

## 学位論文題名

## マウスリンパ組織における Fgr 発現とその関連分子の研究

## 学位論文内容の要旨

## I. 緒言

細胞内蛋白質のチロシン残基のリン酸化反応は、細胞の活性化及び増殖反応と腫瘍細胞における形質転換に関与している。非受容体型のプロテインチロシンキナーゼ(PTK)である *src-family* は、血液系及びリンパ系細胞に発現が高く、それらの細胞の活性化及び分化の制御に関与していることが示唆されている。

癌遺伝子 *v-fgr* は、最初に Gardner-Rasheed feline sarcoma virus より分離された。その後、これは *src-family* に属し、その遺伝子産物 Fgr は、PTK 活性を有することが判明した。その癌原遺伝子である *c-fgr* は、単球、マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー (NK) 細胞、及び Epstein-Barr virus 感染 B 細胞に発現されている。Fgr は免疫グロブリン G Fc 受容体 II 型 (FcγRII) と結合していることが、ヒトにおいて報告されている。しかし、マウスにおいては Fgr の機能、組織分布、会合分子など不明な点が多い。

本研究において、Fgr の発現及びその関連分子を解明するために、まずマウス Fgr に対するモノクロナール抗体 (mAb) 2H2 を作成した。この 2H2 を使用し、immune complex kinase assay、及び免疫組織化学的手法によって、種々の組織における Fgr 発現を検索した。さらに、免疫沈降法により Fgr と結合している分子を同定した。

## II. 材料と方法

抗マウス Fgr 抗体の作製：マウス *c-fgr* cDNA を合成するための適当なプライマーを使用して、RT-PCR 法にてマウス腹腔細胞から *c-fgr* cDNA を得、それを pMAL-c2 ベクターに組み込み、Fgr とマルトース結合蛋白との融合蛋白質を得た。それをマウスに免疫し、Fgr のユニーク領域を認識する単クローン抗体 2H2 (IgG1,κ) を作製した。

免疫沈降法：ラクトペルオキシダーゼ法により  $\text{Na}^{125}\text{I}$  で細胞表面標識し、1% NP-40 または 1% Brij96 を使用して可溶化し、その上清に各抗体とプロテイン A-セファロースビーズまたは、プロテイン G-アガロースビーズを反応させた後、SDS-PAGE を行った。

in vitro kinase assay：非標識下の細胞より免疫沈降を行い、洗浄後のビーズにキナーゼ用緩衝液と  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を加えて反応させ、SDS-PAGE を行った。

ペプチドマッピング：in vitro kinase assay 後のゲルより目的の部分を切り出し、50mM 炭酸アンモニウム中でホモジェナイズし、V8 プロテアーゼを反応させ、SDS-PAGE を行った。

免疫組織化学染色：各組織を凍結し、厚さ  $5\mu\text{m}$  で薄切後、冷アセトンで固定した。その後ビオチン化 2H2 抗体を反応させ、さらにアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体と反応させ、DAB で発色させた。

## III. 結果

造血系及びリンパ系組織におけるFgr発現：マウスの造血系およびリンパ系組織由来の細胞溶解液において、2H2を使用して*in vitro* キナーゼ反応を行うと、Fgrはリンパ節に最も高く、脾臓が次に高く、胸腺や末梢血にもわずかながら発現が認められた。しかし、この方法によっては、骨髄にはFgr発現は認められなかった。またリンパ節よりMac-1陽性細胞を調整し、2H2mAbを用いて免疫染色を行ったところ、Mac-1陽性細胞にFgrの発現が認められた。

マウスリンパ組織におけるFgr発現の免疫組織化学的解析：脾臓においては白脾髄周囲の辺縁帯に、リンパ節においては傍皮質領域と髄質に、陽性所見が得られた。

リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞におけるFgr発現：マウスLAK細胞で2H2 mAbを用いて*in vitro* キナーゼアッセイを行うと、胸腺と比較して非常に高い発現が認められた。

マウス腫瘍細胞におけるFgr発現：血液系及びリンパ系細胞由来の腫瘍細胞を使用して、2H2による*in vitro* キナーゼアッセイを行うと、マクロファージ/単球系以外の腫瘍細胞にもFgrの発現が認められる結果が得られた。

活性化細胞におけるFgr発現：B細胞及び腹腔細胞はLPSで、T細胞はPMA、カルシウムイオノフォア、及び抗Thy-1抗体を用いて刺激すると、いずれの細胞も刺激前にはFgrの発現は認められないが、刺激後はFgrの発現が認められるようになった。

マウスFgr分子と結合している細胞表面分子：マウスマクロファージ様細胞をNa<sup>125</sup>Iで表面標識し、その細胞溶解液を2H2mAbによって免疫沈降した。PU5-1.8細胞においては75kDa、J774.1細胞においては主要な75kDa、80kDaの他、幾つかのFgrとの会合蛋白質が認められた。

Ly6C分子に結合しているFgr分子：*in vitro* キナーゼアッセイによりLy6C分子との共沈物に、Fgrと同様の分子量のリン酸化蛋白質が認められたが、FcγRII分子にはヒトの場合と異なり、Fgrと考えられるキナーゼ活性を有する分子の共沈が認められなかった。さらに2H2と抗Ly6C抗体による免疫沈降物の1次元ペプチドマップパターンは一致した。従って、Ly6C分子と結合している分子は、2H2mAbによって認識される分子と一致、即ちFgrであることが判明した。また、正常リンパ節細胞を用いても同様の結果が得られた。

#### IV. 結論と考察

免疫組織化学、免疫複合体キナーゼアッセイなどにより、Fgrは主にマクロファージ系細胞、LAK細胞等に陽性であった。しかし、休止状態では発現が認められないT、B細胞などのリンパ系細胞でも活性化に伴いFgr発現が認められ、また腫瘍細胞においてもマクロファージ系列以外の由来の細胞にFgr発現が認められた。

Fgr分子と共沈する分子は、特に75kDaの分子がその主要な成分を成していた。今回用いたマウスのシステムでは、ヒトで報告されているFcγRIIとの結合は認められなかった。これは、アミノ末端のユニーク領域におけるアミノ酸配列が、ヒトとマウスで大きく異なることが一因と推定された。

また既存の表面分子とFgrの結合を検索する過程で、抗Ly6C抗体を用いた免疫複合体キナーゼアッセイによりLy6CがFgrと結合していることが判明した。この結果は、Ly6Cを介する細胞内シグナル伝達にFgrが関与する可能性を示唆する。Fgrは主に自然免疫を担当する細胞に多く発現するが、Fgrと結合する分子の検索は、前述のFgr発現部位・細胞のデータと共に、Fgrの役割、特に非特異的認識に関与する分子機構を知る上で、今後重要と考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則  
副 査 教 授 葛 卷 暹  
副 査 教 授 柿 沼 光 明

## 学 位 論 文 題 名

### マウスリンパ組織における Fgr 発現とその関連分子の研究

細胞内蛋白質のチロシン残基リン酸化は、細胞の活性化、増殖、形質転換などに、関与している。非受容体型のプロテインチロシンキナーゼ（以下PTK）であるsrc-familyは、造血系細胞に発現が高く、免疫系細胞のシグナル伝達に直接関与していることが、次々と判明している。src-familyに属し、PTK 活性を有するFgr は、ヒトでは単球、マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー細胞に発現しており、免疫グロブリンのFc $\gamma$  II型レセプターと結合していることが報告されているが、マウスにおいては、Fgr の機能、組織分布、会合分子など、ほとんど明らかにされていない。

本論文は、マウスFgr 分子のユニーク領域に対する単クローン抗体(2H2) を樹立し、Fgr 陽性組織、細胞を同定し、さらにFgr との会合分子を明らかにした。先ず、in vitroキナーゼ反応によって、Fgrはリンパ節、脾臓の順に強く発現するが、胸腺、末梢血では弱く、骨髄には認められないことが判明した。また、免疫組織化学的検索の結果、リンパ節では傍皮質、髄質、脾臓では辺縁帯のマクロファージが、特異的に2H2 陽性であった。従って、マクロファージの一部がFgr を発現すると考えられた。しかし、刺激後の活性化の状態では、マクロファージのFgr 発現は増強し、さらにT細胞、B細胞にもFgr の発現が新たに認められた。また、IL-2で誘導したLAK 細胞も、Fgr強陽性であった。さらに、一部の例外を除き、多くの造血系腫瘍細胞にもFgr の発現が認められた。したがって Fgrの発現は、レスティングの状態では単球、マクロファージ系細胞亜群に限定されるが、細胞が活性化、または形質転換した状態では、リンパ系細胞にも認められることが判明した。

次にFgr と会合している分子を明らかにするため、ヨードで細胞表面を標識し、細胞溶解後、2H2 抗体で免疫沈降したところ、分子量75kDa の蛋白を中心として、幾つかの分子が同定された。これらのFgr 会合分子の中に、ヒトで認められたFc $\gamma$  II型レセプターは認められなかった。このようにヒトとマウスでFgr との会合分子が異なるのは、Fgr のユニーク領域のアミノ酸配列が、種によって大きく異なることに起因すると考えられた。しかし、抗Ly6C抗体との共沈分子の中に、2H2 と反応する分子が同定され、これらはペプチドマップパターンの解析により、Fgrと同定された。

論文発表に際し、葛巻教授より、2H2 抗体の特異性、Fgr とLy6Cとの会合は腫瘍細胞で見ているが正常細胞でも認められるか、柿沼教授より、PIリンカー型細胞表面分子が、ミリスチン酸で結合している分子と結合する可能性、報告について、またその際のアダプター分子の関与についての御質問があったが、本人は的確に解答しえた。また、葛巻、柿沼両教授より個別に御審査いただき、合格と判定された。

以上、本論文はマウス Fgr 分子の発現、分布などの詳細を明らかにし、ヒトとマウスではFgr との会合分子が異なり、マウスFgr はLy6Cと会合することを始めて明らかにした。また、今回の研究により、T細胞におけるLck, Fyn, B細胞におけるLyn, Blk で明らかになったように、非特異免疫に関与すると考えられる、免疫系細胞の細胞内シグナル伝達に重要な分子の一つが、Fgr であることが判明した。従って本論文は、博士の学位に相当すると判定した。