

## 学位論文題名

マスト細胞の高親和性 IgE 受容体を介する  
シグナル伝達におけるチロシンホスファターゼ CD45 の機能

## 学位論文内容の要旨

## 【序論】

マスト細胞に発現する高親和性 IgE 受容体(FcεRI)は凝集すると detergent resistant membrane (DRM)と呼ばれる膜脂質マイクロドメインに移行しシグナルを伝達するが、この時 Src 型キナーゼ Lyn によって FcεRI はチロシンリン酸化される。しかし、この Lyn による FcεRI リン酸化機構の詳細は明らかではなく、現在 FcεRI に会合する Lyn または DRM に局在する Lyn による 2 つのリン酸化モデルが考えられている。一方、膜貫通型のチロシンホスファターゼ CD45 は T 細胞や B 細胞において、Src 型キナーゼの C 末端側にある制御チロシン残基を脱リン酸化し、キナーゼ活性を上昇させることが知られている。しかし、CD45 ノックアウトマウス由来のマスト細胞の解析から、CD45 は FcεRI のシグナル伝達に必須であると考えられるが、CD45 を欠損したマスト細胞の変異株において脱顆粒が認められるという報告もあり、FcεRI 凝集による CD45 の Lyn 活性化についての詳細は不明である。そこで、CD45 の発現量が異なるラット好塩基性白血病細胞(RBL)株を樹立し、これら株間での抗原刺激に対する細胞応答を比較して CD45 による Lyn 活性化について解析した。また、CD45 の DRM への局在を検討し、CD45 による Lyn 活性化の DRM 依存性を調べ、FcεRI 凝集に伴う Lyn の活性化から FcεRI のチロシンリン酸化に至る経路を明らかにすることを試みたので以下に報告する。

## 【結果・考察】

1. CD45 高発現株と低発現株の解析

FACS 解析の結果、マスト細胞の研究に有用な RBL-2H3 細胞の CD45 発現量は不均一であったため、CD45 発現量が異なる細胞株の樹立を目的として限界希釈法によるクローニングを行った。その結果、CD45 高発現株 (CD45H 株) および CD45 が CD45H 株の 1/100 だけ発現している CD45 低発現株 (CD45L 株) が得られ、これら細胞株の多価抗原刺激による細胞応答を比較し、CD45 の機能を解析した。

(1) 抗原刺激による脱顆粒反応

抗 DNP IgE 抗体を感作した細胞に種々の濃度の抗原(DNP-BSA)を添加し、脱顆粒の割合を求めた。その結果、1000 ng/ml の刺激では CD45L 株においても CD45H 株と同様に脱顆粒反応が認められたが、1 ng/ml という低濃度の抗原で刺激を行うと、FcεRI や Lyn が CD45H 株と同程度発現しているにもかかわらず CD45L 株では脱顆粒反応が認められなかった。したがって、CD45 は脱顆粒に至る FcεRI のシグナル伝達を促進していることが明らかになった。

(2) 抗原刺激による細胞内カルシウム動員反応

細胞にカルシウム蛍光指示薬である Fura-PE3 を負荷し、抗原刺激による細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。その結果、CD45H 株と CD45L 株で同程度の脱顆粒が認められた 100 ng/ml の抗原刺激においても CD45L 株で細胞内カルシウム動員反応が低下していた。また、

細胞外領域と細胞膜領域をモルモット FcγRIIB に置換した CD45 キメラ体を CD45L1 株に発現させたところ、細胞内カルシウム動員反応が回復し、CD45L 株の細胞応答の低下は CD45 の発現量によることが示された。しかし、ホスファターゼ活性を欠損したキメラ体を用いて、CD45L1 株にわずかに発現する CD45 の競合阻害を試みたが、細胞応答のさらなる低下は認められず、FcεRI のシグナル伝達に CD45 は必ずしも必要ではないことが示唆された。

### (3)抗原刺激による FcεRI のチロシンリン酸化

CD45 が Lyn の活性に関与していることが考えられたため、抗原刺激による FcεRI のチロシンリン酸化を調べた。その結果、CD45L 株では CD45H 株と比較して FcεRI のチロシンリン酸化が低下していた。したがって、CD45H 株と比較して CD45L 株では FcεRI 凝集による Lyn の活性が低いことや FcεRI のチロシンリン酸化に関与する Lyn が少ないことが考えられた。

### (4)抗原刺激による FcεRI と Lyn の会合

抗原刺激後 Lyn はリン酸化した FcεRI に動員されるが、この際 Lyn の制御チロシン残基が CD45 によって脱リン酸化されることが予想される。そこで、抗原刺激による Lyn の FcεRI への会合量の増加を調べた。その結果、CD45L 株では CD45H 株で認められた FcεRI 凝集による Lyn の FcεRI への動員がほとんど認められなかった。したがって、CD45L 株では、FcεRI のチロシンリン酸化が低下し、さらに CD45 によって Lyn の制御チロシン残基が脱リン酸化されないため Lyn の会合量が増加しないことが示唆された。

### (5)抗原刺激による FcεRI に付随しているチロシンキナーゼ活性

抗原で細胞を刺激すると、Lyn は SH2 領域を介してリン酸化した FcεRI に会合するが、この時 Lyn のキナーゼ活性が著しく上昇することから、FcεRI に付随しているチロシンキナーゼ活性を調べた。その結果、CD45H 株で見られた抗原刺激によるチロシンキナーゼ活性の上昇が CD45L 株では検出できなかった。したがって、FcεRI の凝集に伴うチロシンキナーゼ活性の亢進にも CD45 が必要で、CD45L 株では Lyn の FcεRI への会合量が低下し、さらに会合している Lyn が十分に活性化されないことが考えられた。また、FcεRI に付随するキナーゼ活性の上昇がシグナル伝達に必須でないことが示唆された。

## 2. CD45 の DRM (detergent resistant membrane) への局在

### (1)ショ糖密度勾配遠心法による DRM の分離

DRM は非イオン性の界面活性剤に不溶性でしかも低比重であることから、ショ糖密度勾配遠心で DRM の分離を行った。その結果、低密度側の DRM 画分に Lyn が認められたが、CD45 は DRM 画分に検出できず、CD45 が常に DRM の外に存在していることが示唆された。

### (2)共焦点レーザー顕微鏡による観察

共焦点レーザー顕微鏡を用いて形態学的に CD45 の局在を調べた結果、抗原で刺激すると凝集した FcεRI と DRM および Lyn の共局在が認められたが、CD45 は FcεRI と異なる分布を示した。したがって、CD45 は DRM の外に存在し、抗原刺激による Lyn の活性化は DRM の外で起こっていると考えられた。また、DRM に局在する Lyn ではなく FcεRI に会合している Lyn がシグナル伝達に重要であることが示唆された。

### **【まとめ】**

- (1) CD45 は FcεRI 凝集による脱顆粒に必ずしも必要ではないが、Lyn を活性化して FcεRI シグナル伝達を促進することを明らかにした。
- (2) CD45 が常に DRM 外に存在していることを明らかにし、CD45 の Lyn 活性化および FcεRI に会合している Lyn による FcεRI のチロシンリン酸化が DRM の外側で進行することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	長澤	滋治
副査	教授	五十嵐	靖之
副査	助教授	井ノ口	仁一
副査	講師	山下	俊之

学位論文題名

## マスト細胞の高親和性 IgE 受容体を介する シグナル伝達におけるチロシンホスファターゼ CD45 の機能

近年、アレルギー疾患が急増し、日本全人口の 1/5 以上が花粉症やアトピー性皮膚炎など何らかのアレルギー疾患を持つと言われ、その発症要因は環境問題、社会生活からのストレスや食生活などと多岐に渡ると考えられている。これらアレルギー疾患に対しては抗ヒスタミン剤やステロイド剤などの対症療法が主に施されているが、治療効果が十分でないことや副作用を伴うこともある。したがって、新たな作用機序をもつ新薬の開発が切望されているが、そのためにはアレルギーの発症機構を明らかにすることが不可欠である。

マスト細胞(肥満細胞)や好塩基球は IgE を高親和性に結合するレセプター(FcεRI)を発現する。IgE を結合した FcεRI が多価抗原によって凝集すると、一連の細胞内情報伝達機構が始動し、種々のアレルギー反応を惹起するメディエーターの遊離や合成など、多彩な細胞応答が引き起こされる。レセプター凝集後の最も初期に認められるのはレセプター自身のチロシンリン酸化である。このリン酸化はレセプターに会合する Src ファミリーキナーゼの Lyn によることが知られているが、レセプターの凝集によってどのような機構でレセプターがリン酸化されるのかについては不明な点が多く残されている。申請者はアレルギー反応の惹起に繋がる FcεRI を介するシグナル伝達機構の解明を目指し、Lyn の活性制御に関わる細胞膜上のチロシンホスファターゼである CD45 に着目して、その機能を明らかにすることを試みた。

申請者はマスト細胞のモデルとしてよく用いられるラット好塩基性白血病細胞を用い、CD45 を発現している細胞と欠損している変異細胞をクローニングして得て、

FcεRI 凝集刺激による細胞応答を比較した。その結果、CD45 欠損細胞でもレセプター凝集に伴う脱顆粒反応は認められるが、レセプターのチロシンリン酸化をはじめとした種々のシグナル伝達機能が低下していることが見出された。特に、CD45 欠損細胞ではレセプター凝集に伴うレセプターに会合する Lyn の活性が大きく減少していることが明らかとなった。CD45 は Lyn の活性を負に制御している制御チロシン残基を脱リン酸化することが知られているが、マスト細胞においてもこの機構によって Lyn が活性化されることが予想された。このように、申請者は CD45 は FcεRI を介するシグナル伝達に必須な分子ではないが、シグナル伝達の促進に関わっていることを示唆した。

最近、FcεRI は凝集すると細胞膜のマイクロドメイン(DRM)に移行することが明らかにされ、一部の Lyn が DRM に局在していることから、このドメインでレセプターのチロシンリン酸化が起こると推察されている。一方、レセプターのチロシンリン酸化はレセプターが DRM に移行する以前に会合している Lyn によってリン酸化されるモデルも提唱されている。申請者は CD45 の DRM への局在を DRM の分画や共焦点レーザー顕微鏡による観察で調べ、Lyn 活性化の局在性および DRM 依存性について検討した。その結果、CD45 は DRM から排除されており、レセプターの凝集後にも DRM に移行しないことを見出した。したがって FcεRI に会合した Lyn の活性化とレセプターのチロシンリン酸化は DRM の外で進行すると考えられ、レセプターのチロシンリン酸化は DRM 非依存的に起こることが強く示唆された。

上記の研究成果は、マスト細胞の FcεRI を介するシグナル伝達機構を明らかにする上で重要な知見であり、博士(薬学)の学位を受けるに値する業績と評価した。