

審査の結果の要旨

氏名 滝澤 仁

本研究は細胞内アダプター蛋白質 Lnk の欠損マウスで観察される造血幹細胞数の顕著な増加及びその高い造血能に着目し、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ものである。さらに、血小板産生における Lnk の作用点説明および血小板における Lnk の機能解析を通して 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、下記の結果を得ている。

1. Lnk の各ドメインにミスセンス変異または欠失変異を導入した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示された。
2. 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、c-Kit 依存性増殖能の回復を見たところ、SH2 ドメインのミスセンス変異群は野生型 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阻害効果が消失し、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 細胞溶解液の架橋実験や免疫沈降法により、野生型 Lnk は N 末端領域を介して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 変異体は野生型 Lnk との多量体形成により野生型 Lnk の機能を競合阻害していることが推察された。

3. レトロウイルスを用いて DN-Lnk を発現させた造血幹細胞・前駆細胞の移植実験では、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示された。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

ため、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ところ、DN-Lnk の一過性発現もまた造血幹細胞・前駆細胞の造血能を増強することが明らかとなった。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することが示され、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、*Lnk* 欠損造血前駆細胞の骨髄細胞に発現する VCAM-1 に対する接着増強が示された。

4. *Lnk* 欠損マウス骨髄に存在する巨核球前駆細胞はその数のみならず TPO の反応性も亢進していた。また、*Lnk* 欠損により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 濃度上昇と 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. 骨髄より TPO により分化誘導した骨髄由来巨核球細胞を用いた生化学的解析から、*Lnk* は TPO により活性化される Erk に至る経路を抑制していることが示された。

6. インテグリン α IIb β 3 を介した刺激により伸展する *Lnk* 欠損血小板は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た生化学的解析からインテグリン 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。*Lnk* 欠損血小板では血餅形成だけでなく、ずり応力をかけた条件下の血栓形成が障害されていた。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と考えられた。

以上、本論文は細胞内アダプター蛋白質 *Lnk* の機能を阻害する変異体を同定し、造血幹細胞・前駆細胞の骨髄再建能を増強することを示した。また、*Lnk* がサイトカインシグナルの負の調節因子としてだけでなく、インテグリンシグナルの正の調節因子として機能していることを初めて明らかにした。本研究はこれまで未知に等しいサイトカインとインテグリンシグナルの相互ネットワークの解明とともに、造血幹細胞の新しい制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。