

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 岩崎 由希子

本研究は細胞内アダプター分子 **Lnk/SH2B3** の樹状細胞における役割について着目したものである。**Lnk** は、**SH2-B** や **APS** と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** のタンパクである。リンパ系組織、特に **B** 細胞や造血幹細胞で強く発現し、**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が知られている。巨核球においては、**TPO** 依存性増殖・成熟を負に制御することに加え、血小板産生時には **Lnk** が **VCAM-1** を介した細胞骨格系の制御と **TPO** シグナルの制御の双方に関与していることが報告されており、細胞骨格制御とサイトカインシグナル制御を繋ぐ働きをしていることも示唆されている。これまで、樹状細胞における **Lnk** の発現やその機能については検討されておらず、末梢組織で抗原を捕捉し所属リンパ節に移動するといった高い移動能や種々の刺激により多様な形態変化を示す樹状細胞において、細胞骨格及びサイトカインシグナル制御を担う **Lnk** がそれらの機能の一端を担う可能性を考えた。そこで、*lnk* 欠損マウスを用い、*lnk* 欠損により脾臓・末梢リンパ節・胸腺・骨髄といったリンパ組織における樹状細胞の数やサブセット、並びに樹状細胞の抗原提示などの免疫学的機能、サイトカイン (**GM-CSF**, **Flt3L**) 反応性に及ぶ影響について検討を試み、下記の結果を得た。

1. **Lnk** タンパクの発現を脾臓樹状細胞並びに骨髄由来樹状細胞にて確認した。*lnk* 欠損マウスの脾臓・末梢リンパ節・胸腺・骨髄で樹状細胞数が増加していた。脾臓における樹状細胞の組織学的な分布及びサブセットの割合には *lnk* 欠損による変化はみられなかった。
2. *lnk* 欠損マウスリンパ組織における樹状細胞数の増加が、生体内での樹状細胞の移動能亢進に起因する可能性を検討した。炎症誘導条件下に **FITC** を皮膚に塗布し検討した樹状細胞の所属リンパ節への移動能には *lnk* 欠損による変化を認めなかった。炎症を誘導しない条件下での移動能を検討したところ、*lnk* 欠損マウスにおいて皮膚樹状細胞の脾臓へのホーミング能が亢進している可能性が示唆された。
3. *lnk* 欠損樹状細胞におけるアポトーシス遷延の可能性を検討した。アポトーシス抑制分子 **Bcl-2** は樹状細胞の寿命を規定するとの報告がある。成熟・未熟いずれの段階においても、*lnk* 欠損樹状細胞と野生型樹状細胞で **Bcl-2** の発現に差は認められなかった。
4. *lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞の抗原提示能について、細胞内での抗原処理過程でより細胞骨格の制御が重要と思われるクロスプレゼンテーションについて検討した。**OVA** を抗原とし、**OT-I TCR** トランスジェニックマウスより分離した **CD8⁺ T** 細胞に対する抗原提示能を、**T** 細胞の分裂回数を比較することで評価した。*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞のクロスプレゼンテーション能は、

野生型と同程度であった。

5. 骨髄由来樹状細胞をコレラ毒素で刺激すると、c-Kit 依存性に IL-6 が産生されるとの報告がある。同様の系で *lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞からの IL-6 の産生を検討した。*lnk* 欠損及び野生型骨髄由来樹状細胞から同程度の IL-6 産生を認め、Lnk によるサイトカインシグナル制御は、細胞種に依存する部分が多いことが示唆された。
6. *lnk* 欠損により樹状細胞の分化段階に細胞数の変化が生じているか否かを検討した。樹状細胞前駆細胞として報告された CDP(common dendritic cell precursor)は、*lnk* 欠損により有意差はないものの増加傾向にあった。cDC のより直接的な前駆細胞として報告された脾臓 pre-cDC 数についても検討したところ明らかな増幅は認めなかった。
7. 骨髄より GM-CSF ないし Flt3L で樹状細胞を誘導した場合、いずれにおいても *lnk* 欠損により多くの樹状細胞が分化してくることが明らかとなった。GM-CSF に対する反応性増殖が *lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞で亢進しており、GM-CSF 刺激依存性に生じる JAK2, STAT5, ERK1/2 のチロシンリン酸化が亢進していた。Lnk は樹状細胞において GM-CSF や Flt3L シグナルを負に制御していることが示された。
8. 骨髄由来樹状細胞を足場のない環境におくことにより、野生型では GM-CSF 刺激下での JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化が減弱するのに対し、*lnk* 欠損細胞ではこれらのリン酸化が維持されていた。接着を介したシグナルが Lnk による GM-CSF シグナルの抑制性制御を抑える方向に作用することが考えられ、樹状細胞においても Lnk がサイトカインシグナル制御と細胞骨格制御とを繋ぐ働きをしている可能性が示唆された。
9. ケモカインレセプター CCR9 を発現する未熟な pDC が免疫寛容を誘導することが報告された。この CCR9 陽性 pDC は、*lnk* 欠損マウスで野生型の 10 倍近くに増加していた。Lnk による樹状細胞分化・増殖の抑制性制御は、tolerogenic DC の分化・増殖により強く関与する可能性が示唆された。

以上、本論文により、免疫システムの恒常性維持に極めて重要と考えられる樹状細胞において、細胞内アダプター分子である Lnk/SH2B3 によるサイトカインシグナルの抑制を介した新たな樹状細胞産生制御機構の関与が示された。更に、その制御においては細胞骨格の制御も関わっている可能性が示唆された。現時点では樹状細胞の免疫学的機能に *lnk* 欠損による変化を認めないものの、tolerogenic な pDC の増加を顕著に認めており、近年、自己免疫疾患である I 型糖尿病や Celiac 病患者における SNPs 解析から、Lnk の PH ドメインの変異との関連が報告されていることを考え合わせると、樹状細胞における Lnk の働きと自己免疫疾患との関連性は、重要な検討課題であると考えられる。本研究は、Lnk による新たな樹状細胞の恒常性維持のメカニズムの存在を示し、tolerogenic な樹状細胞の誘導にも Lnk が抑制性に関与することを明らかにした。今後の更なる作用機構の解明により効率的・効果的な樹状細胞の誘導法確立といった臨床的貢献の可能性を示唆し、学位の授与に値するものと考えられる。