

論文の内容の要旨

論文題目

樹状細胞の分化・増殖における細胞内アダプター分子 Lnk/SH2B3 を介した新規制御機構

指導教員 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 岩崎 由希子

【序】

細胞内アダプター蛋白質群は、各種サイトカインシグナルの増幅・抑制やシグナル伝達系間のクロストークを担うといった重要な働きをしていることが知られている。Lnk/SH2B3 は、SH2-B や APS とアダプター蛋白質ファミリーを形成し、N 末端からプロリンに富んだ領域、PH 及び SH2 ドメインとチロシンリン酸化部位を持つ、分子量 68kDa の蛋白質である。その発現はリンパ系組織で強く、特に B 細胞や造血幹細胞で強く発現している。これまでに、Lnk が c-Kit 依存性に B 細胞前駆細胞の増殖を、また c-Mpl 依存性に造血幹細胞の増殖・維持を負に制御していることや、巨核球前駆細胞の TPO 依存性増殖・成熟を負に制御していることが報告されており、サイトカインシグナルを抑制的に制御する分子としての役割が明らかになりつつある。更に、巨核球からの血小板産生時には、Lnk がインテグリン $\alpha 4\beta 1$ 及びインテグリン $\alpha 4\beta 7$ のリガンドである VCAM-1 を介した細胞骨格系の制御と TPO 依存性シグナルの制御の双方に関与している報告がなされ、細胞骨格制御とサイトカイ

ンシグナル制御とを繋ぐ働きが示唆されている。

樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをするばかりでなく、免疫寛容を誘導する働きも持ち、生体内の免疫系のバランス調節において中心的な役割を果たしている。生体内での高い移動能や、様々な刺激に応じて樹状突起を伸ばすといった形態学的な多様性から、その分化過程や機能において、サイトカインシグナルを介した制御を受けるのみならず、細胞骨格を介した制御も受けているものと考えられる。これまで、樹状細胞における *Lnk* の発現の有無やその機能については検討されておらず、また、*Lnk* の作用機構としてサイトカイン制御と細胞骨格制御との関わりが示唆されていることを踏まえると、*Lnk* が樹状細胞においても何らかの機能を担っていることが十分に予想される。本研究では、*Lnk* の樹状細胞における働きを検討する為、*lnk* 欠損マウスを用いて解析を行った。

【方法と結果】

(1) *lnk* 欠損マウスリンパ組織内樹状細胞の変化

初めに、*Lnk* の発現を脾臓樹状細胞及び骨髄由来樹状細胞でウェスタンブロッティングにより確認した。脾臓・末梢リンパ節・胸腺・骨髄内に存在する樹状細胞数が *lnk* 欠損により増加しており、脾臓において辺縁帯付近に認められる樹状細胞の分布、MHC-II 分子や共刺激分子の発現割合及び *CD8 α* の発現の有無によって分類されるサブセットについては大きな変化を認めなかった。成熟度やサブセットに偏りなく総数が増加していることが分かったことから、生体内を循環している樹状細胞のリンパ組織への移動能の亢進によりこれらの変化が生じている可能性を検討する為、皮膚に FITC を刺激物質であるフタル酸ジブチル添加ないし非添加にて塗布し、FITC を提示した樹状細胞の各リンパ組織への移動能を調べた。炎症性の刺激を受け成熟した樹状細胞の所属リンパ節への移動及び未熟樹状細胞の内因性の胸腺への移動には明らかな差を認めなかったが、内因性の脾臓への移動には *lnk* 欠損マウスで亢進が認められた。従って、*lnk* 欠損による樹状細胞のリンパ組織への移動能に著明な変化はないものの、脾臓においては、*lnk* 欠損により樹状細胞のホーミングを促す変化が生じている可能性が考えられた。また、樹状細胞の寿命の制御との関与が報告されているアポトーシス抑制分子 *Bcl-2* の発現について野生型及び *lnk* 欠損マウスの脾臓樹状細胞で

検討したが、成熟と共に **Bcl-2** の発現が低下する傾向にも、成熟・未熟各段階における **Bcl-2** の発現割合についても、違いは認められなかった。

(2) *lnk* 欠損が樹状細胞の免疫学的応答に与える影響

樹状細胞は生体内で抗原提示細胞として重要な働きをしており、提示方法には **MHC-I** を介した細胞質内抗原の提示、**MHC-II** を介した細胞外抗原の提示、そして細胞外抗原を **MHC-I** による提示の経路に移行させるクロスプレゼンテーションの三つが存在する。クロスプレゼンテーションは樹状細胞に特徴的な機構であり、抗原の細胞質内での適切な動態制御が重要である。これまでの研究により、**Lnk** が細胞骨格の制御に関与していることが示唆されてきていることから、このクロスプレゼンテーションについて、**OVA** を抗原として用い、**OT-I** トランスジェニックマウスから精製した **CD8⁺T** 細胞が樹状細胞からの抗原提示により分裂することを指標として抗原提示能を評価したところ、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞のクロスプレゼンテーションによる抗原提示は野生型と同等であることが分かった。

樹状細胞は、外来抗原の種類に対応した **TLR** からのシグナルに応じて各種サイトカインを産生し、**T** 細胞の分化の方向性を決定づけている。最近、ハウスダスト抗原や粘膜上でアジュバント効果を持つコレラ毒素により、樹状細胞表面上に **c-Kit** 及び **SCF** の発現が起こり、それらの相互作用を介したシグナルにより **IL-6** の産生が誘導され、これが **IL-13** や **IL-17** といったサイトカイン産生を誘導することで、**T_H2** や **T_H17** 型の反応が促進されることが示された。**Lnk** は **B** 細胞分化において **c-Kit** シグナルを抑制的に制御していることが報告されていることから、樹状細胞においても **c-Kit** 依存性のシグナルを介して生じるサイトカイン産生を制御している可能性が考えられ、コレラ毒素刺激による骨髄由来樹状細胞からの **IL-6** 産生を測定したところ、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞からの産生量は野生型と同程度であった。また、ウイルス感染時に大量のインターフェロン α を産生し、免疫学的に非常に重要な **pDC** についても、骨髄から **Flt3L** により誘導した **pDC** を用い、**TLR9** 刺激によるインターフェロン α 産生を測定したが、*lnk* 欠損による変化は認められなかった。以上より、樹状細胞における全てのサイトカイン産生の経路・分子について比較検討してはいないものの、現時点で *lnk* 欠損が樹状細胞からのサイトカイン産生に及ぼす影響は認められていない。

(3) *lnk* 欠損マウスにおける樹状細胞増加のメカニズム

樹状細胞の生体内における移動能にも、また、アポトーシス抑制分子 *Bcl-2* の発現にも *lnk* 欠損による著明な変化が認められないにも関わらず、*lnk* 欠損マウスリンパ組織内で樹状細胞数が増加していることから、その増加が分化段階で生じているかについて検討を行った。近年マウス骨髄内で cDC 及び pDC の前駆細胞として同定された *Lin⁺IL-7R α ^c-Kit^{int}Flt3⁺M-CSFR⁺*細胞である CDP (common DC precursor) の数について検討したところ、*lnk* 欠損マウスで増加傾向が認められ、*lnk* 欠損マウスの骨髄では樹状細胞前駆細胞が増加傾向にあることが示された。

また、骨髄より GM-CSF や Flt3L を用いた樹状細胞の誘導時に増殖曲線をプロットしたところ、培養細胞中 6 割以上が CD11c 陽性となる培養 6、7 日目以降で、*lnk* 欠損による増殖亢進が顕著となることが分かった。そこで、骨髄由来樹状細胞の GM-CSF 反応性の増殖を、³Hチミジンの取り込みにより評価したところ、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞でより多くの取り込みを認め、分化後の GM-CSF 反応性増殖が亢進していることが明らかとなった。この機構を詳細に調べるため、GM-CSF レセプター下流のシグナル伝達物質である JAK2, STAT5, ERK1/2 のチロシンリン酸化について、ウェスタンブロッティングにより解析したところ、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞で亢進していることが示された。次に、樹状細胞を足場のない環境におくと、野生型ではこれらのシグナル伝達物質のリン酸化が減弱するのに対し、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞では維持されることが分かり、接着部位からの細胞骨格を介したシグナルが *Lnk* による GM-CSF シグナルに対する抑制性制御を負に制御していることが示唆された。

【考察】

リンパ組織における樹状細胞の恒常性は、血中からの樹状細胞前駆細胞の流入速度と、樹状細胞の分裂回数及びアポトーシスのバランスに依存している。本研究において、*lnk* 欠損マウスリンパ組織で認められた樹状細胞の増加は、樹状細胞前駆細胞からの分化過程及び分化後の増殖に関与するサイトカイン反応性の亢進によりもたらされているものと考えられた。また、樹状細胞において

接着部位からのシグナルが、Lnk による GM-CSF シグナル抑制性制御を抑える方向で関与していることがわかり、Lnk が樹状細胞においてもサイトカインシグナルの制御と細胞骨格制御を繋ぐ働きをしている可能性が示唆された。一方で樹状細胞における c-Kit シグナル依存性の IL-6 産生に野生型との差が見られないことや、これまで TPO や IL-3 のシグナル伝達においては報告されていない *lnk* 欠損による JAK2 の活性化を GM-CSF シグナル伝達において認めるなど、樹状細胞特異的な働きがあることがわかり、Lnk が細胞の種類に依存した作用を持つことが示唆された。

現段階では、Lnk が樹状細胞の免疫学的な機能に及ぼす影響は明らかではないが、今後更なる解析を加えていくことにより、免疫制御療法における効率的かつ効果的な樹状細胞の誘導といった臨床面での発展に繋がることが期待される。また、樹状細胞における Lnk によるサイトカインシグナル制御と細胞骨格制御の機構を詳細に解明していくことで、より普遍的な、サイトカインシグナルと細胞接着とのクロストークによる細胞機能制御の分子機構の解明に迫ることが出来ると考えられる。