

論文の内容の要旨

論文題目 細胞内アダプターLnk/Sh2b3 発現制御による造血系・免疫系細胞の調節

指導教員 吉田 進昭 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 片山 緩子

【序】

免疫担当細胞を含む全ての造血系細胞は多分化能を持つ造血幹細胞 HSC から産生され、サイトカインやケモカイン、インテグリンなどを介した制御下に恒常性が維持される。これらの刺激は各レセプターを介して細胞内に伝達され、チロシンキナーゼなどの活性化カスケードの下流で機能変化や細胞分裂、細胞死を誘導することによって分化・増殖を司る。細胞内アダプタータンパク質群は自身では酵素活性を持たず、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ことによって恒常性維持制御に関わることが知られている。

Lnk/Sh2b3 は SH2-B および APS とアダプタータンパク質ファミリーを形成し、富プロリン領域、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 のタンパク質である。Lnk は主に造血系の細胞に発現し、その欠損マウスで HSC の増幅および造血能の亢進、また B リンパ球の増加などが観察されることから、造血前駆細胞の分化・増殖の負の制御因子であることが知られている。Lnk は前駆細胞においては SCF、TPO、EPO などのサイトカインシグナルを負に制御し、また巨核球や血小板においてはインテグリンシグナルにも関与することが報告され、サイトカインおよび接着分子の両方のシグナルに関与する事で造血系・免疫系の恒常性維持に加担する。さらに近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果から、ヒト LNK の SNP が I 型糖尿病やセリアック病など複数の免疫関連遺伝性疾患の risk variant であることが報告され、免疫系の維持・制御における Lnk の役

割が注目されている。

以上のように造血系・免疫系細胞の恒常性維持に機能する Lnk であるが、その発現変化や発現制御についての詳細な解析はプロモータ解析も含め行われていない。私は Lnk の発現制御を介した造血系・免疫系細胞の恒常性維持機構の解明を目的として、増殖中や分化段階における細胞での Lnk 発現をリアルタイムでモニターできる Lnk:GFP ノックインマウスを作出した。このマウスを用いた発現解析により性質の異なる複数の Lnk 発現制御システムを明らかにし、また発現解析結果に基づいて Lnk 欠損マウスの表現型を検討し、これまで報告のなかった末梢 T リンパ球における Lnk の機能を同定した。さらに Lnk 欠損マウスが腸絨毛の萎縮を自然発症することを発見し、獲得免疫系や粘膜組織における Lnk 発現を介した恒常性維持機構の重要性を示した。

【方法と結果】

(1) Lnk:GFP ノックインマウスの作出

生細胞における Lnk の発現変化を GFP 蛍光でモニターできるミュータントマウスを作出した。プロモータ領域を残したままマウス *lnk* 遺伝子座を GFP 遺伝子で置換するようなターゲティングベクターを作成し、これをマウス ES 細胞へ導入した。組換えが起こった ES クローンをマウス受精卵へインジェクションし、常法に従って Lnk:GFP ノックインマウス系統を樹立した。ヘテロ Lnk:GFP ノックインマウス (*Lnk^{+/GFP}*) における GFP 発現を定常状態における Lnk 発現と見なして Flow cytometry で解析を行った。

(2) 造血系・リンパ球細胞前駆細胞における Lnk/Sh2b3 の発現変化

骨髄の HSC を多く含む KSL 分画、未分化な前駆細胞を多く含む Lin⁻分画で、低くはあるが有意な Lnk:GFP の発現が観察され、これらの発現は骨髄抑制薬 5-FU 投与後の骨髄再構築中に強く抑制を受けることが示された。また B リンパ球の分化過程での Pro B、Pre B 段階での Lnk の発現は低く維持され、その後 B リンパ球の成熟と共に発現が増加する事が明らかになった。一方、末梢 T リンパ球でも有意な Lnk:GFP の発現が観察されたため、T リンパ球の分化段階における Lnk 発現についても解析を行ったが、胸腺中の DN2~DP において Lnk 発現の著しい抑制が観察され、T リンパ球においてもその初期分化過程において Lnk の発現が制御される事が明らかになった。一方、*in vitro* において、Anti-IgM あるいは Anti-CD3 刺激で増殖を誘導しても、B、T 両リンパ球における Lnk の発現量に変化は見られなかった。

(3) 成熟 B リンパ球における Lnk/Sh2b3 の発現変化

脾臓、鼠頸部リンパ節、腸間膜リンパ節など二次リンパ組織中の成熟 B リンパ球間で Lnk:GFP の

発現量に差は見られなかったが、骨髄や脾臓に存在する抗体産生細胞 plasma cell に分化した B リンパ球では Lnk の発現が低下していた。脾臓成熟 B リンパ球から Anti-CD40 と IL-5 刺激により plasma cell へ分化誘導した際の Lnk:GFP の発現を解析したが、*in vitro* で plasma cell へ分化した B リンパ球で Lnk の発現が低下し、細胞の分化シグナルにより Lnk 発現が抑制されうる事が明らかになった。

(4) 成熟 T リンパ球における Lnk/Sh2b3 の発現

Balb/c マウスに C57BL/6 マウスのリンパ球を移植して GVHD (graft-versus-host disease) を惹起すると、*in vivo* において激しく増殖する T リンパ球で Lnk:GFP の発現が強く抑制される事が明らかになった。しかし *in vitro* において炎症性サイトカインを添加したり、Balb/c の APC など T リンパ球を刺激しても Lnk:GFP の発現量の低下は見られなかったことから、何らかの生体内の環境因子が Lnk 抑制には必須である可能性が考えられた。一方、小腸 LPL や iEL など組織局在性の T リンパ球で Lnk:GFP 発現の有意な低下が観察された。レチノイン酸存在下に培養した T リンパ球での Lnk:GFP 発現を解析した結果、腸管指向性 T リンパ球への分化によって Lnk の発現低下が誘導される可能性が示された。

(5) Lnk 欠損が二次リンパ組織中の T リンパ球に与える影響

成熟 T リンパ球における Lnk の発現および発現変化が見られたことから、T リンパ球における Lnk の機能に着目して Lnk 欠損マウスの表現型を解析した。その結果、Lnk 欠損マウスの二次リンパ組織内で T リンパ球の絶対数が有意に増加している事が明らかになった。また CD8⁺ T リンパ球の CD44^{hi}CD62L⁺ 分画の顕著な増加が観察され、同時に IFN-g 産生性の CD8⁺ T リンパ球の有意な増加が認められた。

(6) Lnk 欠損マウスの腸管組織における表現型

Lnk の発現低下が認められた腸管粘膜固有層中 T リンパ球では、Lnk 欠損により T リンパ球中に占める CD8⁺ T リンパ球の割合の増加が見られ、IFN-g 産生性 CD8⁺ T リンパ球も増加傾向にあった。また、Lnk 欠損マウスが小腸に限局した腸絨毛の萎縮/変形を自然発症することを見いだした。粘膜組織局在性の T リンパ球においても Lnk が機能しており、その機能障害が腸管粘膜組織の異常に繋がらう事が示唆された。

【考察】

本研究における発現解析の結果から、Lnk は造血系細胞の前駆細胞から終末分化にわたって厳密な量的制御を受けており、末梢成熟リンパ球の恒常性維持にも重要な役割を果たす細胞内アダプタ

一分子である事が示された。細胞の分化段階依存的な発現低下と、生体内での活性化に伴う発現抑制という複数の Lnk 発現制御システムが存在し、造血誘導時の骨髄前駆細胞あるいは Pro B、Pre B においては Lnk の発現低下を介して SCF/TPO シグナル亢進が誘導され、骨髄再構築の進行や分化、増殖を促進する事が推察された。一方、成熟 B リンパ球では終末分化に連動した発現低下が、成熟 T リンパ球では非リンパ組織局在性に依存した Lnk 発現制御が示された。これらの情報を基に、Lnk 欠損マウスの二次リンパ組織内における CD44^{high}IFN-g 産生性 CD8⁺ T リンパ球の増幅を見出し、Lnk が IFN-g 産生性 CD8⁺ T リンパ球の増殖抑制に働くという、これまで明らかでなかった成熟 T リンパ球における機能を明らかにした。腸管粘膜組織内 T リンパ球における Lnk の発現低下を合わせて考えると、腸管組織への移動に伴って Lnk 発現低下を介した IFN-g 産生性 CD8⁺ T リンパ球の増殖が誘導され、腸管組織内での適切なサイトカインバランスが維持されるモデルが考えられた。

さらに、Lnk 欠損マウスは小腸に局限した絨毛萎縮を自然発症することを見出し、Lnk 機能障害とセリアック病を含む自己免疫性疾患発症との関連が示唆された。I 型糖尿病は活性化 T リンパ球による膵 b 細胞の破壊を特徴とする自己免疫疾患であり、セリアック病も小麦に含まれるグルテンに対する抗原特異的な免疫応答亢進によるアレルギー疾患で、IEL、LPL の増加と T リンパ球による絨毛組織破壊を特徴とする。I 型糖尿病、セリアック病に関する GWAS の結果報告された LNK の SNP は、全て同一の non-synonymous な点変異であり、ヒト LNK のリンパ球における機能に興味を持たれる。造血系・免疫系細胞、特に T リンパ球における Lnk の機能および発現制御システムの解明が、これら多因子疾患の発症病理解明や治療法開発に繋がるものと期待される。