

Review Article

造血幹細胞数および造血能を制御する抑制性アダプター蛋白質 Lnk

高木 智

東京大学医科学研究所感染・免疫大部門免疫調節分野

Lnk, a novel adaptor protein that negatively regulates expansion and hematopoietic ability of hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to variety of hematopoietic cells, and are responsible for blood production throughout adult life. Recent studies have demonstrated the potential of HSCs to produce various nonhematopoietic cells. Amplification of HSCs represents a potentially powerful approach not only to the treatment of various blood disorders but also to applying gene therapy or to regenerative medicine. Lnk is an adaptor protein consisting of PH, SH2 domains, and a C-terminal tyrosine phosphorylation site. Marked expansion of B-lineage cells occurs in *Lnk*^{-/-} mice, indicating Lnk regulates B cell production by negatively controlling growth signals through c-Kit in B cell precursors. Lnk is also expressed in hematopoietic progenitors, and the number and the hematopoietic ability of HSCs are significantly increased in the absence of Lnk. While augmented signaling through c-Kit partly contributed to the increased progenitor cells in *Lnk*^{-/-} mice, it is likely that there exist Lnk-dependent but c-Kit-independent signaling pathways whose absence leads to augmented ability of *Lnk*^{-/-} HSCs. These indicate that Lnk plays critical roles in the expansion and function of HSCs and provide useful clues for the amplification of HSCs and progenitor cells.

Rec.11/20/2002, pp12-17

Satoshi Takaki

Division of Immunology, Department of Microbiology and Immunology,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo**Key words** hematopoietic stem cell, adaptor protein, tyrosine kinase, c-Kit, signal transduction

造血幹細胞は、各種の血液細胞に分化できる多能性と多能性・未分化性を維持したまま分裂する自己複製能を兼ね備えた細胞であり、生体の生涯にわたり血液細胞を供給する。近年、造血幹細胞が血液細胞ばかりでなく非造血系細胞へも分化することが示され、各種造血系疾患の治療に加えてその遺伝子治療や再生医療への広い応用が期待されている。しかしながら造血幹細胞の自己複製や増殖機構については不明な点が多く、造血幹細胞の増幅・培養法の確立には至っていない。

LnkはPH (pleckstrin homology) ドメイン, SH2 (src-homology 2) ドメインとリン酸化部位を持つ細胞内アダプター蛋白質である。我々が作製した *Lnk* 欠損マウスではB細胞の過剰産生が観察され, Lnk が c-Kit チロシンキナーゼからのシグナル伝達を抑制することにより B 前駆細胞の増殖・分化を制御していることがわかった。さらに *Lnk*

欠損マウスでは造血幹細胞を含む骨髓前駆細胞群が増加し, 造血能が著しく亢進するなど, Lnk が造血幹細胞の増殖および造血能制御に深く関与することが明らかとなってきた。本稿では抑制性アダプター蛋白質 Lnk を介する免疫担当細胞, 造血幹細胞の新しい維持・制御機構について紹介したい。

Lnkおよびそのファミリー蛋白質

Lnkは, SH2ドメインとチロシンリン酸化部位を持つ細胞内アダプター蛋白質としてクローニングされたが¹⁾, その後さらにPHドメイン, 富プロリン領域も持つ68kDaの蛋白質であることが判明した^{2,3)}。Lnkは, SH2-B (別名 PSM; pro-rich, PH and SH2 domain containing putative signaling mediator) や APS (adaptor molecule containing PH and SH2 domains) と非常によく似た構造をとり, ショウ

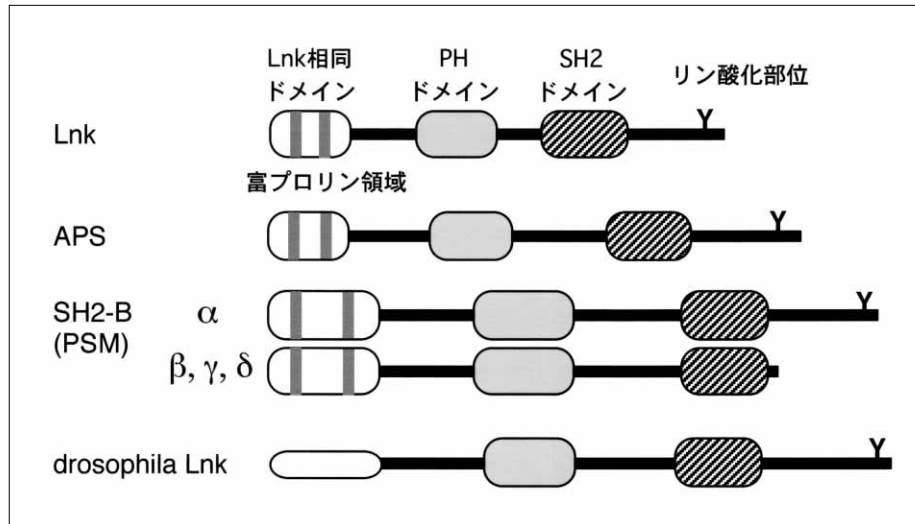


図1 Lnkおよびそのファミリーアダプター蛋白質の構造

互いに相同性を持ち富プロリン領域を含むN末端ドメインに続き, PH, SH2ドメイン, C末端に保存されたチロシンリン酸化部位を持つ. SH2-B (別名 PSM) には, スプライシングの違いにより SH2-B α と C末端リン酸化部位を欠く SH2-B β , γ , δ がある. これらはショウジョウバエから保存されているアダプター蛋白質ファミリーを形成する (drosophila Lnk での N末端ドメインの相同性は低い).

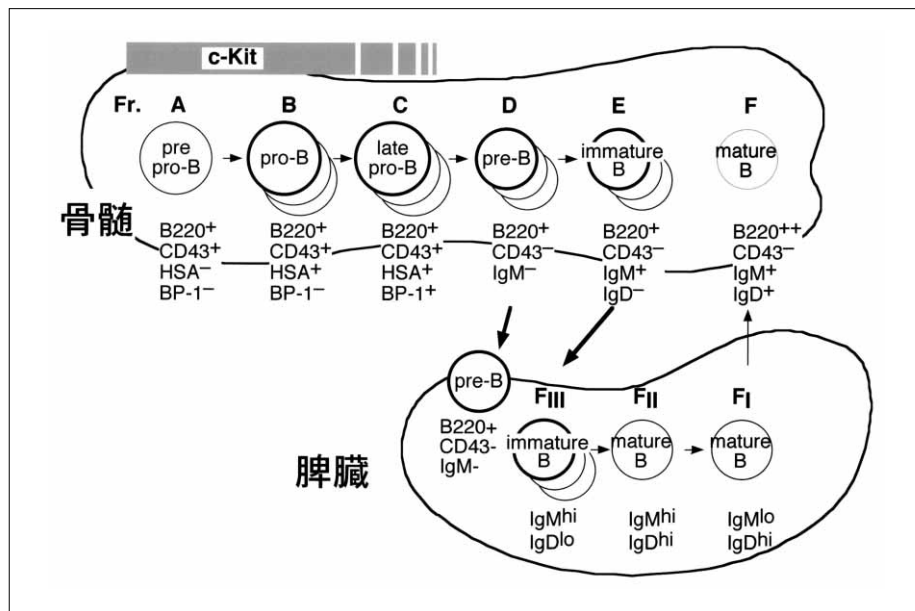


図2 *lnk* 欠損マウスにみられる B 細胞過剰産生

骨髓では proB 細胞の段階から顕著となる B 細胞系の増加が観察される. 脾臓では正常マウスでほとんどみられない preB 細胞が認められ, 比較的未熟な B 細胞が増加する.

ジョウバエから保存されているアダプター蛋白質ファミリーを形成する (図1).

SH2-Bは, $\text{Fc}\epsilon\text{R}\gamma$ 鎖の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) に結合する分子としてクローニングされ⁴⁾, JAK2 や Trk, PDGF (platelet-derived growth factor) -R (receptor), insulin-R, IGF-I (insulin-like growth factor-I) -R などに結合しリン酸化される⁵⁻⁷⁾. MAPK カスケードの活性化, チロシンキナーゼ活性の制御, アクチンの重合制御などへの関与が報告されているが⁷⁻¹⁰⁾, 詳細な生理作用についてはまだ不明な点が多い. 我々は太塚, 吉村らとともに SH2-B 欠損マウスを作製し, SH2-B が生殖器官の成熟に欠かせない分子であることを明らかにした¹¹⁾. APS は, c-Kit の基質の一つとしてクローニングされ¹²⁾, B 細胞受容体刺激や Trk, PDGF-R, JAK2, insulin-R によりリン酸化される¹²⁻¹⁶⁾. APS はリン酸化により c-Cbl

と結合し PDGF-R, JAK2 のシグナルを抑制することが示されている^{13, 14)}. 我々は APS 欠損マウスの作製にも成功しており, 現在その解析を進めている.

Lnk は, 脾臓, リンパ節, 骨髓などリンパ系組織で比較的強く発現し, 特に B 細胞で強く発現する¹⁷⁾. T 細胞受容体 (TCR) 架橋刺激によりリン酸化を受ける 38 kD の蛋白質として報告されたため TCR のシグナル伝達に働く分子として注目された¹⁾ (この 36-38 kDa のタンパク質は LAT; linker for activation of T cells であることが判明した¹⁸⁾). しかし, TCR 架橋刺激によるリン酸化について再現性が乏しいこと, また T 細胞よりも B 細胞で高く発現していることなどから, TCR 以外のシグナル伝達系で機能するアダプター蛋白質と考えられた¹⁷⁾. *lnk* 欠損マウスの解析から, Lnk が B 細胞産生量を調節し²⁾, 造血幹細胞および前駆細胞の増幅や造血能を制御していること¹⁹⁾, 血

血小板産生の制御に関わること²⁰⁾が明らかになってきた。

LnkによるB細胞産生制御

lnk 欠損マウスは正常に生まれ、T細胞分化および活性化に異常はみられなかった。ところが、脾臓では幼若なB細胞が増加しており、正常ではほとんどみられないpreB細胞が存在していた。さらに骨髄ではB前駆細胞群の顕著な増加が認められた(図2)。この増加はB前駆細胞の内因性異常に起因することが移植実験により確かめられた。また、放射線照射を施していないRAG欠損マウスに移入した場合、正常骨髄前駆細胞はほとんど生着できないが、*lnk*欠損前駆細胞は問題なく骨髄に生着してB細胞を産生した。*lnk*欠損骨髄前駆細胞ではc-KitのリガンドであるSCF(stem cell factor)に対する反応性が亢進しており、c-Kit依存性増殖シグナルの増強がB細胞過剰産生の一因と考えられた²⁾。そこで*lnk*欠損マウスをc-Kitの膜貫通部に欠失を持つWマウスと交配したところ、B細胞過剰産生は有意に軽減し、c-Kit依存性シグナルの増強がB細胞過剰産生の主因であることが*in vivo*でも確認された¹⁹⁾。c-Kitはさまざまな血液前駆細胞に発現しており、各種血球前駆細胞の増殖に重要である。*lnk*欠損マウスではB細胞系の選択的な増加が認められたが、これはLnkがB細胞系に強く発現しており¹⁷⁾、Lnkによるc-Kit依存性増殖シグナルの抑制がB前駆細胞でより強く働くためと考えられる。

Lnkによる造血幹細胞機能制御

*lnk*欠損によりSCF反応性が亢進すること、移入実験にて造血前駆細胞の骨髄への生着も亢進している可能性が考えられたことから、より未熟な造血前駆細胞での*lnk*欠損の影響を検討した¹⁹⁾。*lnk*は造血前駆細胞にも発現しており、*lnk*欠損マウスでは造血幹細胞を含む分化抗原陰性(Lin⁻)c-Kit⁺Sca-1⁺分画が増加し、CFU-Sを形成する多能性前駆細胞も顕著に増加していた(図3)。競合的骨髄再構築(competitive repopulation)法により造血幹細胞の造血能を評価した。Ly5.2⁺の*lnk*欠損および正常マウスより採取した造血前駆細胞をアロタイプが異なるLy5.1⁺マウスより採取した前駆細胞とともに致死量の放射線を照射したマウスに移植した。正常前駆細胞を5倍量のLy5.1⁺前駆細胞とともに移植すると造血系細胞の約1/6程度がLy5.2⁺となるのに対して、*lnk*欠損前駆細胞を用いた場合にはほとんどのB細胞がLy5.2⁺となり*lnk*欠損細胞から産生されることがわかった。さらにT細胞や骨髄球系細胞もそのほとんどが*lnk*欠損前駆細胞から産生され、*lnk*欠損により造血幹細胞の造血能が飛躍的に亢進することが明らかとなった(図4)。

Wマウスとの交配により造血前駆細胞の増加は有意に正常化し(図5)、造血前駆細胞の増加もc-Kit依存性シグナルの増強がその主因と考えられた。しかしながら、競合的骨髄再構築法で検出される造血能の亢進は*lnk*欠損W/+マウスでもほとんど軽減しなかった(図5)。造血能亢進には、Lnk依存性ではあるがc-Kitに依存しないシグナル伝達系の制御破綻も関与している可能性が強く示唆された。Lnk依存性制御系の破綻による幹細胞の自己複製および前駆細胞の増殖亢進、幹細胞のニッチへの依存性の低下(ニッチの相対的な拡大)、幹細胞の骨髄へのホーミングの亢進などが考えられ(図6)、今後の検討が必要である。

Lnkによるc-Kit依存性シグナル抑制の分子機構

Lnkによるc-Kit依存性増殖シグナルの制御機構についてはc-KitおよびIL-3Rを発現するマスト細胞株を用いて検討を行った¹⁹⁾。Lnkの強制発現によりマスト細胞株のSCFによる増殖が阻害される一方で、IL-3による増殖は影響を受けず、Lnkの増殖抑制作用はc-Kitに特異的と考えられた(図7)。c-Kit活性化に伴う細胞内蛋白質リン酸化へのLnk過剰発現の影響を検討したところ、c-Kitのチロシンリン酸化に顕著な変化はみられず、アポトーシス阻害に作用するAktのリン酸化にも変化はみられなかった。しかしながら、Gab2のチロシンリン酸化が減弱するとともにMAPK活性化の減弱が観察された。Lnkは、c-Kit活性化に伴うGab2リン酸化、それに続くMAPK活性化を抑制し、増殖シグナルを抑制することが示唆された(図7)。

おわりに

Lnkがc-Kitを介する増殖シグナルを抑制し、B細胞や血小板の産生量を適正に保つ重要な制御分子であることが示され、さらに造血幹細胞および前駆細胞の増殖、造血能制御に重要な働きを持つことが明らかとなった。この結果は、シグナル伝達におけるアダプター蛋白質の重要性を示すとともに、アダプター蛋白質が生体の恒常性維持に非常に大切な作用を担っていることを示した一例として重要である。*lnk*欠損による造血能亢進のメカニズム解明が今後の課題であり、骨髄への遊走、生着、骨髄微小環境内での増殖・分化など、いかなるステップが*lnk*欠損により影響されるかを明らかにすることにより、造血幹細胞の機能解明や増幅・制御法の確立に有用な情報が得られるものと期待される。造血幹細胞においてc-Kit以外のどのシグナル伝達系の抑制解除が造血能亢進につながるのか、またどのような遺伝子群の発現変化が生じているか、など興味深い。Lnk依存性経路の遮断による造血幹細胞の増幅・機能

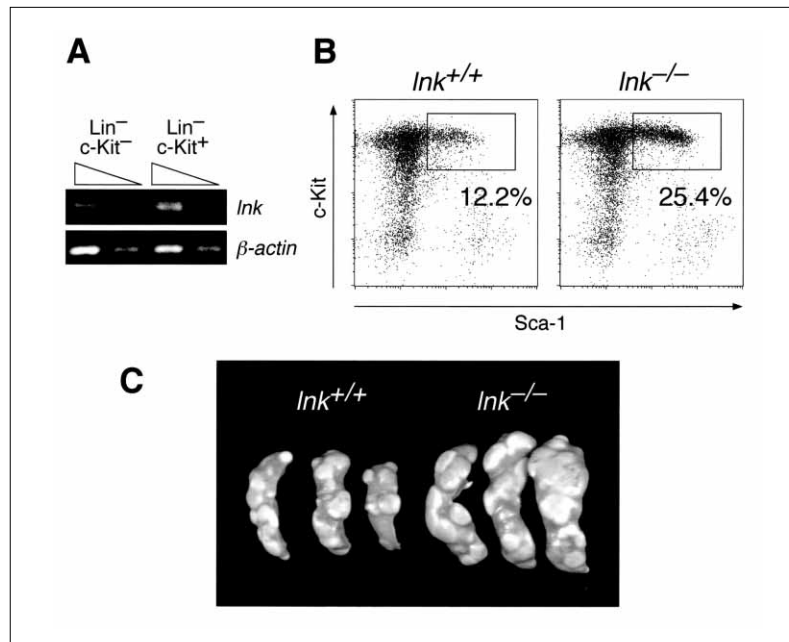


図3 *Ink* 欠損マウスにおける造血幹細胞分画の増加

(A) 野生型マウスの骨髓造血前駆細胞における *Ink* の発現を RT-PCR 法により検討した。(B) *Ink* 欠損マウスでは、分化抗原陰性 (*Lin*⁻) 骨髓細胞中の造血幹細胞を含む *c-Kit*⁺ *Sca-1*⁺ 分画が増加している。(C) 移植後 12 日目の脾臓に形成された CFU-S コロニー。*Ink* 欠損マウスの骨髓には CFU-S 活性を持つ造血前駆細胞が増加しており、形成される CFU-S コロニーのサイズも大きい。

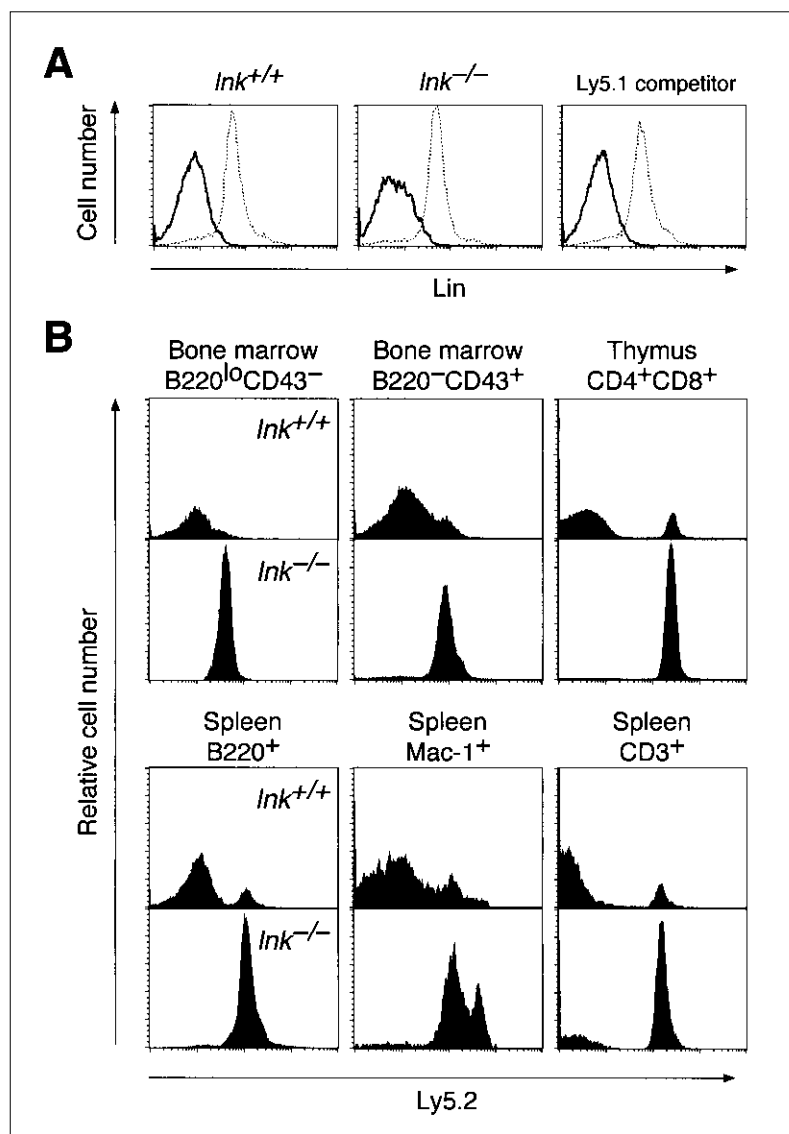
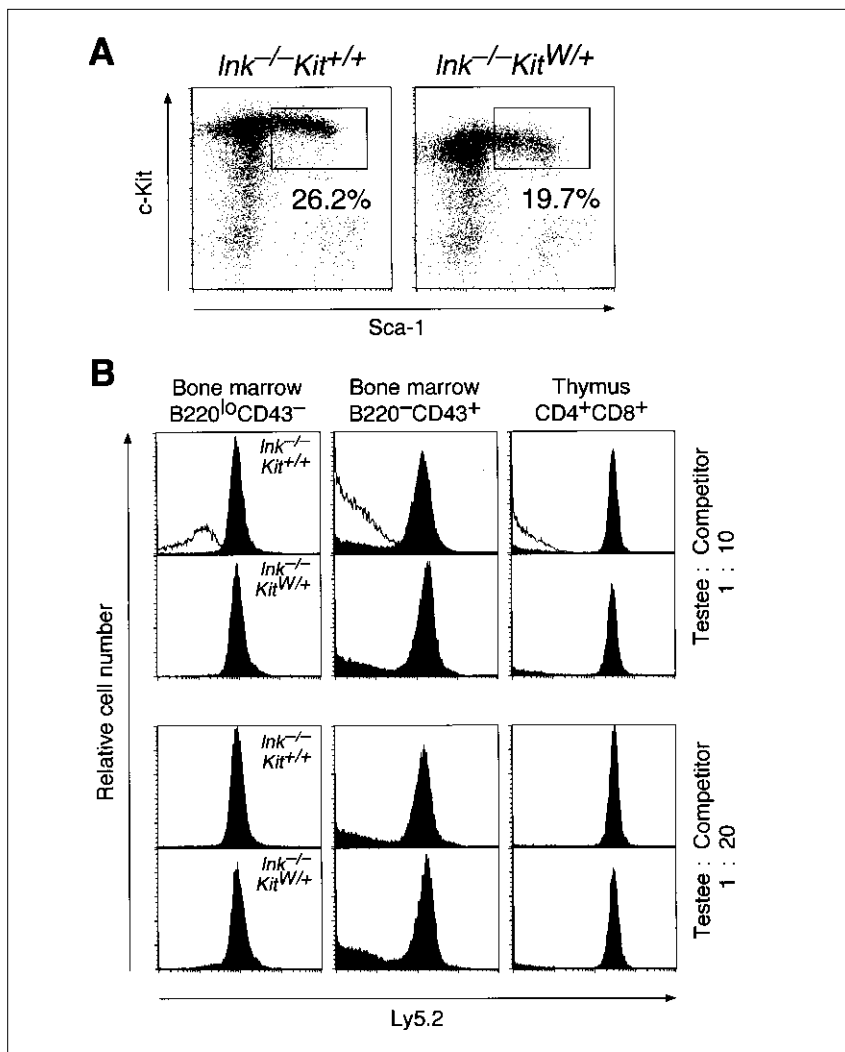


図4 競合的長期骨髓再構築法により示される *Ink* 欠損造血幹細胞の造血能亢進

Ly5.2⁺ の野生型および *Ink* 欠損マウスより得た *Lin*⁻ 造血前駆細胞 (A) を 5 倍量の Ly5.1⁺ マウスより得た *Lin*⁻ 前駆細胞とともに骨髓移植した。*Ink* 欠損前駆細胞を用いた場合、5 倍量の正常前駆細胞とともに移入したにもかかわらず、B, T, 骨髓球系細胞のほとんどが Ly5.2⁺ となり、*Ink* 欠損前駆細胞から産生されることがわかる (B)。

図5 *Ink*欠損による造血能亢進に及ぼす c-Kit^W変異の影響

(A) Wマウスとの交配によりc-Kitの発現量を減少させると造血前駆細胞の増加は有意に正常化する。(B) 一方、競合的骨髄再構築法で検出される造血能の亢進は *Ink*欠損 W/+マウスでもほとんど軽減しない。Ly5.2⁺の *Ink*欠損および *Ink*欠損 W/+マウスより得た骨髄細胞を、10倍量または20倍量のLy5.1⁺マウスより得た骨髄細胞とともに骨髄移植した。Ly5.1⁺骨髄細胞のみを移植した場合を細線で示した。

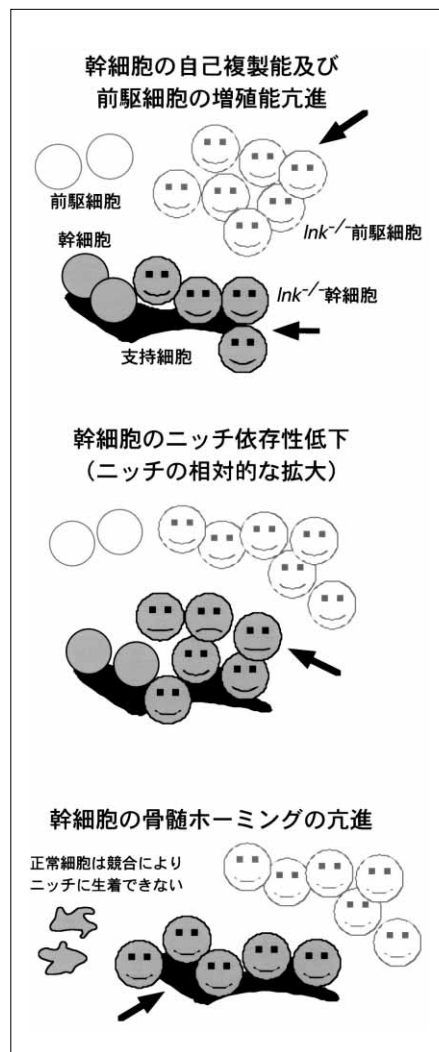


図6 幹細胞増加のモデル (仮説)

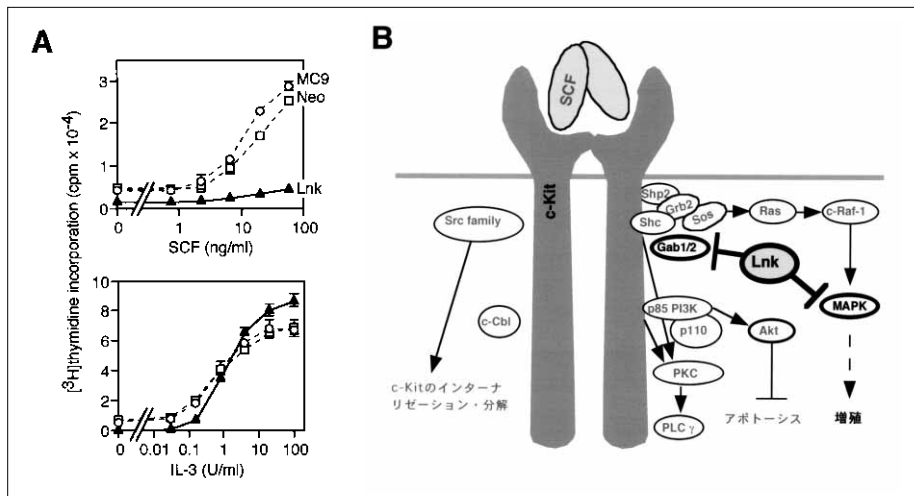


図7 Lnkによるc-Kit依存性シグナルの抑制

(A) γ -c-Kit⁺IL-3R⁺のマスト細胞株MC9にLnkを強制発現させたトランスフェクタントでは、SCFによる増殖が阻害される一方、IL-3による増殖は影響を受けない。(B) γ -c-Kitを介するシグナル伝達とLnkの作用点。LnkはGabリン酸化、MAPK経路の活性化を阻害することによりc-Kit依存性増殖シグナルを負に制御する。

制御も可能と思われ, Lnk阻害分子の開発も重要な検討事項と思われる.

文 献

- 1) Huang X, Li Y, Tanaka K, Moore KG, Hayashi JI: Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11618-11622, 1995.
- 2) Takaki S, Sauer K, Iritani BM, Chien S, Ebihara Y, Tsuji K, Takatsu K, Perlmutter RM: Control of B cell production by the adaptor protein Ink. Definition of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity*, 13: 599-609, 2000.
- 3) Li Y, He X, Schembri-King J, Jakes S, Hayashi J: Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol*, 164: 5199-5206, 2000.
- 4) Osborne MA, Dalton S, Kochan JP: The yeast tribrid system: genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology*, 13: 1474-1478, 1995.
- 5) Rui L, Mathews LS, Hotta K, Gustafson TA, Carter-Su C: Identification of SH2-B β as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. *Mol Cell Biol*, 17: 6633-6644, 1997.
- 6) Riedel H, Yousaf N, Zhao Y, Dai H, Deng Y, Wang J: PSM, a mediator of PDGF-BB-, IGF-I-, and insulin-stimulated mitogenesis. *Oncogene*, 19: 39-50, 2000.
- 7) Qian X, Riccio A, Zhang Y, Ginty DD: Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron*, 21: 1017-1029, 1998.
- 8) Rui L, Carter-Su C: Identification of SH2-B β as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7172-7177, 1999.
- 9) Herrington J, Diakonova M, Rui L, Gunter DR, Carter-Su C: SH2-B is required for growth hormone-induced actin reorganization. *J Biol Chem*, 275: 13126-13133, 2000.
- 10) Diakonova M, Gunter DR, Herrington J, Carter-Su C: SH2-B β is a Rac-binding protein that regulates cell motility. *J Biol Chem*, 277: 10669-10677, 2002.
- 11) Ohtsuka S, Takaki S, Iseki M, Miyoshi K, Nakagata N, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K, Yoshimura A: SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol*, 22: 3066-3077, 2002.
- 12) Yokouchi M, Suzuki R, Masuhara M, Komiya S, Inoue A, Yoshimura A: Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation. *Oncogene*, 15: 7-15, 1997.
- 13) Yokouchi M, Wakioka T, Sakamoto H, Yasukawa H, Ohtsuka S, Sasaki A, Ohtsubo M, Valius M, Inoue A, Komiya S, Yoshimura A: APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene*, 18: 759-767, 1999.
- 14) Wakioka T, Sasaki A, Mitsui K, Yokouchi M, Inoue A, Komiya S, Yoshimura A: APS, an adaptor protein containing Pleckstrin homology (PH) and Src homology-2 (SH2) domains inhibits the JAK-STAT pathway in collaboration with c-Cbl. *Leukemia*, 13: 760-767, 1999.
- 15) Ahmed Z, Pillay TS: Functional effects of APS and SH2-B on insulin receptor signalling. *Biochem Soc Trans*, 29: 529-534, 2001.
- 16) Iseki M, Takaki S, Takatsu K: Molecular cloning of the mouse APS as a member of the Lnk family adaptor proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 272: 45-54, 2000.
- 17) Takaki S, Watts JD, Forbush KA, Nguyen NT, Hayashi J, Alberola-Ila J, Aebersold R, Perlmutter RM: Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J Biol Chem*, 272: 14562-14570, 1997.
- 18) Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE: LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, 92: 83-92, 1998.
- 19) Takaki S, Morita H, Tezuka Y, Takatsu K: Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Ink. *J Exp Med*, 195: 151-160, 2002.
- 20) Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, Paige CJ, Pawson T: Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med*, 195: 1599-1611, 2002.