変異群を遺伝子導入すると、MC9-Lnk の c-Kit 依存性増殖が促進されたことから、これらの変異体群は野生型 Lnk の機能を阻害するドミナントネガティブ変異体 (DN-Lnk) として機能しうることが示された。SH2 ドメインのミスセンス変異に N 末端領域の欠失を加えるとそのドミナントネガティブ効果が消失し、ドミナントネガティブ効果における N 末端領域の機能が推察された。

Lnk を強発現させた COS7 細胞の細胞溶解液を化学的架橋剤で処理すると Lnk の多量体が観察され、N 末端領域の欠失により多量体形成が消失することから、Lnk は N 末端領域を介して多量体を形成していることが明らかとなった。また免疫沈降法により、野生型 Lnk は野生型同士だけでなく Lnk 変異体とも多量体形成することが分かり、ドミナントネガティブ Lnk 変異体は N 末端領域を介して野生型 Lnk と多量体形成することにより野生型 Lnk の機能を競合阻害していることが推察された。

(3) Lnk 機能阻害による造血能の亢進とその作用機序

レトロウイルスを用いて DN-Lnk を野生型マウスの造血幹細胞・前駆細胞に感染導入し移植実験を行った。DN-Lnk の移植群はコントロール移植群に比べて高い造血能を示しことから、DN-Lnk は造血幹細胞・前駆細胞に内在性に発現する Lnk の機能を阻害できることが分かった。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入では導入細胞の悪性転換が懸念されている。そこで発現プラスミドベクターとエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。DN-Lnk を一過性発現させた骨髄細胞はコントロール細胞に比べ、致死量放射線を照射したマウスで高い造血能を示した。さらに骨髄非破壊的前処置を施した免疫不全マウスにも生着し、免疫細胞を効率良く再構築した。

DN-Lnk の一過性発現は造血幹細胞及び前駆細胞の移植後早期の生着能を促進すると考えられた。Transwell migration assay を用いて造血前駆細胞の骨髄へのホーミングに重要な役割を担う CXCL12 に対す

る遊走能を評価したところ、野生型に比べて *Lnk* 欠損造血前駆細胞の遊走能に有意な差は見られなかった。骨髄細胞または VCAM-1 の上での遊走は、野生型に比べ *Lnk* 欠損細胞で顕著な低下が見られた。*Lnk* 欠損造血前駆細胞では骨髄細胞に発現する VCAM-1 に対する接着が増強していると考えられる。

(4) 血小板産生制御における *Lnk* の作用点

コロニーアッセイにより *Lnk* 欠損マウス骨髄に存在する巨核球前駆細胞を解析したところ、その数が増加しているのみならず TPO の反応性亢進が観察された。また、*Lnk* 欠損マウスでは骨髄及び脾臓に存在する巨核球数の顕著な増加に加え、より多くの核数を持つ成熟骨髄巨核球の割合も増加していた。さらに、*Lnk* 欠損マウスでは血中 TPO 濃度が上昇しており、*Lnk* 欠損マウスの血小板増多は TPO 濃度の増加と TPO 反応性亢進に伴う成熟巨核球数の増加に起因することが推察された。

(5) 巨核球の TPO シグナルにおける *Lnk* の役割

TPO 存在下で骨髄細胞を培養することで得られる骨髄由来巨核球を用いて、*Lnk* により制御される TPO シグナル伝達経路の生化学的解析を行った。TPO 刺激依存性に誘導される Stat3、Stat5、Akt 及び p38 のリン酸化は両者の間で差が見られず、Erk1 及び Erk2 のリン酸化のみ *Lnk* 欠損巨核球で亢進していた。以前の報告では、Stat3、Stat5、Akt、Erk1 及び Erk2 すべての活性化が亢進しているとされていたが、本研究から TPO シグナル伝達経路における *Lnk* の作用点は Erk1 及び Erk2 の活性化に至る経路であることが明らかとなった。

(6) 血小板のインテグリンシグナルにおける *Lnk* の機能

インテグリン α IIb β 3 を介した刺激によりフィブリノーゲン上で伸展する *Lnk* 欠損血小板は野生型で見られるラメリポディアの形態ではなく、フィロポディア優位な形態を示した。この血小板溶解液を用いて生化学的解析を行ったところ、インテグリン α IIb β 3 の刺激依存性に *Lnk* は ADAP 及び Src と複合体を形成し、Fyn のインテグリン α IIb β 3 へのリクルート及び β 3 鎖のリン酸化を制御していることが分かった。血餅退縮実験では、*Lnk* 欠損血小板では血餅形成が障害され、ずり応力をかけた条件での血栓形成に関しても *Lnk* 欠損血小板において血栓の蓄積が障害されていた。血餅退縮障害及び血栓形成異常はインテグリン α IIb β 3 を介して惹起されるラメリポディアの形成異常に起因することが推察された。

【考察】

本研究において、私は細胞内アダプター蛋白質 Lnk の機能ドメインの同定と Lnk を阻害するドミナントネガティブ変異体の作製を行った。レトロウイルスを用いたドミナントネガティブ変異体の遺伝子導入は造血幹細胞・前駆細胞に内在性に発現する Lnk の機能を阻害し、造血能を亢進させることが明らかとなった。レトロウイルスを介した造血幹細胞・前駆細胞への遺伝子導入は造血系腫瘍の誘発が危惧されているので、発現プラスミドベクターを用いて造血幹細胞・前駆細胞での一過性遺伝子発現法を確立し、Lnk の一過性阻害の効果を検討した。Lnk の一過性機能阻害もまた移植細胞の生着能を増強することから、Lnk の阻害効果は造血幹細胞・前駆細胞の増殖だけでなく、移植後早期の生着も増強しているさせると考えられ、Lnk の一過性阻害は造血幹細胞の機能制御に向け副作用の危惧の少ない有用な方法と思われる。

Lnk 欠損マウスで見られる造血幹細胞・前駆細胞数の増加は TPO の欠損によりかなり軽減することが報告されている。また巨核球を用いた生化学解析の結果から Lnk は TPO シグナルを制御していることが明らかとなり、*Lnk* 欠損による TPO の反応性亢進が造血幹細胞・前駆細胞数の増加の一因と考えられた。

インテグリン β 1 を欠失する造血幹細胞において移植後の生着障害が報告され、造血幹細胞の骨髄 Niche への遊走・接着にインテグリンが重要な役割を担っていることが明らかとなっている。血小板の機能解析から Lnk はインテグリン α IIb β 3 を介した細胞骨格制御に関わること、また Transwell migration assay の結果から、Lnk が造血幹細胞・前駆細胞の細胞動態を制御する分子であることが分かった。これらを考え合わせると、Lnk は造血幹細胞のインテグリンを介した細胞骨格制御に関与し、造血幹細胞が適正な骨髄 Niche へ到達する機会を増やしているのかもしれない。

本研究で Lnk がサイトカインとインテグリンシグナルの双方で機能するアダプター蛋白質であることが明らかとなった。サイトカインとインテグリンシグナルの協調作用についてはほとんど分かっていないので、Lnk の機能解析を通してその詳細な作用機序を明らかにすることはアダプター蛋白質の新たな機能解明とともに造血幹細胞の新しい制御機構の解明につながるものとして期待される。