

インターロイキン2受容体 $\beta$ c鎖細胞内領域の

*in vitro, in vivo* における機能解析

藤井 健 高

①

インターロイキン 2 受容体  $\beta c$  鎖細胞内領域の  
*in vitro, in vivo* における機能解析

藤井 穂高

## 目次

|   |    |
|---|----|
| はじめに  | i  |
| 第1部 インターロイキン2による Stat5 活性化の制御と<br>Stat5 活性化の細胞増殖における役割の解析 | 2  |
| 背景  | 2  |
| 実験材料及び方法  | 5  |
| 結果  | 8  |
| 考察  | 11 |
| 第2部 発生工学を用いたインターロイキン2受容体 $\beta_c$ 鎖<br>細胞内各領域の生体内での役割の解析 | 16 |
| 背景  | 16 |
| 実験材料及び方法  | 18 |
| 結果  | 21 |
| 考察  | 26 |
| まとめ   | 31 |
| 謝辞  | 32 |
| 参考文献  | 33 |
| 図表  | 43 |

## はじめに

インターロイキン 2 (IL-2) はリンパ球の増殖及び分化を誘導することによって、免疫反応の制御に重要な役割を果たしている。IL-2は、その特異的受容体 (IL-2R) を介してその作用を発揮する。IL-2R は  $\alpha$ 、 $\beta$ c、 $\gamma$ c の 3 つのサブユニットから構成されており、そのうち IL-2R $\beta$ c と IL-2R $\gamma$ c の細胞内領域が増殖シグナル伝達に必須である。IL-2 刺激に伴って、細胞内チロシンリン酸化が亢進することが知られており、その後の解析から Lck、Syk、Jak1、Jak3 などのチロシンキナーゼが IL-2 によって活性化されることが明らかになった。特に Jak キナーゼ群は、インターフェロンをはじめ他のサイトカイン系のシグナル伝達にも重要な役割を果たしていることが知られており、その機能が注目されている。また、Jak キナーゼの下流分子として Stat (signal transducer and activator of transcription) と呼ばれる転写因子の一群が同定された。本論文の第 1 部ではまず、IL-2 シグナル伝達系において IL-2R $\beta$ c と共役する Jak/Stat の経路が如何なる役割を果たしているかについて培養細胞系を用いることによって検討した。

一方では培養細胞系を用いた解析から、IL-2R $\beta$ c 鎖の細胞内の各領域とその領域によって制御されるシグナル伝達系との対応関係が明らかとなつてはきたものの、使われた培養細胞の種類などにより異なる結論が得られることも判明し、このようなアプローチによるシグナル伝達系の解析には限界があることも判明してきた。このような視点に基づき、第 2 部では、IL-2R $\beta$ c 鎖欠損マウスと IL-2R $\beta$ c 鎖の各種変異体を発現させたトランスジェニックマウスとを交配することによってリンパ球における IL-2R $\beta$ c 鎖の発現を再構成したマウスを作製し、IL-2R $\beta$ c 鎖の各種変異体が生体内及び *in vitro* での IL-2 応答において果たす役割について検討を加えた。

## 第1部

### インターロイキン2による Stat5 活性化の制御と Stat5 活性化の細胞増殖 における役割の解析

#### 背景

インターロイキン2 (IL-2) は、リンパ球の増殖及び分化を誘導することによって、免疫反応の制御に重要な役割を果たしている (Minami et al., 1993; Smith, 1988; Taniguchi and Minami, 1993; Waldmann, 1989)。機能的な高親和性 IL-2 受容体 (IL-2R) は  $\alpha$  鎖 (IL-2R $\alpha$ )、 $\beta$  鎖 (IL-2R $\beta$ )、 $\gamma$  鎖 (IL-2R $\gamma$ ) の3つのサブユニットから構成されている (Minami et al., 1993) (図 1-1A)。IL-2R $\beta$  は IL-15 の (Grabstein et al., 1994) (図 1-1C)、また、IL-2R $\gamma$  は IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 受容体のサブユニットでもある (Giri et al., 1994; Leonard et al., 1994; Sugamura et al., 1996)。

IL-2 によるシグナル伝達には IL-2R $\beta$  及び IL-2R $\gamma$  の細胞内領域が必要であることが示されている (Hatakeyama et al., 1989; Kawahara et al., 1994; Nakamura et al., 1994; Nelson et al., 1994)。IL-2R $\beta$  及び IL-2R $\gamma$  の細胞内領域には内在性のキナーゼ活性は認められないが、IL-2 刺激に伴って、IL-2R $\beta$  及び IL-2R $\gamma$  の細胞内領域を含む細胞内分子のチロシンリン酸化の亢進が認められる (Farrar and Ferris, 1989; Fung et al., 1991)。その後の研究によって IL-2R には少なくとも3つのファミリーに属する非受容体型蛋白チロシンキナーゼ (PTK) が共役していることが判明した (Taniguchi, 1995)。すなわち、Janus PTK ファミリーに属する Jak1 と Jak3 (Johnston et al., 1994;



Witthuhn et al., 1994)、Src ファミリーのメンバーである Lck、Lyn、Fyn (Hatakeyama et al., 1991; Kobayashi et al., 1993; Minami et al., 1993)、そして Syk PTK である (Minami et al., 1995)。なかでも Jak ファミリー PTK (Jak1, Jak2, Jak3 及び Tyk2) は多くのサイトカインのシグナル伝達への関与が報告されている (Ihle, 1995; Taniguchi, 1995; Ihle, 1996)。IL-2 刺激に伴って、Jak1 と Jak3 のチロシンリン酸化の亢進及び PTK の活性化が起きるが、Jak1 と Jak3 はそれぞれ IL-2R $\beta$ c のセリンに富む領域 (S 領域) と IL-2R $\gamma$ c の C 末領域に特異的に結合することがこれらの PTK の活性化に必須である (Boussiotis et al., 1994; Miyazaki et al., 1994; Russell et al., 1994)。ちなみに、これらの 2 つの領域は実際 IL-2 による増殖シグナル伝達に必須であることが知られている (Hatakeyama et al., 1989; Kawahara et al., 1994)。更に、IL-2R を再構成した NIH 3T3 線維芽細胞株は IL-2 に対する増殖反応を示さないが、この細胞株は本来 Jak3 を発現しておらず、Jak3 cDNA を発現させると IL-2 依存性細胞増殖能を獲得することが判明した (Miyazaki et al., 1994)。一連の結果から、IL-2 シグナル伝達において Jak1 と Jak3 PTK の活性化が中心的な役割を果たしていることがうかがえる。

これまで IL-2 に加えて他のサイトカインシグナル伝達系においても Jak ファミリー PTK の重要性が示されているが (Ihle, 1995)、これらの PTK 分子が下流にシグナルを伝えるメカニズムはまだそのごく一部のみが知られている状態である。そうしたなかで、Jak キナーゼの活性化後に起こる細胞内の事象で最もよく解析されているのは、Stat (signal transducer and activator of transcription) と呼ばれる転写因子の活性化である。Stat 蛋白は通常は細胞質内に存在しているが、Jak キナーゼによると考えられている特異的チロシン残基のリン酸化によって活性化され、ホモ二量体やヘテロ二量体形成して、転写因子としての活性が誘導される (Darnell et al., 1994; Ihle and Kerr, 1994; Ihle et al., 1994; Ihle, 1996)。更に Stat 蛋白に存在する SH2 (src homology 2) ドメインが、Stat とその特異的受容体との結合やホモ・ヘテロ二量体形成に重要である

ことが示されている (Shuai et al., 1994)。IL-2 刺激によっても、Stat 蛋白が活性化されることが観察されている (Beadling et al., 1994; Gilmore and Reich, 1994)。しかし、Stat がサイトカインシグナル伝達に果たす役割、特に増殖シグナル伝達に果たす役割はこれまで不明であった。

最近になって、IL-2 によって活性化される Stat 蛋白がヒト末梢リンパ球から精製され、cDNA が単離された (Hou et al., 1995)。この IL-2 によって活性化される Stat 蛋白は、ヒツジ MGF (mammary gland factor) / Stat5 (Wakao et al., 1994) と高い相同性を有していることから、ヒト Stat5 と命名された。また、ヒト T 細胞株において Stat3 も IL-2 による活性化を受けることが報告されている (Nielsen et al., 1994)。本研究では、まず IL-2 による Jak1 / Jak3 の活性化と Stat5 の活性化との機能的連関を解析し、cDNA によってコードされている Stat5 が実際に IL-2 によって活性化されることを IL-2R を再構成した線維芽細胞株を用いて示した。次いで、IL-2R を再構成した血球系細胞株を用いて、IL-2 が内在性の Stat5 を活性化することを確認した。更に、IL-2 による Stat5 活性化には IL-2R $\beta$ c の C 末の領域が必須であることを示した。しかし、BAF-B03 由来細胞株では、この領域は IL-2 による Jak1 / Jak3 の活性化や細胞増殖誘導には必要ないことも判明した。サイトカインシグナル伝達における Jak キナーゼと Stat 蛋白の役割との関連で、こうした結果を考察したい。

## 実験材料及び方法

### 細胞

NIH 3T3 由来細胞株は 10 % ウシ胎児血清 (FCS) を含んだダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。BAF-B03 細胞は、マウスの IL-3 依存性血球系細胞株 BAF3 のサブクローンである (Kawahara et al., 1994)。BAF-B03 由来の細胞の培養は川原らの文献 (Kawahara et al., 1994) に従った。

### プラスミドの構築と DNA のトランスフェクション

ヒト Stat5 の発現ベクター pEF-hStat5 の構築に関しては、まずプラスミド TPU403 (S. L. McKnight 博士より供与) からヒト Stat5 の全長 cDNA を Xba I と Xho I によって切り出し、T4 DNA ポリメラーゼによって両末端を平滑化した後、Eco RI 切断後に同じく末端を平滑化した pEF ベクター (Kawahara et al., 1994) に挿入した。NIH 3T3 由来の細胞株への一過性 DNA トランスフェクションに関しては、10  $\mu$ g の pEF-hStat5 もしくは対照の pEF ベクターをリン酸カルシウム法によりトランスフェクトした後、48 時間培養した。8 時間のスターベーションの後、IL-2 (5 nM) 刺激を加え、DNA 結合活性を測定した。

F-7 細胞は BAF-B03 細胞由来のクローン株であり野性型ヒト IL-2R $\beta$ c をコードする cDNA を発現している (図 1-1D (i))。H-4, ST-14, A-15, S-25 は同じく BAF-B03 由来のクローン株で、それぞれ H 変異体、ST 変異体、A 変異体、S 変異体を発現している (図 1-1D (i), 1-4A) (Hatakeyama et al., 1989)。FM1-3 細胞は F-7 由来のクローン株で、Jak3 と結合するために必要な細胞質領域を欠失した変異型ヒト IL-2R $\beta$ c を発現している (図 1-1D (ii)) (Kawahara et al., 1994)。プラスミド pLCKR $\beta$ -SS の構築に関しては、まず pLCKR $\beta$  (Hatakeyama et al., 1989) を Sph I, Afl II, Stu I で切断し



た。Sph I - Afl II 断片 (7.2 kb)、Afl II - Stu I 断片 (90 bp)、Stu I - Sph I 断片 (1.2 kb) を回収し、Xba I リンカー (pTGCTCTAGAGCA, New England Biolabs) を加えて4つの断片のライゲーション反応を行って Stu I 部位の後ろに読み枠を合わせた終止コドン挿入した。SS-1 細胞は pLCKR $\beta$ -SS を構成的に発現しており、樹立の方法は畠山らの文献 (Hatakeyama et al., 1989) に従った。

#### Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

細胞抽出液の調製、DNA プローブとの結合反応、ゲル電気泳動は原田らの文献 (Harada et al., 1990) に従った。マウス IRF-1 [interferon (IFN) regulatory factor 1] の GAS (IFN- $\gamma$  activated site) (Sims et al., 1993) 及びマウス *c-fos* プロモーターの SRE (serum responsive element) (Treisman, 1986) は化学的に合成した。競合実験においては、ラベルのされていないオリゴヌクレオチドを結合反応液に加え、スーパーシフト実験では、対照抗体またはヒツジ Stat5 の N 末 (アミノ酸残基 6-131) に対する抗体を細胞抽出液と 4°C で 1 時間反応させた後にプローブを加えた。それぞれのシグナルの強度は Fujix 画像解析装置 BAS 2000 で測定した。

#### 免疫沈降及び免疫プロットティング

免疫沈降及び免疫プロットティングは宮崎らの文献 (Miyazaki et al., 1994) に従った。免疫沈降には抗 Jak1 抗体 ( $\alpha$ Jak1) (Miyazaki et al., 1994) 及び抗 Jak3 抗体 ( $\alpha$ Jak3) (Upstate Biotechnology) を用いた。免疫プロットティングには抗リン酸化チロシン抗体 ( $\alpha$ PY) (4G10, Upstate Biotechnology)、 $\alpha$ Jak1 及び  $\alpha$ Jak3 を用いた。

#### 細胞増殖アッセイ

1 ウェル 当たり  $5 \times 10^4$  個の細胞を 96 穴プレートにまき、10% FCS 入り RPMI 1640 培地、もしくはこれに IL-2 (2 nM) または IL-3 (10% WEHI-3B 細胞培養上清) を加えた条件下で 24 時間培養した。細胞回収の 4 時間前に 1  $\mu$ Ci の [ $^3$ H] チミジンを

加えた。 $^3\text{H}$  チミジンの取り込みの測定は川原らの文献 (Kawahara et al., 1994) に基づいて行った。

## 結果

### IL-2 による Stat5 の活性化

最近になって、IL-2 によって誘導される GAS (IFN- $\gamma$  activated site) に対する DNA 結合活性を持つ蛋白がヒト末梢リンパ球及びヒト NK (natural killer) 細胞株 YT から精製単離され、ペプチドシーケンス及び cDNA クローニングの結果、その Stat 蛋白はヒツジ Stat5 / MGF (mammary gland factor) と高い相同性を持つことが判明し、hStat5 と名付けられた (Hou et al., 1995)。はじめに、この単離された cDNA によってコードされる蛋白が実際に IL-2 によって活性化されるか否かを、一過性トランスフェクションアッセイによって検討した。マウス NIH 3T3 細胞に高親和性の IL-2 受容体を再構成した細胞株 3T3 $\alpha\beta\gamma$  (図 1-1D (iii)) (Minami et al., 1994) に、hStat5 の発現ベクターをトランスフェクトしたところ、IL-2 刺激によって IRF-1 GAS プロープに対する弱い結合活性が誘導された (図 1-2A、レーン 4)。次に、3T3 $\alpha\beta\gamma$  に Jak3 cDNA を構成的に発現させた細胞株 J3-12 (図 1-1D (iii)) (Miyazaki et al., 1994) にこの発現ベクターをトランスフェクトしたところ、3T3 $\alpha\beta\gamma$  のそれに比べて 10 倍程度強い結合活性が観察された (図 1-2A、レーン 8)。J3-12 細胞においても Stat 活性化は IL-2 依存적であった。これらの結果から、Jak3 は IL-2 による Stat5 活性化に重要であることが示唆された。IL-2 による DNA-蛋白複合体形成は、ラベルされていない IRF-1 GAS プロープを過剰量加えることによってほぼ完全に消失した (図 1-2B、レーン 2)。一方、非特異的な SRE プロープを過剰量加えてもこの複合体形成は影響を受けないことから (レーン 3)、この DNA 結合活性は特異的であることが示された。また、図 1-2B レーン 4 に示す通り、この DNA 結合複合体はヒツジ Stat5 に対する抗体によってスーパーシフトした。このことは、この DNA-蛋白複合体中に

Stat5 が存在していることを示唆している。抗 Stat1 抗体 (Transduction Laboratories)、抗 Stat2 抗体 (Upstate Biotechnology)、抗 Stat3 抗体 (Yale 大学 Fu 博士より供与) では Stat5-DNA 複合体の移動度に影響を与えなかった (データ略)。以上の結果から、IL-2 によって Stat5 が活性化されることが確認され、また、Jak3 が IL-2 による Stat5 活性化に重要な働きをしていることが示唆された。

#### 血球系細胞 BAF-B03 由来細胞株での Stat5 活性化

次に、IL-2R $\alpha$  と IL-2R $\gamma$ c を発現しているが IL-2R $\beta$ c を発現していない IL-3 依存性血球系細胞株 BAF-B03 に、ヒト IL-2R $\beta$ c cDNA を発現させることによって IL-2 に対する増殖応答性を賦与された細胞株 F-7 (Hatakeyama et al., 1989, 図 1-1D (i)) を用いて、IL-2 及び他のサイトカインによる Stat 蛋白活性化を検討した。図 1-3A、レーン 2 に示す様に IL-2 刺激に伴って IRF-1 GAS プロンプに対する DNA 結合活性が誘導された。また、SIE (*cis*-inducible element)、Fc $\gamma$  受容体 GAS、 $\beta$ -カゼイン GAS などの他の GAS プロンプにも IL-2 により活性化される Stat は結合し、IRF-1 GAS と  $\beta$ -カゼイン GAS に対する親和性は他のプロンプに対する親和性に比べて高かった (データ略)。この結果は、T 細胞における IL-2 誘導性 Stat の各種 DNA 配列に対する親和性についての報告と矛盾しない (Beadling et al., 1994; Gilmore and Reich, 1994)。図 1-3B に示すように、IL-2 及び IL-3 によって活性化される Stat は抗 Stat5 抗体と反応したが、IFN- $\gamma$  によって誘導される Stat 活性 (これは Stat1 のホモダイマーである; Shuai et al., 1994) は抗 Stat5 抗体とは反応しなかった。次に、F-7 細胞にヒト IL-2R $\gamma$ c の Jak3 との結合に必要な細胞内領域を欠失した変異体を過剰発現させた細胞株 FM1-3 (図 1-1D (ii)) での Stat 活性化を調べたところ、興味深いことにこの細胞では IL-2 による Stat5 活性化は観察されなかった (図 1-3A、レーン 5)。一方、IL-3



による Stat5 活性化は F-7 と FM1-3 で同様に検出される (レーン 3, 6)。

#### IL-2 による Stat5 活性化における IL-2R $\beta$ c の C 末領域の重要性及びその領域が Jak1 / Jak3 活性化や増殖に果たす役割

IL-2R $\beta$ c の細胞内領域のどの亜領域 (subregion) が Stat5 活性化に重要であることを明らかにするために、IL-2R $\beta$ c の変異体を発現させた BAF-B03 由来細胞株を用いて EMSA による Stat5 活性化の検討を行った (図 1-1D (i)、図 1-4A、Hatakeyama et al., 1989)。図 1-4B に示すように、野生型 (F-7 細胞)、Src 型 PTK との結合部位を欠く A 変異体 (A-15 細胞) (Hatakeyama et al., 1991) では IL-2 による Stat5 の活性化が認められた。また、F-7 及び A-15 はともに IL-2 による増殖反応を示した (図 1-5、Hatakeyama et al., 1989)。一方、IL-2 によって増殖しない ST 変異体 (ST-14 細胞) と S 変異体 (S-25 細胞) は、IL-2 による Stat5 活性化を誘導しなかった。一方で、ヒト IL-2R $\beta$ c の C 末端 147 アミノ酸残基を欠失する H 変異体を発現する H-4 細胞では Stat5 活性化を誘導しなかったにも関わらず、IL-2 によって Jak1 及び Jak3 のチロシンリン酸化が認められると共に (図 1-4C)、また細胞増殖もほぼ正常に誘導された (図 1-5、Hatakeyama et al., 1989)。加えて、ヒト IL-2R $\beta$ c の C 末端 175 アミノ酸残基を欠失する SS 変異体を発現する細胞株 SS-1 においても、Stat5 活性化なしに IL-2 による増殖が観察された。

## 考察

近年、サイトカインシグナルにおいて Janus (Jak) キナーゼファミリーに属する PTK に注目が集まっている (Darnell et al., 1994; Ihle et al., 1994)。I 型及び II 型 IFN に加えて、IL-2 を含む増殖を惹き起こすサイトカイン受容体においても Jak ファミリー PTK が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。Jak の結合部位は多くのサイトカイン受容体で、シグナル伝達に必要とされる box I モチーフを含む領域に一致し、この事実は Jak ファミリーキナーゼが細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることを示唆している (Ihle et al., 1994)。IL-2 受容体系では、IL-2R $\beta$  と IL-2R $\gamma$  にそれぞれ Jak1 と Jak3 が特異的に結合する (Miyazaki et al., 1994; Russell et al., 1994)。この結合には、それぞれ IL-2R $\beta$  の S 領域と IL-2R $\gamma$  の C 末 48 アミノ酸が必要であり、また、これらの領域は両方とも増殖シグナルの伝達に必須である (Hatakeyama et al., 1989; Kawahara et al., 1994; 藤井、未発表データ)。また、最近の研究により、Jak3 の N 末の JH3-JH7 領域が IL-2R $\gamma$  との結合に重要であることが示唆されている (Kawahara et al., 1995)。受容体型チロシンキナーゼの場合には、リガンドによって惹き起こされた受容体の二量体化 (dimerization) が受容体各分子の相互活性化を惹き起こすというモデルが広く支持されている (Ullrich and Schlessinger, 1990; Kishimoto et al., 1994; Stahl and Yancopoulos, 1993)。IL-2 受容体の場合にも、IL-2 の結合によって惹き起こされた IL-2R $\beta$  と IL-2R $\gamma$  のヘテロ二量体化が、Jak1 と Jak3 の局所的な凝集を惹き起こし、その結果相互リン酸化によって各々の活性化を惹き起こすというメカニズムが働いている可能性が考えられている (Nakamura et al., 1994; Nelson et al., 1994)。

本研究では、まず cDNA としてクローン化された hStat5 が IL-2 によって実際に活

活性化されることを、IL-2 受容体を再構成した NIH 3T3 線維芽細胞株由来の細胞株を用いて示した。本来 Jak3 を発現していない線維芽細胞に Jak3 を強制的に発現させると、hStat5 の活性化は劇的に増強された（図 1-2A）。加えて、細胞内領域を欠失させた結果 Jak3 の結合及び活性化が消失したヒト IL-2R $\gamma$ c 変異体を IL-2 受容体再構成細胞株 F-7 に過剰発現させた細胞株 FM1-3 では、IL-2 による内在性 Stat5 の活性化は消失した（図 1-3A）。このようなデータから、IL-2 による Stat5 活性化において Jak3 が重要な役割を果たしていることが示唆される。NIH 3T3 細胞由来の細胞株では、Jak3 の cDNA トランスフェクションによって内在性の Jak1 のチロシンリン酸化も増強されるという結果を得ており（藤井、未発表データ）、このことから Jak1 のみによっても IL-2 による Stat5 活性化が弱いながらも誘導されうることが示唆される。事実、Jak3 の発現がない 3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞においても IL-2 による Stat5 活性化が認められる（図 1-2A）。

Stat 活性化の特異性は、それぞれのサイトカイン受容体の細胞内ドメインにおけるチロシンを含む特定の配列にそれぞれの Stat がその SH2 ドメインを介して特異的に結合することによって決定されるというモデルが IFN 受容体と IL-4 受容体において提唱されている（Greenlund et al., 1994; Hou et al., 1994）。すなわち、Jak PTK によって受容体の特定のチロシン残基がリン酸化され、そこに特定の Stat が SH2 ドメインを介して結合し、結合した Stat が更に Jak によるチロシンリン酸化を受けることによって活性化されるというモデルである。一方、サイトカイン受容体の中には、Stat 活性化に受容体のチロシンリン酸化が必要ないものも存在することが報告されている（Ihle and Kerr, 1994）。BAF-B03 細胞由来で C 末の 147 アミノ酸を欠失した IL-2R $\beta$ c を発現した H-4 細胞では、IL-2 による Stat5 の活性化はほぼ完全に消失している（図 1-4B）。H 変異体で欠失させた領域には Y392 と Y510 という 2 つのチロシ

ン残基が存在するが、これらの領域に対応するペプチドは、IL-2 による Stat5 の活性化を阻害することが知られており (S. L. McKnight 博士、私信)、これら 2 つのチロシン残基が IL-2 刺激による Stat5 の活性化に重要であると考えられる。また、A 変異体は Src 型チロシンキナーゼと結合出来ず、また、これらのキナーゼの活性化能を持たないことから、Stat5 の活性化は p56<sup>lck</sup> 等の Src ファミリーキナーゼの活性化とは独立に起きると考えられる (Hatakeyama et al., 1991; Minami et al., 1993)。

IFN による標的遺伝子の転写誘導において Stat 蛋白が重要な役割を果たしていることはよく知られているが、サイトカイン受容体による Stat の活性化が細胞増殖刺激の伝達に如何に関与しているかについては統一された見解が出ていない状況にある。H-4 細胞と SS-1 細胞で Stat5 活性化が消失しているという本実験の結果は、IL-2 による Stat5 活性化が増殖に関与しているか否かという興味深い問題を投げかけている。すなわち、H-4 細胞は IL-2 による Stat5 活性化能を全く消失しているにも関わらず、IL-2 に反応してよく増殖する。組み換え IL-2 に対する H-4 細胞の容量依存性 (dose dependency) は、野性型の IL-2R $\beta$ c を発現している F-7 細胞とほぼ同等であった (Hatakeyama et al., 1989)。そのうえ、IL-2R $\beta$ c H 変異体は T 細胞クローンにおいても細胞増殖を誘導出来るという (P. D. Greenberg 博士、B. H. Nelson 博士、私信)。更に、SS 変異体を発現しているクローン株は、F-7 細胞や H-4 細胞と比べて弱いものの、Stat5 活性化なしに IL-2 に反応して増殖している。SS-1 細胞では、最大の増殖反応を惹き起こすためには 1 nM という高い濃度の IL-2 が必要である (データ略)。しかし、SS-1 細胞での増殖異常の原因は、恐らく SS 変異体が H 変異体には存在している A 領域の C 末半分を欠いていることに拠る可能性がある。従って、SS-1 細胞で得られた結果は現時点ではそれ自身では十分に解釈することは困難ではあるが、H-4 細胞の実験結果から引き出された結論を否定するものではない。以上の結果から少なくとも BAF-B03 細胞を用いた系においては Stat 活性化は IL-2 シグ



ナル伝達における増殖誘導に必須ではなく、この系では、IL-2による Stat5 活性化の意義については更に検討することが困難であると考えられる。一方で、他の培養細胞株を用いた実験結果では IL-2 による Stat5 の活性化が細胞増殖シグナルの伝達に重要であるという本研究結果とは一見矛盾する結果も報告されている (Friedmann et al., 1996; Goldsmith et al., 1995)。これに関連して、IL-4 によって活性化される Stat6 は、IL-4 による細胞増殖に必須でないという報告もされている (Quelle et al., 1995)。これら一連の研究は培養細胞系を用いたシグナル伝達経路の解析研究の問題点を指摘するものであり、これについては第2部で詳細な検討を加える。

IL-2 受容体を再構成した線維芽細胞株に cDNA トランスフェクションによって Jak3 を発現させると、IL-2 による細胞増殖反応が誘起されたという実験結果 (Miyazaki et al., 1994) は、Jak キナーゼが細胞増殖に中心的な役割を果たしていることを示唆している。加えて、C 末の JH1 PTK ドメインを欠失しているが IL-2R $\gamma$  に対する結合能を保持している Jak3 の変異体を F-7 細胞に過剰発現させると、Jak3 を活性化しない IL-3 に対する反応性は正常であるのに対して、IL-2 に対する反応性だけが特異的に大きく減弱するという結果も得られている (Kawahara et al., 1995)。これらの結果をまとめると、Jak1 と Jak3 は明らかに IL-2 による増殖シグナル伝達に極めて重要な役割を果たしていると考えられる。従って、一連の結果を総合すると IL-2 をはじめとするサイトカインによって活性化される Jak PTK からのシグナル伝達には Stat 活性化の他に、細胞増殖に関与するシグナル伝達経路が存在することが推測される。実際、細胞増殖には *c-myc*、*bcl-2*、*c-fos* / *c-jun* といった癌原遺伝子の誘導が必要であると考えられている (Miyazaki et al., 1995; Sato et al., 1993; Shibuya et al., 1992)。これらの癌原遺伝子の誘導が IL-2 シグナル伝達で重要であるという証拠が積み重ねられている一方で、これらの癌原遺伝子誘導において Stat が主要な役割を果たしているという証拠はない。

以上の結果を総合すると IL-2 によって活性化される Stat5 の生理的意義及び Jak1, Jak3 PTK と共役する Stat 活性化経路以外の増殖に関与する新しい経路を解明することが今後の重要な課題と考えられる。

## 第2部

# 発生工学的手法を用いたインターロイキン2受容体 $\beta$ c鎖細胞内各領域の機能解析

### 背景

IL-2R $\beta$ cの細胞内領域にはいくつかの領域が同定されている。培養細胞を用いた実験から、S領域はIL-2による細胞増殖に必須であることが示されているが、A領域及びH領域を欠失させたIL-2R $\beta$ cでもBAF-B03由来細胞株ではIL-2による増殖が認められることから、この2つの領域は細胞増殖に必ずしも必須ではないことが示唆されている(Hatakeyama et al., 1989; Fujii et al., 1995)。一方、H領域に関しては、この領域に含まれるStat活性化に必要なチロシン残基を他のアミノ酸に置換した変異体でStat活性化が消失し、かつIL-2による増殖が低下したという報告があり(Friedmann et al., 1996; Goldsmith et al., 1995)、第1部で記述した私達の結果と比較するとH領域の増殖における役割は議論のあるところである。また、培養細胞での実験という制約のため、これらの領域がリンパ球の分化に如何に関与しているかについては全く解析がなされていない。

本研究では、細胞増殖・分化におけるIL-2R $\beta$ cのこれらの細胞内領域の機能をより生理的な条件下で解明するために、野性型、H領域を欠くH変異体、A領域を欠くA変異体のトランスジーンの発現によってIL-2R $\beta$ c欠損マウスでのリンパ球にお

ける IL-2R $\beta$ c の発現の回復を試みた。その結果、まず野性型、H 変異体、A 変異体のそれぞれの発現によって、IL-2R $\beta$ c 欠損マウスで観察された T 細胞の自発的な活性化とその結果惹き起こされる自己免疫症状を正常マウス同様に抑制させることが出来た。一方、野性型及び A 変異体発現マウスでは、NK 細胞の分化をも誘導が検出出来たが、H 変異体発現マウスでは NK 細胞が検出されず、この結果、IL-2R $\beta$ c の H 領域が NK 細胞の分化に必須であることが示された。また、T 細胞受容体 (TCR) 刺激及び concanavalin A (ConA) 刺激に対して、H 変異体・A 変異体を発現する T リンパ球はともに野性型と変わらない増殖反応を示した。しかし、H 変異体発現リンパ球では IL-2 による TCR 刺激との協調的増殖反応は低下しており、その原因として H 変異体には IL-2 による IL-2R $\alpha$  の発現誘導能がないことを明らかにした。一方で、A 変異体を発現する T 細胞では、IL-2 に対する反応性が増強されており、それに伴って Stat5 の活性化、IL-2R $\beta$ c のチロシンリン酸化が異常に持続していることから、A 領域が IL-2 シグナル伝達に対して負の制御を行っている可能性が示された。これらの実験結果は今日までの培養細胞系を用いて得られた結果とは必ずしも合致しない。今回の新しいアプローチによって得られた結果に基づき、IL-2R $\beta$ c 細胞内の各領域の役割について考察する。



## 実験材料及び方法

### マウス

IL-2R $\beta$ c 欠損マウスの作製は鈴木らの文献 (Suzuki et al., 1995) に述べられている。マウス IL-2R $\beta$ c H 変異体の構築に関しては、まずプラスミド pMIL-2R $\beta$ -10 (Kono et al., 1990) を鋳型とし、5'-ACCGAATTCTGAGATCTCTCCGCTG-3' と 5'-TTAAAGCTTGGGCCCTAGTGGGAGATCCCT-3' の 2 つのオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR (polymerase chain reaction) を行った。PCR 産物を Bgl II と Apa I で切断し、同じく Bgl II と Apa I で切断した pMIL-2R $\beta$ -10 と連結し、プラスミド pMIL-2R $\beta$ H を作製した。マウス IL-2R $\beta$ c A 変異体の構築に関しては、pMIL-2R $\beta$ -10 を鋳型とし、5'-AATCTGCAGCCTCTGGCTGGAGAA-3' と 5'-CCAAAGCTTAGATCTTTCTTCAGGGGC-3' をプライマーとして PCR 反応を行った。PCR 産物を Pst I と Hind III で切断し、マウス IL-2R $\beta$ c のアミノ酸残基 298 から 318 番目に対応する合成ヌクレオチド、そして Eco RI と Pst I で切断した pBluescript ベクターと連結した。このプラスミドから Bgl II によって DNA 断片を切り出し、Bgl II で切断した pMIL-2R $\beta$ -10 と連結して、プラスミド pMIL-2R $\beta$ A を構築した。

mIL-2R $\beta$ c の野性型、H 変異体、A 変異体のコード領域を、それぞれ pMIL-2R $\beta$ -10、pMIL-2R $\beta$ H、及び pMIL-2R $\beta$ A から切り出し、ヒト CD2 発現カセット (Zhumabekov et al., 1995) に組み込んだ。構築した cDNA は DNA シークエンスにより、配列が正しいことを確認した。トランスジェニックマウスの作製は鈴木らの文献及び木村らの文献 (Suzuki et al., 1996; Kimura et al., 1997) に従った。

### フローサイトメトリー

脾細胞をモノクローナル抗体 (mAb) で氷上 30 分インキュベートし、フローサイト

メトリーを行い (FACScalibur; Beckton Dickinson)、CELLQuest ソフトウェア (Beckton Dickinson) によって解析した。本研究で使った mAb は次の通り；抗マウス CD3ε [FITC (fluorescein isothiocyanate) ラベル及び PE (phycoerythrin) ラベル、クローン 145-2C11]、抗マウス IL-2Rβc (PE ラベル、クローン TM-β1)、抗マウス IL-2Rα (FITC ラベル、クローン 7D4)、抗マウス CD69 (FITC ラベル、クローン H1.2F3)、抗マウス B220 (PE ラベル、クローン RA3-6B2)、抗マウス NK1.1 (PE ラベル、クローン PK136)。抗体は全て Pharmingen 社より購入した。

#### Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

脾細胞を 5 μg/ml の ConA で 3 日間培養後、細胞を洗浄し更に 16 時間培養した。

IL-2 で刺激した後、細胞抽出液を調製した。EMSA は第 1 部と同様に行った。

#### 細胞増殖試験

細胞増殖試験は、抗 CD3ε 抗体 (145-2C11、Pharmingen) を 4°C、オーバーナイトでコートした 96 穴プレートを用いてトリプリケートで行った。1 × 10<sup>5</sup> 個の脾細胞を、10% FCS を加えた 0.2 ml の RPMI 培地中で培養した。培地には、L-グルタミン、ビルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、5 × 10<sup>-5</sup> M の 2-メルカプトエタノールを加えた。細胞は、88 時間の培養中、最後の 16 時間 0.5 μCi の [<sup>3</sup>H] チミジンを培養液に加え、Top Count (Hewlett Packard) で取り込みを測定した。

#### 免疫沈降及び免疫ブロッティング

細胞抽出液の調製は、宮崎らの文献 (Miyazaki et al., 1994) に従った。IL-2Rβc は、特異的な mAb (TM-β1) によって免疫沈降を行い、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10, Upstate Biotechnology) または抗 IL-2Rβc 血清 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫ブロッティングを行なった。Jak3 は抗 Jak3 血清 (Upstate Biotechnology) を用いて免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体または抗 Jak3 血清を用いて免疫ブロッティング

を行なった。

#### NK 細胞傷害活性試験

NK 細胞傷害活性試験は橋本らの文献 (Hashimoto et al., 1995) に準じて行なった。

Molony 白血病ウイルスによって誘発されたマウス リンパ腫細胞株 YAC-1 を

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  でラベルし、初代脾細胞または IL-2 存在化に *in vitro* で培養した脾細胞と混合した。標的細胞の破壊は、4 時間の培養後の  $^{51}\text{Cr}$  の放出量から以下の式に拠り計算した。

$$\text{percentage specific lysis} = (a-b) / (c-b) \times 100 \%$$

a = test release

b = spontaneous release

c = release in the presence of 1% SDS

LAK (lymphokine activated killer) 試験は、脾細胞を 500 U/ml の IL-2 で 3 日間培養後に行なった。

## 結果

### トランスジェニックマウスの作製

IL-2R $\beta$ c の細胞内ドメインの各領域の機能に関しては、培養細胞を用いた実験系において多くの報告がなされている。しかし、特に A 領域並びに H 領域の機能に関しては不明な点が多い。そこで、これらの領域の機能を直接マウスリンパ球において解析することを目的として、これらの領域を欠いた変異型 IL-2R $\beta$ c によって IL-2R $\beta$ c の発現を IL-2R $\beta$ c 欠損マウス ( $\beta$ c<sup>-/-</sup>) リンパ球で再構成することを試みた。まず、mIL-2R $\beta$ c から H 領域及び A 領域をそれぞれ欠いた H 変異体、A 変異体を構築した (図 2-1A)。次に、これら変異体及び野生型 (WT) IL-2R $\beta$ c のコード領域を、リンパ球特異的に発現するヒト CD2 プロモーター及びエンハンサーの制御下に置いたトランスジーン (Tg) を構築した。それぞれの Tg に対して、複数の C57BL/6 バックグラウンドのファウンダー系を作製し、それらのファウンダーはほぼ完全に C57BL/6 バックグラウンドである  $\beta$ c<sup>+/+</sup> マウスとのかけあわせを繰り返すことによって、 $\beta$ c<sup>-/-</sup> でなおかつ Tg を発現しているマウス ( $\beta$ c<sup>-/-</sup>/Tg) を得た (図 2-1B)。WT、H 変異体、A 変異体をコードする Tg の細胞表面での発現を免疫蛍光法及びフローサイトメトリーによって解析した (図 2-1C)。細胞表面の発現量が同程度の  $\beta$ c<sup>-/-</sup>/Tg 間で以下の実験を行なった。なお、一連の実験は複数の Tg ファウンダー系で行なうことによって個体間の誤差についても慎重に検討を加えた。基本的には他のファウンダー系においても、ここで示すデータと本質的に同じ結果が得られている。



### 変異型 IL-2R $\beta$ c による T 細胞の自発的活性化の抑制

IL-2R $\beta$ c 欠損マウスでは、T 細胞の自発的な活性化が報告されている。この T 細胞の異常な活性化の結果、B 細胞の形質細胞への分化が亢進し、高いレベルの自己抗体が産生され、マウスは 12 週齢までに自己免疫性溶血性貧血 (AIHA: autoimmune hemolytic anemia) によって死亡する (Suzuki et al., 1995) (表 2-1)。そこで、まず野性型及び変異型 IL-2R $\beta$ c の導入が T 細胞の異常な活性化を抑制できるか否かを検討した。8 週齢の  $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスリンパ節に存在する T 細胞では、初期 T 細胞活性化マーカーである CD69 の発現が亢進している (図 2-2A)。それに対して、 $\beta$ c<sup>+/WT</sup>、 $\beta$ c<sup>+/H</sup>、 $\beta$ c<sup>+/A</sup> では CD69 の発現は対照の  $\beta$ c<sup>+/+</sup> マウスとほぼ同等であった (図 2-2A)。また、B220<sup>+</sup> の細胞集団は  $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスにおいては消失しているが、 $\beta$ c<sup>+/WT</sup>、 $\beta$ c<sup>+/H</sup>、 $\beta$ c<sup>+/A</sup> では対照とほぼ同程度存在していた (図 2-2B)。これらの結果から、WT、H 変異体、A 変異体はいずれも  $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスで観察された T 細胞の自発的活性化と B 細胞の異常な分化による消失を抑制していることが示めされた。また、 $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスは AIHA により 12 週齢までに死亡するが、野性型及び変異型の IL-2R $\beta$ c を導入したいずれのマウスでも貧血の症状は認められず、早期の死亡も観察されなかった。加えて、これらの  $\beta$ c<sup>-/-</sup>/Tg マウスでは  $\beta$ c<sup>-/-</sup> で認められた脾臓への顆粒球浸潤や脾臓腫大などの症状も検出されなかった (データ略)。

### NK 細胞の発生・分化における H 領域の重要性

IL-2R $\beta$ c 欠損マウスでは、腸管上皮間リンパ球の集団構成に大きな変化が認められ、NK 細胞の分化が障害されることも報告されている (Suzuki et al., 1997) (表 2-1)。そこで、まず本実験で作製された IL-2R $\beta$ c 再構成マウスがほぼ完全に C57BL/6 バック

クグラウンドであることを利用して、このバックグラウンドではNK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>の特徴を持つNK細胞の数をフローサイトメトリーを用いて測定した。 $\beta c^{+/WT}$ 及び $\beta c^{+/A}$ マウスでは、NK細胞数は $\beta c^{+/+}$ マウスの1/3-1/2に減少しているものの、NK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>の細胞集団がはっきりと認められた(図2-3A)。ところが、 $\beta c^{+/H}$ マウスでは $\beta c^{+/+}$ マウスと同様に、NK細胞集団はほぼ完全に消失していた(図2-3A)。次に、脾細胞とNK細胞の標的細胞であるYAC-1を用いたNK細胞による細胞傷害活性を測定した。 $\beta c^{+/+}$ マウス脾細胞では、NK細胞による細胞傷害活性が測定されたが、NK細胞集団が認められない $\beta c^{+/+}$ マウス及び $\beta c^{+/H}$ マウス脾細胞ではこの細胞傷害活性は消失していた(図2-3B)。野性型のIL-2R $\beta c$ をTgとして導入した $\beta c^{+/WT}$ マウス及びA変異体を導入した $\beta c^{+/A}$ マウスでは、NK細胞傷害活性が検出された。次に、脾細胞をIL-2で3日間培養することによって誘導されるLAK活性を測定した。IL-2によって、 $\beta c^{+/+}$ 及び $\beta c^{+/WT}$ 脾細胞では強いLAK活性が誘導され、 $\beta c^{+/A}$ 脾細胞でもLAK活性が検出された(図2-3C)。一方、 $\beta c^{+/+}$ 脾細胞及び $\beta c^{+/H}$ 脾細胞ではNK活性は殆ど誘導されなかった(図2-3C)。以上の実験結果から、H領域がNK細胞の分化に重要であることが示された。

#### Tリンパ球の増殖におけるH領域、A領域の役割

IL-2R $\beta c$ の細胞内領域は、IL-2による細胞増殖に必須である(Hatakeyama et al., 1989)。しかし、H領域やA領域がIL-2による細胞増殖において如何なる役割を果たしているかについては既に第1部で述べてきたように統一された見解は得られていない。そこで、 $\beta c^{+/Tg}$ マウスの脾細胞を用いて、T細胞の増殖反応を検討した。T細胞を最大限に活性化させる濃度の抗CD3刺激やconcanavalin A (ConA) 刺激に対

して、 $\beta c^{+/WT}$ 、 $\beta c^{+/H}$ 、 $\beta c^{+/A}$  の脾細胞は良く反応し、 $\beta c^{+/+}$  とほぼ変わらない [ $^3H$ ] チミジンの取り込みを示した (図 2-4A)。また、抗 CD3 刺激に対する濃度依存性を検討したところ、 $\beta c^{+/WT}$ 、 $\beta c^{+/H}$ 、 $\beta c^{+/A}$  リンパ球の反応性は対照とした同腹の  $\beta c^{+/+}$  のそれと変わらなかった (データ略)。これらの結果から、H 領域及び A 領域は TCR 刺激及びマイトジェン刺激によるリンパ球の増殖には必須でないことが示された。

次に、低い濃度の抗 CD3 刺激によって、IL-2 の添加に依存して増殖が誘導される系において同様の検討を行なった。その結果、TCR 刺激及びマイトジェン刺激によるほぼ正常な増殖反応とは異なり、 $\beta c^{+/H}$  マウスの脾細胞では  $\sim 100$  U/ml の IL-2 刺激に対して、抗 CD3 刺激の有無に関わらず、反応性が顕著に減弱することを見出した (図 2-4B)。それに対して、1000 U/ml の IL-2 刺激に対しては、 $\beta c^{+/H}$  T 細胞はほぼ正常脾細胞と同等に反応した。これらの結果から、低い濃度の IL-2 に対する  $\beta c^{+/H}$  T 細胞の反応性の低下はシグナル伝達経路の異常によるというより、IL-2R に対する IL-2 の結合効率が減弱しているためである可能性が示唆された。ここで、高親和性 IL-2R の形成により IL-2 が IL-2R に結合する効率を増加させるには IL-2R $\alpha$  が必須であることから (図 1-1B)、 $\beta c^{+/Tg}$  マウスの脾細胞での IL-2R $\alpha$  の誘導を検討したところ、 $\beta c^{+/H}$  T 細胞での IL-2 による IL-2R $\alpha$  の細胞表面への発現誘導は完全に消失していた (図 2-4C)。また、 $\beta c^{+/H}$  T 細胞では IL-2 による IL-2R $\alpha$  mRNA の誘導も消失していた (データ略)。興味深いことに、 $\beta c^{+/H}$  T 細胞では IL-2 刺激による Stat5 活性化は認められなかった (図 2-4D)。この結果は、H 領域は Stat5 活性化を介して IL-2 による IL-2R $\alpha$  の発現を正に制御している可能性を示している (後述)。

一方、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞の IL-2 による増殖反応は、CD3 刺激の有無に関わらず対照に比べて有意に増強されることが判明した (図 2-4B)。加えて、IL-2 による IL-2R $\alpha$  の誘導は  $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞では高い傾向も認められた (図 2-4C)。H 変異体で見たように、IL-2R $\alpha$  の誘導と Stat5 活性化には相関性があるので、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞における Stat5 活性化の経時的变化を EMSA によって調べた (図 2-4E)。 $\beta c^{-/-}$ /WTT 細胞、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞とも IL-2 刺激後 10 分以内に Stat5 の DNA 結合活性が検出された。 $\beta c^{-/-}$ /WTT 細胞では、刺激後 60 分では Stat5 活性化は顕著に減弱していた。一方で、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞では刺激後 60 分においても Stat5 活性化の程度は刺激後 10 分時と変わらなかった (図 2-4E)。実際、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞での Stat5 活性化は刺激後 120 分以降も持続していた (データ略)。IL-2 による Stat5 活性化には、IL-2R $\beta c$  の H 領域に含まれるチロシン残基のリン酸化が必須であることが示されている (Lin et al, 1995)。そこで、IL-2R $\beta c$  のチロシンリン酸化を抗リン酸化チロシン抗体を用いて測定した。その結果、 $\beta c^{-/-}$ /WTT 細胞では IL-2 刺激後 60 分以内に IL-2R $\beta c$  のチロシンリン酸化は消退するのに対し、 $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞では刺激後 60 分においてもチロシンリン酸化レベルは刺激後 10 分のものと変わらなかった (図 2-4F)。一方、Jak3 キナーゼのチロシンリン酸化レベルは  $\beta c^{-/-}$ /WTT と  $\beta c^{-/-}$ /A T 細胞で違いが無かった (図 2-4G)。従って、A 領域は、IL-2R $\beta c$  の細胞内領域のチロシンリン酸化を負に制御していることが判明した。



## 考察

サイトカイン受容体の細胞内ドメインにはそれぞれ特異的な機能を持つ領域が存在することが、培養細胞系を用いた多くの実験によって熱心に研究されてきた。培養細胞系はクローン株の樹立が容易であることなどから、シグナル伝達研究に広く使われてきた。しかし、培養細胞系にはいくつかの問題点がある。(1) クローン株樹立の過程で、人為的な選択がなされてしまう。(2) IL-2 によるシグナル伝達の研究に用いられている細胞株の中には、元来 IL-2R $\beta$ c を発現せず IL-2 には反応しないものも存在する。このような細胞系では、IL-2 に対する正常 T リンパ球でのシグナル伝達系が必ずしも全て作動していない可能性がある。(3) 細胞の分化における受容体の機能の解析はごく一部のケースを除き、培養細胞系で見ることが出来ない。

実際、培養細胞系を用いた報告間で食い違った結果が報告されているのが今日までの状況であった。IL-2R $\beta$ c の H 領域に関してはこの領域が増殖に関係ないとする報告 (Fujii et al., 1995) と、増殖に重要であるという報告 (Friedmann et al., 1996;

Goldsmith et al., 1995) がある。IL-2R $\gamma$ c の C 末領域の機能に関してはこれが *c-fos* 遺伝子の誘導に関与するという実験結果 (Asao et al., 1993; Asao et al., 1994) が報告されているが、一方関連はないとする実験結果もなされている (Nelson et al., 1996)。

また、IL-2 による増殖シグナル伝達には IL-2R $\beta$ c と IL-2R $\gamma$ c の細胞内領域が必須であるとされているが、ある細胞系によっては IL-2R $\beta$ c のホモ二量体化によっても増殖シグナルが伝達されるという結果も報告されている (Nelson et al., 1994)。このような、培養細胞系を用いることによって生じる可能性のある危険を避け、より生理的に意義のあるような条件下でサイトカイン受容体の細胞内領域の機能を解析することを目的として、本研究では IL-2R $\beta$ c 欠損マウス リンパ球にトランスジーンによってコー

ドされる IL-2R $\beta$ c を導入することによりその発現を回復させるという新規アプローチを取った。このアプローチは初代 T リンパ球における IL-2 応答や、リンパ球の分化を解析できるという利点を持っており、他のサイトカイン系にも応用されうるものである。その結果としてまず野性型、H 変異体、A 変異体のリンパ球での発現によって、 $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスにおいて観察された T 細胞の自発的活性化や B 細胞の分化の亢進は抑制された (図 2-2)。生体内において IL-2R $\beta$ c を介するシグナルが CD4<sup>+</sup> T 細胞の自発的活性化を防ぐメカニズムは判明していないが、少なくとも H 領域・A 領域は IL-2R $\beta$ c のこの機能に必須でないことが示された。

一方、 $\beta$ c<sup>-/-</sup> マウスでは NK 細胞の発生・分化が障害されている。本研究では、NK 細胞傷害活性試験とフローサイトメトリーという 2 つの異なるアッセイ系を用いて、H 領域が NK 細胞の発生・分化に欠くことができないことをはじめて明らかにした。H 領域は、IL-2 による Stat5 及び Stat3 の活性化に重要な領域であることから、IL-2 による Stat の活性化が NK 細胞の発生・分化を調整している可能性が示唆される。その一方、H 領域に共役する Stat 以外のシグナル分子が NK 細胞の分化に影響を与えている可能性も否定できない。IL-2 によって活性化される主要な Stat 蛋白である Stat5 ノックアウトマウスの解析や、リンパ球特異的に Stat5 の活性化を阻害するような実験系の解析によって、NK 細胞の分化における Stat の役割の理解が促されると思われる。

$\beta$ c<sup>-/-</sup>/H T 細胞は、抗 CD3 刺激や ConA 刺激に対して対照の  $\beta$ c<sup>+/+</sup> マウスと同等な反応を示したが、IL-2 によるいわゆる “comitogenic effect” は減弱していた。 $\beta$ c<sup>-/-</sup>/H T 細胞では、IL-2 による IL-2R $\alpha$  の発現の増強が全く観察されず、これが反応の減弱の一因であると考えられる。高濃度の IL-2 を加えて IL-2R $\alpha$  の必要性を減少させると、 $\beta$ c<sup>-/-</sup>/H T 細胞は  $\beta$ c<sup>+/+</sup> T 細胞とほぼ同程度の反応性を示した。IL-2R $\alpha$  ノックアウト

トマウスでも高濃度 IL-2 による反応性の回復が報告されており (Willerford et al., 1995)、今回の結果と良く一致する。一方、 $\beta c^{-/-}$  H T 細胞が、抗 CD3 刺激に対して良く反応するのに対して、IL-2R $\alpha$  ノックアウトマウスは反応性が悪い。この違いは、 $\beta c^{-/-}$  H T 細胞では基礎量の IL-2R $\alpha$  の発現があり、また、抗原・マイトジェン刺激によって IL-2R $\alpha$  の発現が誘導されることに起因するものと推測される。本実験で、Stat5 活性化と IL-2R $\alpha$  の発現に相関があることは、IL-2R $\alpha$  のプロモーターに Stat5 結合配列があり、Stat5 活性化と IL-2R $\alpha$  mRNA の発現とに相関があるとする報告とも合致するものである (Ascherman et al., 1997; John et al., 1996)。実際、 $\beta c^{-/-}$  H T 細胞では IL-2 による IL-2R $\alpha$  mRNA の発現が認められない (藤井、データ略)。以上のことから、H 領域は Stat5 活性化を介して IL-2R $\alpha$  の発現誘導を惹き起こし、IL-2 の受容体への親和性を高める役割を果たしていることが明らかとなった。更に、H 領域は増殖シグナル伝達に必須ではないことも明らかになった。これらの実験結果から、第 1 部で述べた H 領域の増殖に果たす役割に関する相反する実験結果を統一的に解釈することが可能となった。第 1 部で詳述した BAF-B03 細胞由来の細胞株では、H 領域は IL-2 による細胞増殖反応性に必須でなかった (Hatakeyama et al., 1989; Fujii et al., 1995)。BAF-B03 細胞では、構成的な IL-2R $\alpha$  の発現が認められることから、この系では IL-2 による IL-2R $\alpha$  の upregulation が増殖反応全体に占める意義はあまり高くない (Hatakeyama et al., 1989)。従って、この系では IL-2R $\alpha$  発現レベルの影響を受けることなく IL-2R $\beta c$  と IL-2R $\gamma c$  の細胞内領域から伝達される細胞増殖シグナルを解析していることになると考えられる。そして、その増殖シグナル伝達には H 領域及び Stat5 は必須ではない。それに対して、Stat5 活性化が増殖シグナル伝達に重要であると結論された 32D 細胞系では、IL-2 刺激がない場合には IL-2R $\alpha$  mRNA が殆

と検出されず、IL-2 刺激に伴って mRNA の誘導がされることから、IL-2 による IL-2R $\alpha$  の upregulation が増殖反応全体に強い比重を占めていることが推測される (Friedmann et al., 1996; Ascherman et al., 1997)。従って、この細胞系では IL-2R $\alpha$  の発現レベルの影響が全面に出てくる。この細胞系を用いた増殖反応の解析の報告では IL-2R の親和性の増大という要因を考慮に入れずに実験結果を評価した結果、あたかも Stat5 活性化が IL-2 からの増殖シグナル伝達に重要であるかのような結論が導き出されたと考えられる。

$\beta c^{-/-}$  A T 細胞が、IL-2 刺激に対して高い反応性を示したという実験事実は、予測し得ない全く新しい知見である。なぜなら、A 領域は Ras 経路の活性化などに重要であり、培養細胞系での実験からこの領域が増殖に対して正の役割を果たしていると考えられていたからである (Hatakeyama et al., 1989; Friedmann et al., 1996)。本実験での結果は、A 領域がこれとは逆に増殖に対して負の制御をかけている可能性を示唆している。実際、 $\beta c^{-/-}$  A T 細胞では、Stat5 の活性化や IL-2R $\beta c$  のチロシンリン酸化状態の異常な持続が認められ、こうしたことが増殖反応の増強に寄与していると考えられる。一方、Jak3 の活性化の経時変化には対照との間で殆ど違いはなかったことから、A 領域は IL-2R $\beta c$  のチロシンリン酸化や Stat5 の活性化を特異的に減衰させる機能を持っていることが考えられ、この領域によって制御されているチロシンフォスファターゼの存在が予想される。A 領域によって制御されている IL-2R $\beta c$  の脱リン酸化的機構の解明はこのようなフォスファターゼの同定を中心として今後の重要な課題である。

サイトカイン受容体の欠損マウスにそのサイトカイン受容体の変異体を発現させる、という本研究の方法は、そのサイトカイン受容体の様々な領域の役割を生理的条件下で検討するための強力なアプローチであることが示され、今後のサイトカイ



ンシグナル伝達の研究に広く利用できる可能性を示すものと考えられる。

## まとめ

本研究では、IL-2R $\beta$ c の機能について、培養細胞系を用いた *in vitro* のシステムと、発生工学的手法を用いた *in vivo* のシステムを用いて詳細に解析した。第1部では、培養細胞系を用いた解析により、IL-2 による Stat5 活性化には IL-2R $\beta$ c の C 末の H 領域が重要であることを明らかにした。また、この領域を欠失する変異体を発現する細胞株でも IL-2 による細胞増殖が惹起されたことから、少なくともある細胞系においては Stat5 活性化は細胞増殖に必須ではないということが示された。それでは、こうした細胞増殖誘導に必須ではない領域は生体内で如何なる役割を果たしているのだろうか？第2部では、第1部の知見を基にして、Stat5 活性化に重要な H 領域と、Src 型チロシンキナーゼや Ras 経路活性化に重要な A 領域という、どちらも培養細胞系の研究では細胞増殖に必須ではないとされている領域の生体内における機能を解析した。その結果、H 領域は実際 NK 細胞の分化に必須であることをはじめて明らかにした。また、この領域は IL-2R $\alpha$  の誘導を介して、IL-2 が細胞表面に結合する効率を上げていることをも明らかにした。一方、今回の実験結果より A 領域は予期に反して、細胞増殖を負に制御しているという全く新しい知見を得た。今後、本研究でのアプローチが、生体内でシグナル伝達分子の変異体の解析を行なうことにより培養細胞系での解析では不明であった受容体の新たな機能の解明及びそれを担う下流分子群の研究の更なる進展に貢献できることを期待したい。

## 謝辞

本研究をまとめるに当たり終始御指導下さいました東京大学医学部免疫学講座、谷口維紹教授に深く感謝いたします。また、数多くの貴重な御助言を頂いた田中信之助教授、瀧伸介講師、宮崎忠昭博士の各先生方に深く感謝致します。更に、NK細胞の解析に関して多大の寄与をして頂きました小笠原康悦博士に深く感謝申し上げます。加えて、大阪大学細胞生体工学センター遺伝子情報部門および東京大学医学部免疫学講座の皆様と下記の先生方に感謝致します。

Tularik Inc.

Dr. Steven L. McKnight

Dr. Ulrike Schindler

Institute for Experimental Cancer Research, Tumor Biology Center

Dr. Bernd Groner

Dr. Fabrice Gouilleux

St. Jude Children's Research Hospital

Dr. James N. Ihle

熊本大学医学部遺伝発生研究施設

山村 研一 教授

鈴木 操 助教授

Amgen Institute, Ontario Cancer Institute

Dr. Tak W. Mak

鈴木 治彦 博士

## 参考文献

- Asao, H., Takeshita, T., Ishii, N., Kumaki, S., Nakamura, M., and Sugamura, K. (1993). Reconstitution of the functional IL-2 receptor complexes on fibroblastoid cells: involvement of the cytoplasmic domain of the  $\gamma$  chain in two distinct signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4127-4131.
- Asao, H., Tanaka, N., Ishii, N., Higuchi, M., Takeshita, T., Nakamura, M., Shirasawa, T., and Sugamura, K. (1994). Interleukin 2-induced activation of JAK3: possible involvement in signal transduction for *c-myc* induction and cell proliferation. *FEBS Lett.* 351, 201-206.
- Ascherman, D. P., Migone, T.-S., Friedmann, M. C., and Leonard, W. J. (1997). Interleukin-2 (IL-2)-mediated induction of the IL-2 receptor  $\alpha$  chain gene. *J. Biol. Chem.* 272, 8704-8709.
- Beadling, C., Guschin, D., Witthuhn, B. A., Ziemiecki, A., Ihle, J. N., Kerr, I. M., and Cantrell, D. A. (1994). Activation of JAK kinases and Stat proteins by interleukin-2 and interferon  $\alpha$ , but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes. *EMBO J.* 13, 5605-5615.
- Boussiotis, V. A., Barber, D. L., Nakarai, T., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Bernstein, G. M., D'Andrea, A. D., Ritz, J., and Nadler, L. M. (1994). Prevention of T cell anergy by signaling through the  $\gamma$ c chain of the IL-2 receptor. *Science* 266, 1039-1042.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- Farrar, W. L., and Ferris, D. K. (1989). Two dimensional analysis of interleukin 2-regulated



tyrosine kinase activation mediated by the p70-75  $\beta$  subunit of the interleukin 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 12562-12567.

Friedmann, M. C., Migone, T.-S., Russell, S. M., and Leonard, W. J. (1996). Different interleukin 2 receptor  $\beta$ -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2077-2082.

Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner, B., Ihle, J. N., Minami, Y., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1995). Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor  $\beta$  chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5482-5486.

Fung, M. R., Searce, R. M., Hoffman, J. A., Peffer, N. J., Hammes, S. R., Hosking, J. B., Schmandt, R., Kuziel, W. A., Haynes, B. F., Mills, G. B., and Greene, W. C. (1991). A tyrosine kinase physically associates with the  $\beta$ -subunit of the human IL-2 receptor. *J. Immunol.* 147, 1253-1260.

Gilmore, K. G., and Reich, N. C. (1994). Receptor to nucleus signaling by prolactin and interleukin 2 via activation of latent DNA-binding factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6850-6854.

Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D. (1994). Utilization of the  $\beta$  and  $\gamma$  chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13, 2822-2830.

Goldsmith, M. A., Lai, S. Y., Xu, W., Amaral, M. C., Kuczek, E. S., Parent, L. J., Mills, G.

- B., Tarr, K. L., Longmore, G. D., and Greene, W. C. (1995). Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the  $\beta$  chain and non-tyrosine residues of the  $\gamma$  chain. *J. Biol. Chem.* 270, 21729-21737.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Shoenborn, M. A., and Ahdieh, M. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the  $\beta$  chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264, 965-968.
- Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., and Schreiber, R. D. (1994). Ligand-induced IFN $\gamma$  receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 13, 1166-1175.
- Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63, 303-312.
- Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S., and Kumagai, K. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag $^+$   $\alpha\beta$  T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol.* 154, 4333-4340.
- Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Leven, S. D., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the *sre*-family kinase p56 $^{lck}$ ; identification of novel intermolecular association. *Science* 252, 1523-1528.
- Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T., and Taniguchi, T. (1989). A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor  $\beta$  chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* 59, 837-845.

Hou, J., Schindler, U., Henzel, W. J., Ho, T. C., Brasseur, M., and McKnight, S. L. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265, 1701-1706.

Hou, J., Schindler, U., Henzel, W. J., Wong, S. C., and McKnight, S. L. (1995). Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity* 2, 321-329.

Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591-594.

Ihle, J. N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell* 84, 331-334.

Ihle, J. N., and Kerr, I. M. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: Jaks and Stats. *Trends Genet.* 11, 69-74.

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B., and Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* 19, 222-227.

John, S., Robbins, C. M., and Leonard, W. (1996). An IL-2 response element in the human IL-2 receptor  $\alpha$  chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I ( $\gamma$ ) and a GATA family protein. *EMBO J.* 15, 5627-5635.

Johnston, J. A., Kawamura, M., Kirken, R. A., Chen, Y.-Q., Blake, T. B., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., McVicar, D. W., and O'Shea, J. J. (1994). Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370, 151-153.

Kawahara, A., Minami, M., and Taniguchi, T. (1994). Evidence for a critical role for the

cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor  $\gamma$  chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5433-5440.

Kawahara, A., Minami, Y., Miyazaki, T., Ihle, J. N., and Taniguchi, T. (1995). Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor  $\gamma$ -chain-associated Jak3 in the IL-2-induced *c-fos* and *c-myc*, but not *bcl-2*, gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8724-8728.

Kimura, S., Abe, K., Suzuki, M., Ogawa, M., Yoshioka, K., Yamamura, K.-I., and Miike, T. (1997). 2.1 kb 5'-flanking region of the brain type dystrophin gene directs the expression of lacZ in the cerebral cortex, but not in the hippocampus. *J. Neuro. Sci.* 147, 13-20.

Kishimoto, T., Taga, T., and Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* 76, 253-262.

Kobayashi, N., Kono, T., Hatakeyama, M., Minami, Y., Miyazaki, T., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1993). Functional coupling of the *src*-family protein tyrosine kinases p59<sup>lck</sup> and p53/56<sup>lyn</sup> with the interleukin 2 receptor: implications for redundancy and pleiotropism in cytokine signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4201-4205.

Kono, T., Doi, T., Yamada, G., Hatakeyama, M., Minamoto, S., Tsudo, M., Miyasaka, M., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1990). Murine interleukin 2 receptor  $\beta$  chain: dysregulated gene expression in lymphoma line EL-4 caused by a promoter insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1806-1810.

Leonard, W. J., Noguchi, M., Russell, S. M., and McBride, O. W. (1994). The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain as a common  $\gamma$  chain,  $\gamma_c$ . *Immunol. Rev.* 138, 61-86.



Lin, J.-X., Migone, T.-S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., and Leonard, W. J. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2, 331-339.

Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245-267.

Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kobayashi, N., Kawahara, A., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1993). Association of p56<sup>lck</sup> with IL-2 receptor  $\beta$  chain is critical for the IL-2-induced activation of p56<sup>lck</sup>. *EMBO J.* 12, 759-768.

Minami, Y., Nakagawa, Y., Kawahara, A., Miyazaki, T., Sada, K., Yamamura, H., and Taniguchi, T. (1995). Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the *c-myc* induction pathway. *Immunity* 2, 89-100.

Minami, Y., Oishi, I., Liu, Z.-J., Nakagawa, S., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1994). Signal transduction mediated by the reconstituted IL-2 receptor: evidence for a cell type specific function of IL-2R $\beta$  chain. *J. Immunol.* 152, 5680-5690.

Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z.-J., Oishi, I., Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N., and Taniguchi, T. (1994). Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 266, 1045-1047.

Miyazaki, T., Liu, Z.-J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E. L., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1995). Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by *bcl-2*, *c-myc* and *lck* cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81, 223-231.

Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S., and Leonard, W. J. (1994). Heterodimerization of the IL-2 receptor  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain cytoplasmic domain is required for signalling. *Nature* 369, 330-333.

Nelson, B., Lord, J. D., and Greenberg, P. D. (1996). A membrane-proximal region of the interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 309-317.

Nelson, B. H., Lord, J. D., and Greenberg, P. D. (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 369, 333-336.

Nielsen, M., Svejgaard, A., Skov, S., and Ødum, N. (1994). Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat3 in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 3082-3086.

Quelle, F. W., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, S. M., Cleveland, J. L., Pierce, J. H., Keegan, A. D., Nelms, K., Paul, W. E., and Ihle, J. N. (1995). Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3336-3343.

Russell, S. M., Johnston, J. A., Noguchi, M., Kawamura, M., Bacon, C. M., Friedmann, M., Berg, M., McVicar, D. W., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Goldman, A. S., Schmalstieg, F. C., Ihle, J. N., O'Shea, J. J., and Leonard, W. J. (1994). Interaction of IL-2R $\beta$  and  $\gamma$ c chains with Jak1 and Jak3: Implications for XSCID and XCID. *Science* 266, 1042-1045.

Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K.-I., and Miyajima, A. (1993). Signal transduction

by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common  $\beta$  subunit responsible for different signaling. *EMBO J.* 12, 4181-4189.

Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Taniguchi, T. (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for *c-myc*. *Cell* 70, 57-67.

Shuai, K., Horvath, C. M., Tsai-Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., and Darnell, J. E., Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828.

Sims, S. H., Cha, Y., Romine, M. F., Gao, P.-Q., Gottlieb, K., and Deisseroth, A. B. (1993). A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 13, 690-702.

Smith, K. A. (1988). Interleukin 2: inception, impact and implications. *Science* 240, 1169-1176.

Stahl, N., and Yancopoulos, G. D. (1993). The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* 74, 587-590.

Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., and Takeshita, T. (1996). The interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 179-205.

Suzuki, H., Duncan, G. S., Takimoto, H., and Mak, T. W. (1997). Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor  $\beta$  chain. *J. Exp. Med.* 185, 499-505.

Suzuki, H., Kündig, T. M., Furlonger, C., Wakeman, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schnitz, R., Simard, J. J. L., Ohashi, P. S., Griesser, H., Taniguchi, T., Paige, C. J., and Mak, T. W. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor  $\beta$ . *Science* 268, 1472-1476.

Suzuki, M., Abe, K., Yoshinaga, M., Obinata, M., Furusawa, M., and Abe, K. (1996). Specific arrest of spermatogenesis caused by apoptotic cell death in transgenic mice. *Genes Cells* 1, 1077-1086.

Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.

Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73, 5-8.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the *c-fos* gene to serum factor. *Cell* 46, 567-574.

Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.

Wakao, H., Gouilleux, F., and Groner, B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.* 13, 2182-2191.

Waldmann, T. A. (1989). The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 875-911.

Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995).



Interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.

Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K. S., Cwik, C., Liu, E. T., and Ihle, J. N. (1994). Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370, 153-157.

Zhumabekov, T., Corbello, P., Tolaini, M., and Kioussis, D. (1995). Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J. Immunol. Methods* 185, 133-140.

図表

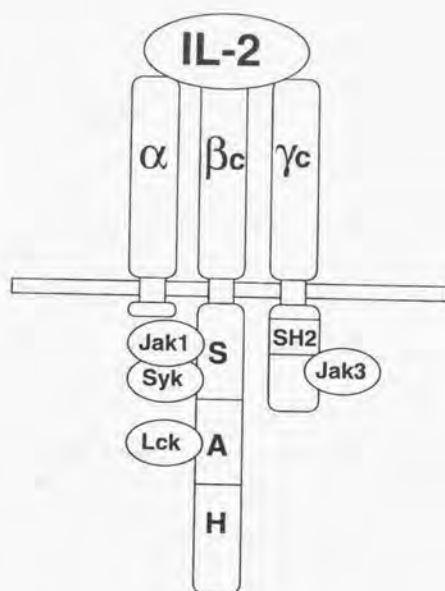


図 1-1A. IL-2 受容体及び共役している蛋白チロシンキナーゼ (PTK) の模式図

IL-2R $\beta_c$  の細胞内領域は serine-rich (S) 領域、acidic (A) 領域、H 領域の 3 つの領域に分けられる。IL-2R $\gamma_c$  の細胞内領域には SH2 (src homology 2) 様の領域がある。IL-2R $\beta_c$  の S 領域には Jak1 PTK 及び Syk PTK が、A 領域には Lck 等の Src 型 PTK が結合している。IL-2R $\gamma_c$  の C 末領域には Jak3 PTK が結合している。

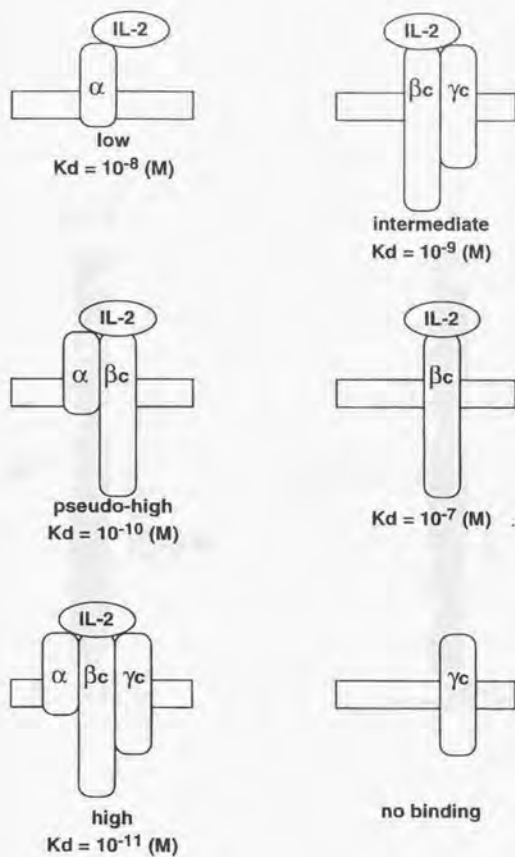


図 1-1B. IL-2R 複合体と IL-2 に対する親和性  
(Minami et al., 1993 より改変)

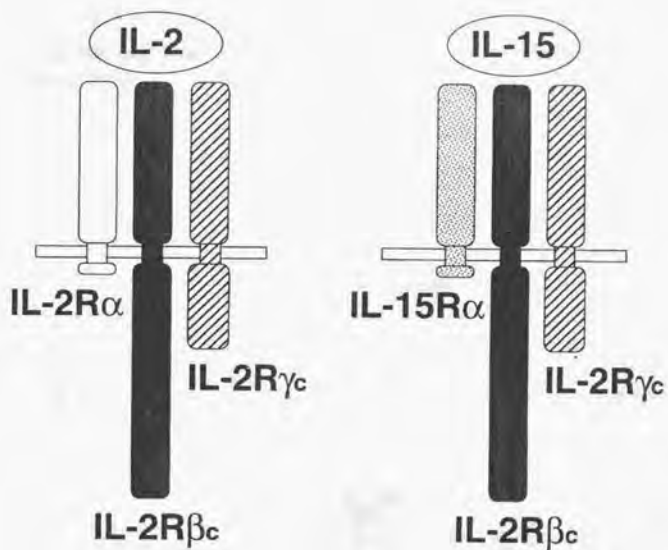
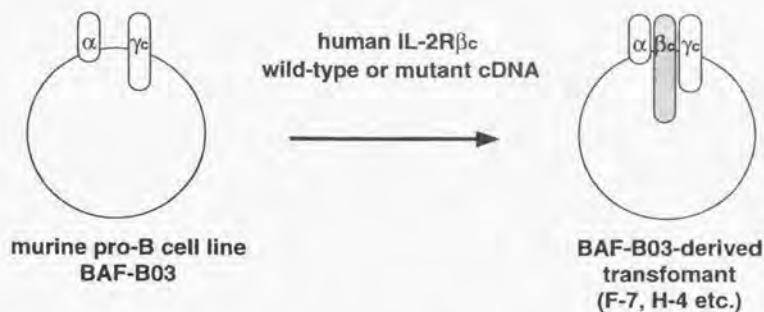


図 1-1C. サイトカイン共通鎖としての IL-2Rβc

IL-2Rβc は IL-2 と IL-15 受容体の共通サブユニットとして機能している。



(i)



(ii)



(iii)

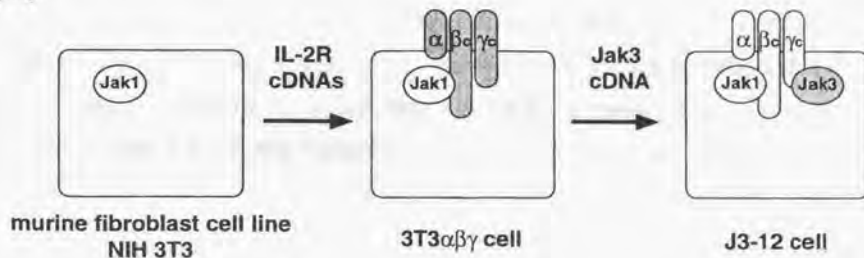


図 1-1D. 本実験で使用了細胞系の模式図  
(説明は次頁)

(i) マウス IL-3 依存性 pro-B 細胞由来の BAF-B03 細胞は IL-2R $\alpha$  と IL-2R $\gamma$ c を発現しているが IL-2R $\beta$ c を発現していない。この細胞に図 1-4A に示す各種ヒト IL-2R $\beta$ c の野生型及び変異体をコードする cDNA を発現させることによって、高親和性の IL-2R を再構成した。

(ii) FM1-3 は F-7 細胞に細胞内領域を欠いたヒト IL-2R $\gamma$ c 変異体をコードする cDNA を発現させた細胞。

(iii) マウス線維芽細胞株 NIH 3T3 にヒト IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ c、IL-2R $\gamma$ c をコードする cDNA を発現させ、高親和性 IL-2R を再構成した 3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞を樹立した。3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞にリンパ球系に特異的に発現している Jak3 キナーゼをコードする cDNA を発現させた細胞 J3-12 を樹立した。3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞は IL-2 刺激による増殖反応を示さなかったが J3-12 細胞は IL-2 依存性の細胞増殖能を獲得した (Miyazaki et al., 1994)。

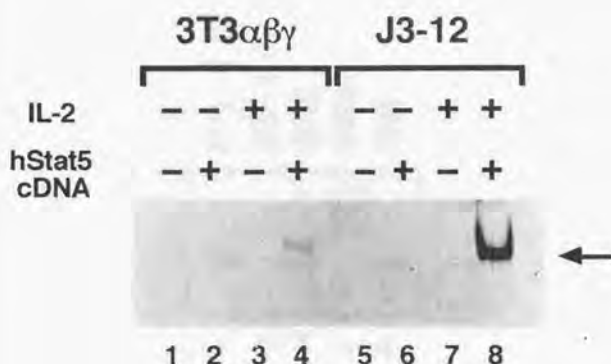


図 1-2A. IL-2R を再構成した NIH 3T3 由来細胞株における IL-2 依存性 Stat5 活性化

3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞は NIH 3T3 細胞にヒト高親和性 IL-2 受容体を再構成した細胞株であり、J3-12 細胞は 3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞に Jak3 を発現させた細胞株である。3T3 $\alpha\beta\gamma$  細胞及び J3-12 細胞に 10  $\mu$ g の pEF vector (対照) または pEF-hStat5 をトランスフェクトした。48 時間後から FCS を含まない培地に変え、更に 8 時間培養した。刺激は 5 nM の組み換えヒト IL-2 で 10 分間行った。細胞抽出液を  $^{32}$ P でラベルした IRF-1 GAS プローブと混合し、DNA - 蛋白複合体を 4% アクリルアミドゲルで分離後、オートラジオグラフィーで検出した。矢印は IL-2 で誘導される DNA - 蛋白複合体の位置を示す。

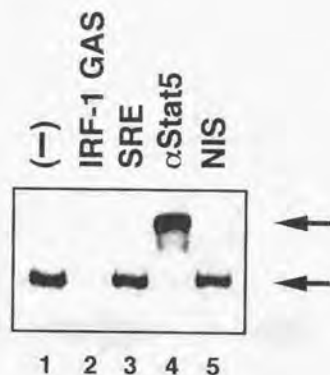


図 1-2B. IL-2 で誘導される DNA - 蛋白複合体に対する競合実験及びスーパーシフト実験

細胞抽出液を  $^{32}\text{P}$  でラベルした IRF-1 GAS プロープとその 100 倍量のラベルしていない IRF-1 GAS プロープまたは SRE プロープと混合した。スーパーシフト実験では、プロープとの混合前に細胞抽出液を NIS (nonimmune serum) または抗 Stat5 抗体 ( $\alpha\text{Stat5}$ ) と氷上で 1 時間インキュベートした。下側の矢印は IL-2 で誘導される DNA - 蛋白複合体の位置を、上側の矢印はシフトしたバンドの位置を示した。



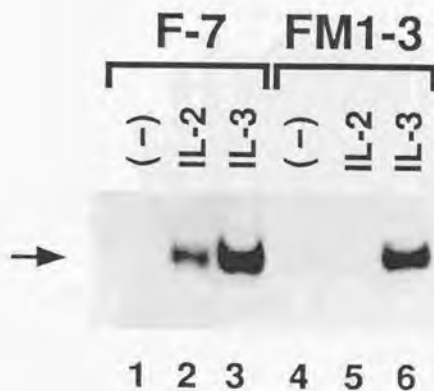


図 1-3A. BAF-B03 由来細胞株における Stat 蛋白の活性化

F-7 細胞、FM1-3 細胞を IL-2 (2 nM) または IL-3 (10% WEHI-3B 細胞培養上清) で 10 分間刺激した。細胞抽出液を  $^{32}\text{P}$  でラベルした IRF-1 GAS プロープと混合し、DNA-蛋白複合体を 4% アクリルアミドゲルで分離後、オートラジオグラフィーで検出した。矢印は IL-2 及び IL-3 で誘導される DNA-蛋白複合体の位置を示す。

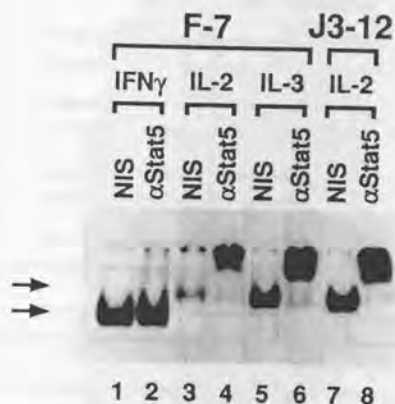


図 1-3B. 血球系細胞株における Stat5 活性化

F-7 細胞を IFN- $\gamma$  (25 U/ml)、IL-2 (2 nM) または IL-3 (10% WEHI-3B 細胞培養上清) で 10 分間刺激した。細胞抽出液を NIS (nonimmune serum) または 抗ヒツジ Stat5 抗体 ( $\alpha$ Stat5) と氷上で 1 時間インキュベートした後、 $^{32}$ P でラベルした IRF-1 GAS プロローブと混合し、DNA - 蛋白複合体を 4% アクリルアミドゲルで分離後、オートラジオグラフィーで検出した。下側の矢印は Stat1 のホモダイマーの位置を示し、上側の矢印は IL-2 及び IL-3 で誘導される DNA - 蛋白複合体の位置を示す。

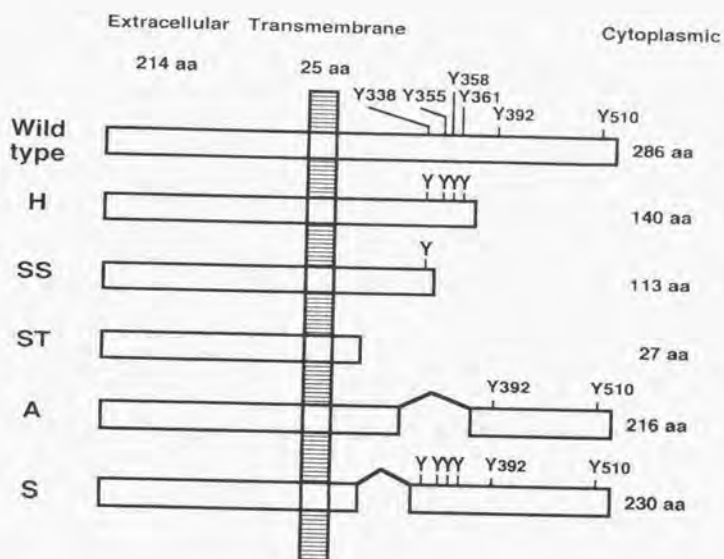


図 1-4A. IL-2R $\beta$ c 各種変異体の模式図

細胞内領域のチロシン残基の位置を Y510 (510 番目のチロシン) のように示した。H 変異体、SS 変異体、ST 変異体はそれぞれ 140 個、113 個、27 個のアミノ酸残基を持つ。A 変異体、S 変異体はそれぞれ膜近傍のセリンに富む領域 (S 領域: 56 アミノ酸)、S 領域に続く酸性アミノ酸に富む領域 (A 領域: 70 アミノ酸) を欠失させた変異体である。

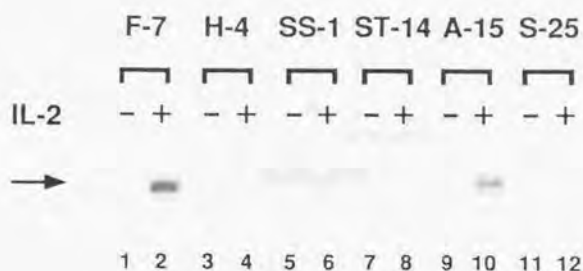


図 1-4B. IL-2 による Stat5 活性化における IL-2R $\beta$ c 末領域の必要性

IL-2R $\beta$ c の各種変異体を発現させた細胞株を 2 nM の IL-2 で 10 分間刺激した。細胞抽出液を調製し、 $^{32}$ P でラベルした IRF-1 GAS プロンプと混合後、4% アクリルアミドゲルで DNA-蛋白複合体を分離し、オートラジオグラフィーで検出した。



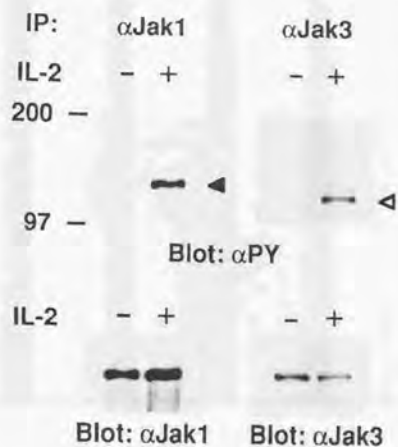


図 1-4C. H-4 細胞での IL-2 による Jak1 と Jak3 のチロシンリン酸化

H-4 細胞を 2 nM の IL-2 で 10 分間刺激した。細胞抽出液を調製し、Jak1 もしくは Jak3 に対する抗血清で免疫沈降を行った。免疫沈降物を 7.5% SDS-PAGE により分離後、抗リン酸化チロシン抗体 (αPY) でウェスタンブロットを行った (上側)。Jak キナーゼの蛋白量をそれぞれの抗 Jak キナーゼ抗体で確認した (下側)。Jak キナーゼの位置を矢印で示した。分子量を kDa 単位で示した。

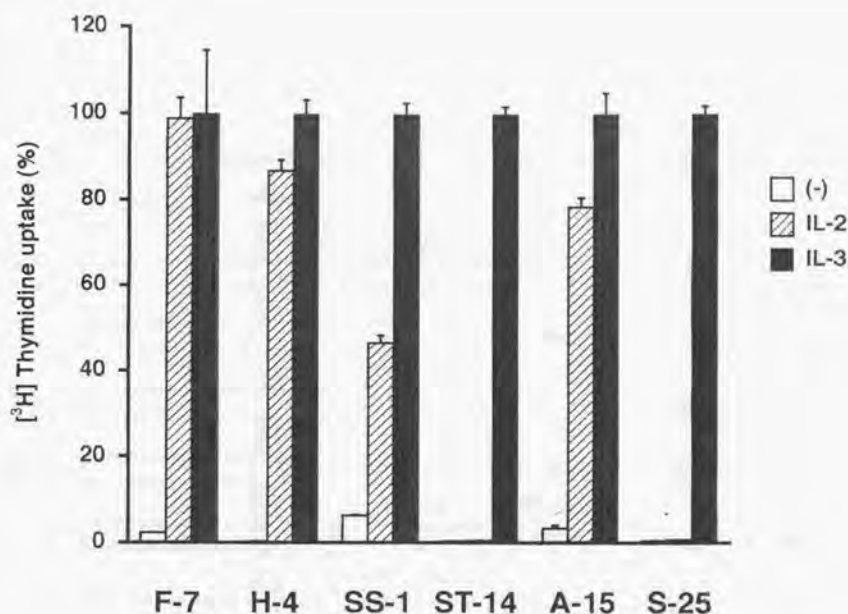


図 1-5. BAF-B03 由来のクローン株の IL-2 による細胞増殖

5 x 10<sup>4</sup> 細胞をヒト IL-2 (2 nM) または IL-3 (10% WEHI-3B 細胞培養上清) を加えた RPMI 1640 培地 / 10% FCS で 96 穴プレートで 24 時間培養した。細胞の回収前 4 時間、1  $\mu$ Ci の [<sup>3</sup>H] チミジンを培養液に加えその取り込みを測定した。 [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みは IL-3 の取り込み量に対するパーセンテージで示した。IL-3 による取り込みは次の通り：F-7、324,842  $\pm$  47,321 cpm；H-4、403,263  $\pm$  13,213 cpm；SS-1、218,141  $\pm$  5,727 cpm；ST-14、374,093  $\pm$  6,647 cpm；A-15、273,088  $\pm$  13,408 cpm；S-25、395,377  $\pm$  7,428 cpm。エラーバーは 4 つの測定値の標準偏差を表す。F-7、H-4、SS-1、A-15では IL-2 による長期にわたる細胞増殖も観察されている（データ略）。

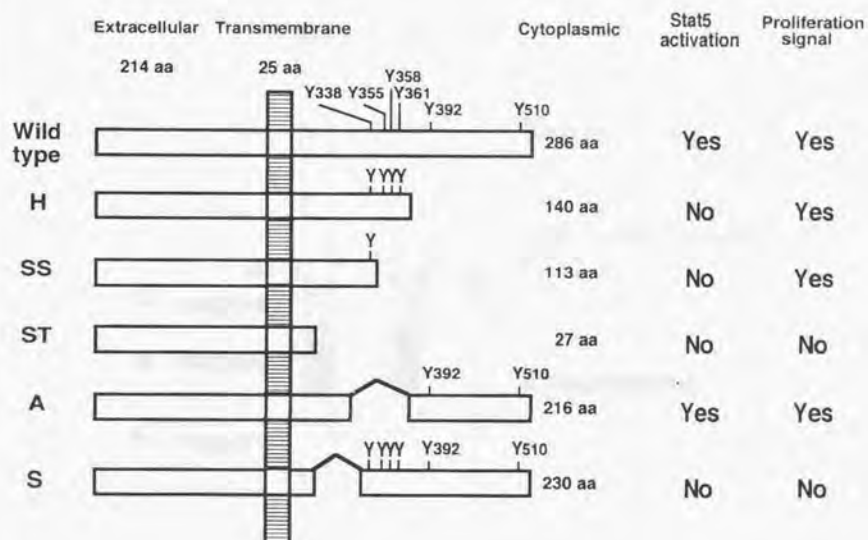


図 1-6. IL-2R $\beta$ c 各種変異体における Stat5 の活性化能、細胞増殖能のまとめ

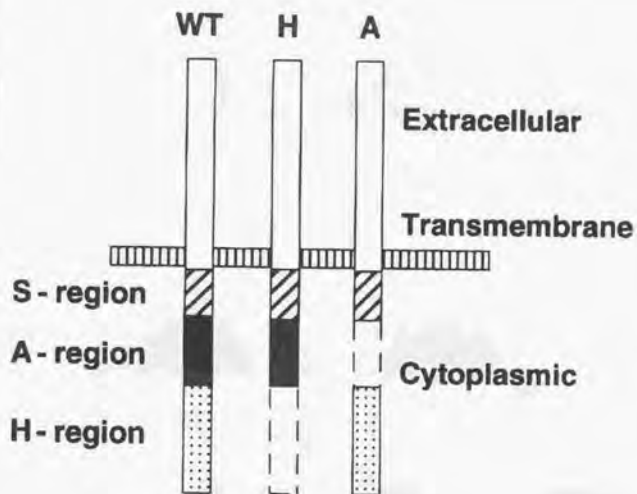


図 2-1A. トランスジーン構築物の模式図

H 変異体、A 変異体は、それぞれマウス IL-2R $\beta$ c の C 末の H 領域 (131 アミノ酸) または A (acidic) 領域 (68 アミノ酸) を欠失している。H 変異体、A 変異体とも膜近傍の S (serine-rich) 領域を保持している。

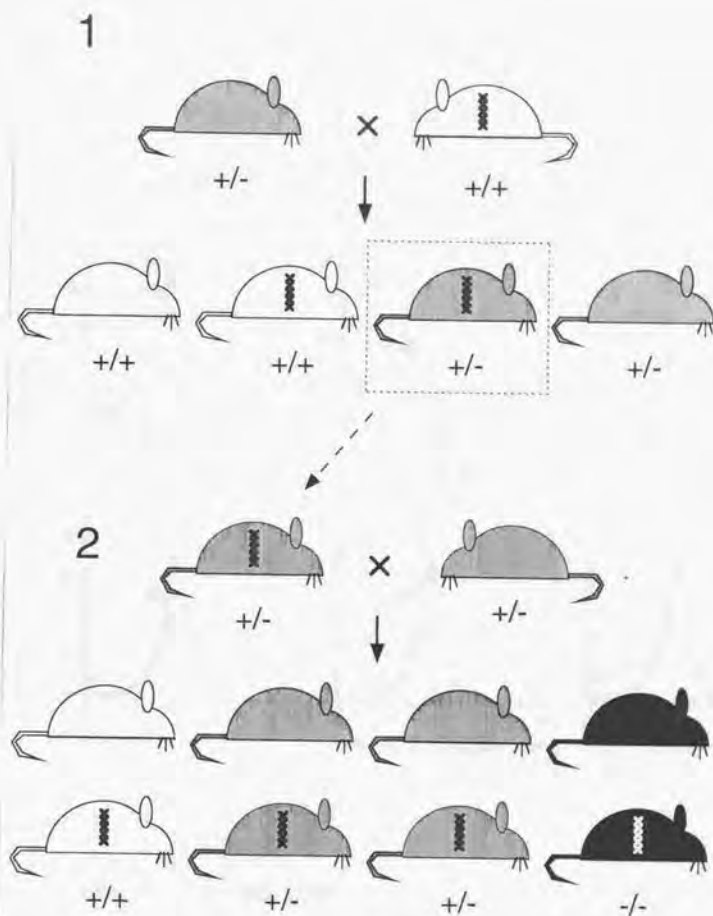


図 2-1B.  $\beta c^{-}/Tg$  マウスを作製するための交配の手続き

IL-2R $\beta c$  に関する遺伝子型は陰影によって示した。野生型は白、ヘテロ接合体は灰色、ホモ接合体は黒である。トランスジーンの有無は、2重らせんの記号で示した。



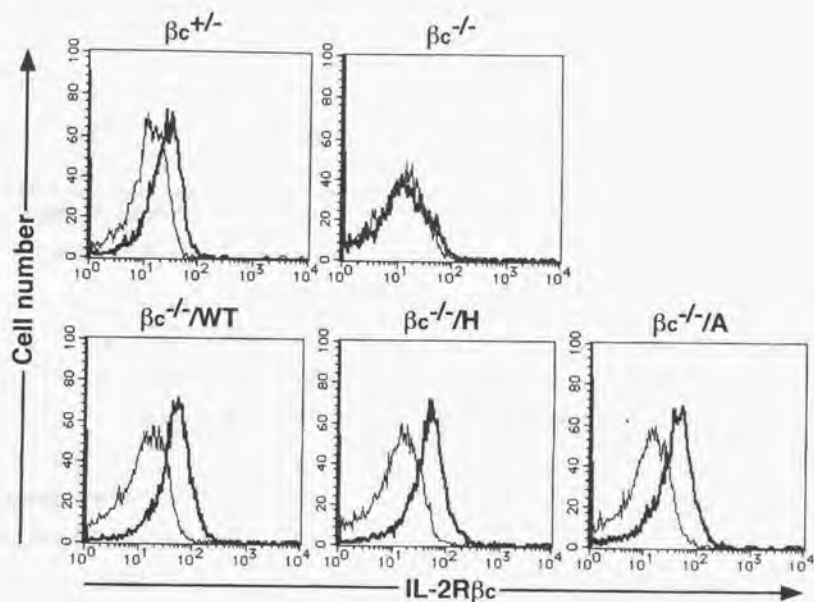


図 2-1C. 脾細胞における IL-2Rβc の発現

6 週齢の  $\beta c^{-/-}/Tg$  マウスより脾細胞を調製し、5  $\mu g/ml$  の concanavalin A (ConA) 存在  
 化で 3 日間培養し、IL-2Rβc に対する mAb (PE ラベル) と CD3 に対する mAb  
 (FITC ラベル) で染色した。CD3<sup>+</sup> 細胞にゲートを設定し、無染色 (細線) と IL-  
 2Rβc での染色 (太線) のデータをヒストグラムに示した。

表 2-1. IL-2R $\beta$ c 欠損マウスで見られる血球系の異常

---

CD4<sup>+</sup> T 細胞の自発的活性化

B 細胞の形質細胞への異常な分化

B 細胞の消失

IgG1 と IgE の増加

自己抗体の出現 (抗 DNA 抗体、抗核抗体)

自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) による 12 週齢までの死亡

顆粒球の増加

T 細胞機能の異常

増殖刺激に対する無反応性

抗原特異的免疫反応の消失

腸管上皮間リンパ球 (IEL) の集団構成の変化

Natural Killer (NK) cell の消失

---

Suzuki et al., Science (1995) 268, pp. 1472 - 1476

Suzuki et al., J. Exp. Med. (1997) 185, pp. 499 - 505

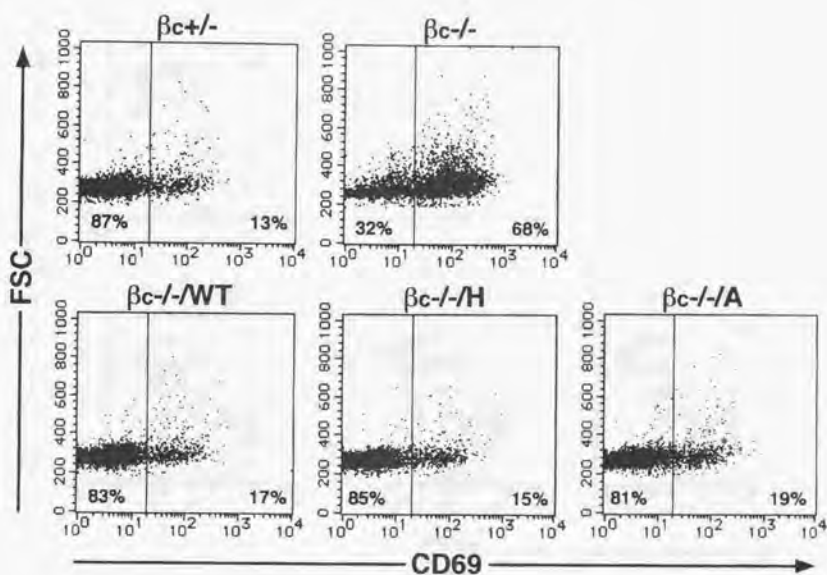


図 2-2A.  $\beta c^{-/-}$  Tg マウスのリンパ節細胞の解析

8週齢のマウスのリンパ節細胞をT細胞マーカーであるCD3と初期T細胞活性化マーカーであるCD69に対する抗体で染め、CD3<sup>+</sup>細胞におけるCD69の発現を調べた。

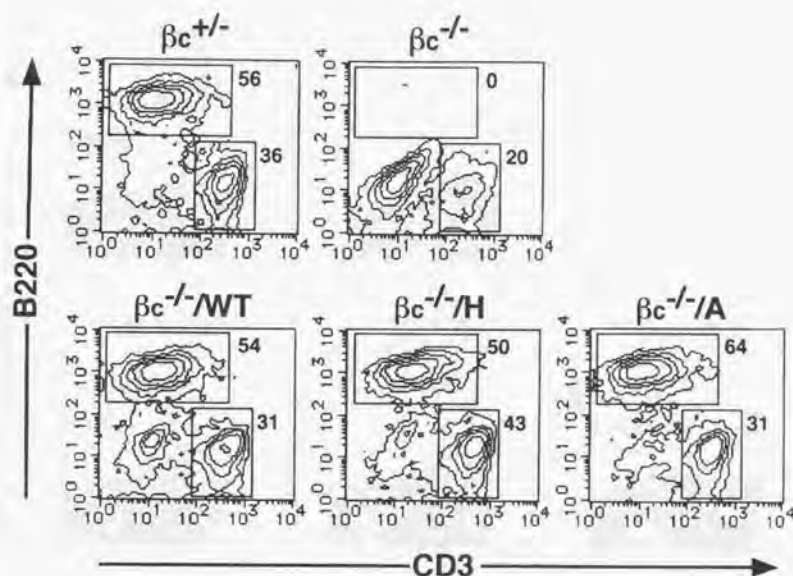


図 2-2B.  $\beta_c^{-/-}/Tg$  マウスの脾細胞の解析

8 週齢のマウスから、脾細胞を調製し、T 細胞マーカーである CD3 及び B 細胞マーカーである B220 に対する mAb で染色した後、FACScaliber で解析した。数値はその象限内の細胞の百分率を示す。

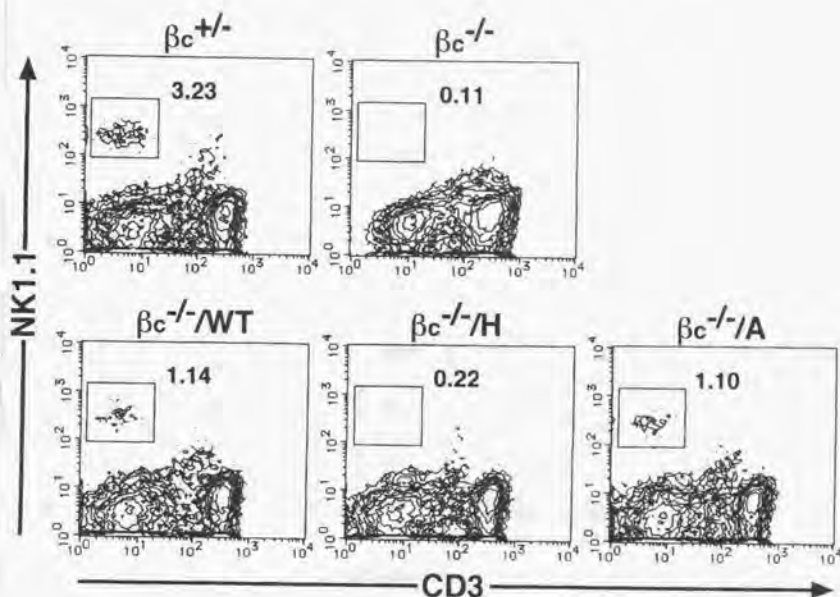


図 2-3A.  $\beta_c^{+/-}$  Tg マウスの NK 細胞表面の NK1.1 及び CD3 のフローサイトメトリー解析

脾細胞を抗 NK1.1 抗体と抗 CD3 抗体で染め、10,000 個のリンパ球を測定した。数値はゲート内の細胞の割合を示す。



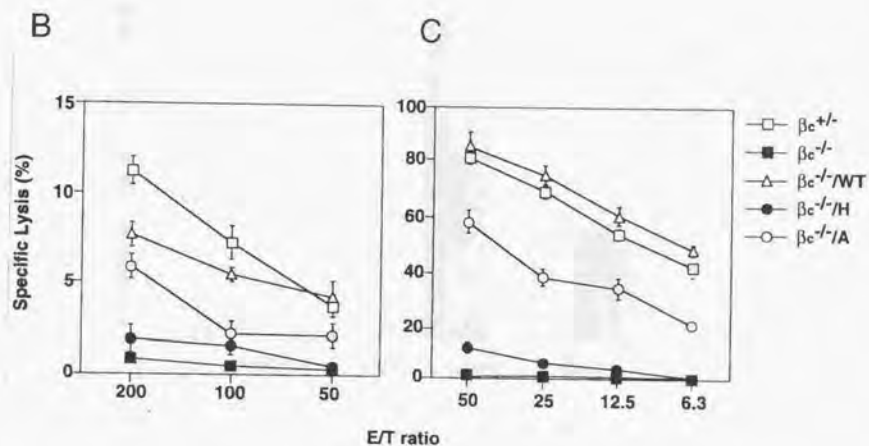


図 2-3B, C.  $\beta_c^{-/-}$ Tg マウスのNK 細胞傷害活性

8 週齢マウスより調製した脾細胞 (B) または、IL-2 によって *in vitro* で培養した 脾細胞 (C) による YAC-1 標的細胞の破壊。

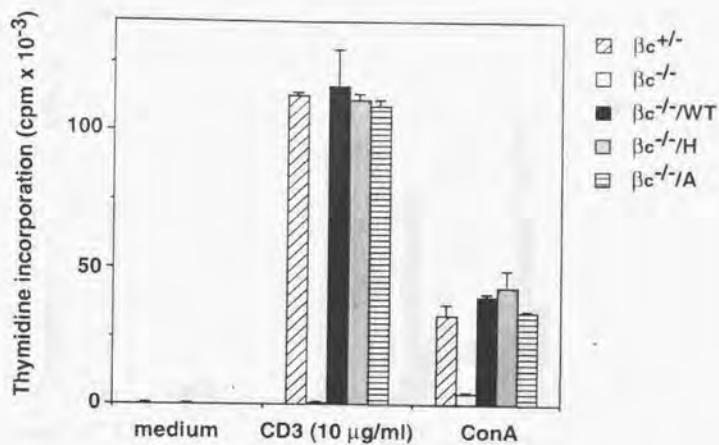


図 2-4A. T リンパ球の増殖

6 週齢の β<sub>c</sub><sup>-/-</sup>/Tg マウスの脾細胞を培地のみ、抗 CD3 抗体 (10 μg/ml)、または ConA (5 μg/ml) 存在下で培養した。72 時間後、[<sup>3</sup>H] チミジンでパルスし、取り込みを測定した。

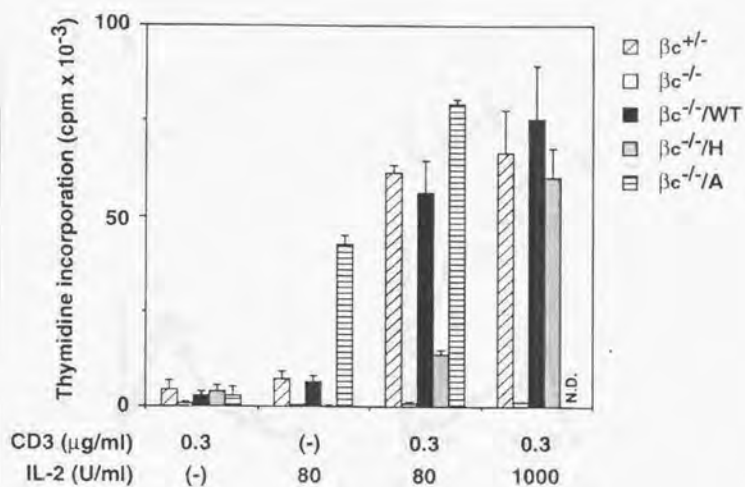


図 2-4B. IL-2 による comitogenic effect

脾細胞を、抗 CD3 抗体 (0.3 μg/ml)、IL-2、抗 CD3 抗体と IL-2 の組み合わせで刺激し、<sup>3</sup>H チミジンの取り込みを測定した。

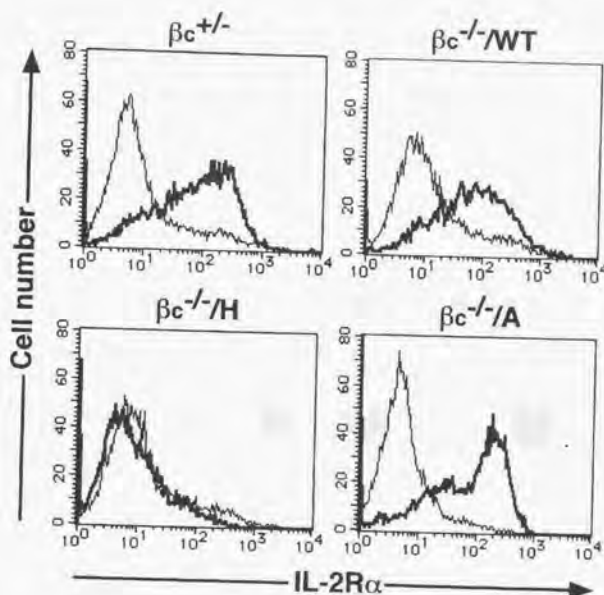


図 2-4C.  $\beta c^{-/-}/Tg$  マウスのリンパ球における IL-2R $\alpha$  の発現

$\beta c^{-/-}/Tg$  マウスから調製した脾細胞を培地のみ（細線）または抗 CD3 (0.3 mg/ml) と IL-2 (80 U/ml)（太線）で 4 日間培養し、抗 CD3 抗体と抗 IL-2R $\alpha$  抗体で染色した。データは CD3 $^{+}$  細胞における IL-2R $\alpha$  の発現を示す。

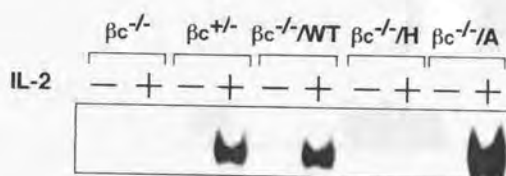


図 2-4D. Stat5 DNA 結合活性

6 週齢の  $\beta c^{+}/Tg$  マウスの脾細胞を ConA で 3 日間培養し、洗浄後さらに 16 時間培養し、500 U/ml の IL-2 で 10 分間刺激して細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を EMSA により解析した。



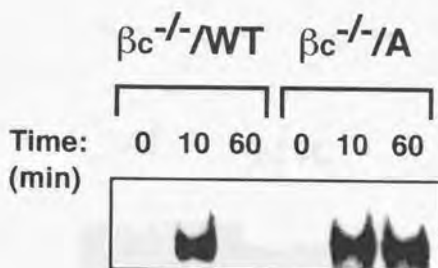


図 2-4E.  $\beta_c^{-/-}/A$  マウス脾細胞における IL-2 による Stat5 活性化の持続

ConA 刺激した脾細胞を洗浄 12 時間後に 80 U/ml の IL-2 で標記の時間刺激し、細胞抽出液を調製した。Stat5 活性化は EMSA によって解析した。

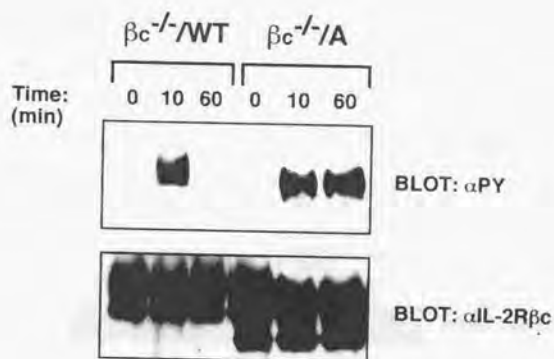


図 2-4F.  $\beta_c^{-/-}$ /A マウス脾細胞における IL-2 による IL-2R $\beta_c$  のチロシンリン酸化の持続

ConA 刺激した脾細胞を洗浄 12 時間後に 80 U/ml の IL-2 で標記の時間刺激し、細胞抽出液を調製した。IL-2R $\beta_c$  を抗 IL-2R $\beta_c$  mAb (TM- $\beta$ 1) で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体 ( $\alpha$ PY: 上側) または IL-2R $\beta_c$  に対する抗血清 (下側) で免疫プロットを行なった。

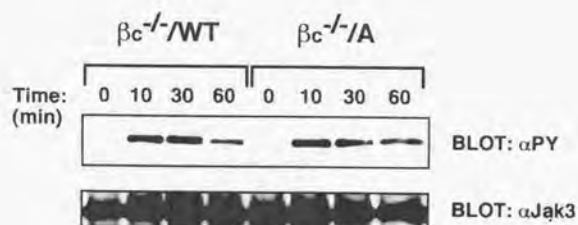


図 2-4G.  $\beta_c^{-/-}/WT$  および  $\beta_c^{-/-}/A$  マウス脾細胞における Jak3 の活性化

細胞抽出液は、図 2-4E と同様に調製し、Jak3 に対する抗血清で免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体 ( $\alpha PY$ : 上側) または抗 Jak3 抗体 ( $\alpha Jak3$ : 下側) で免疫ブロットを行なった。

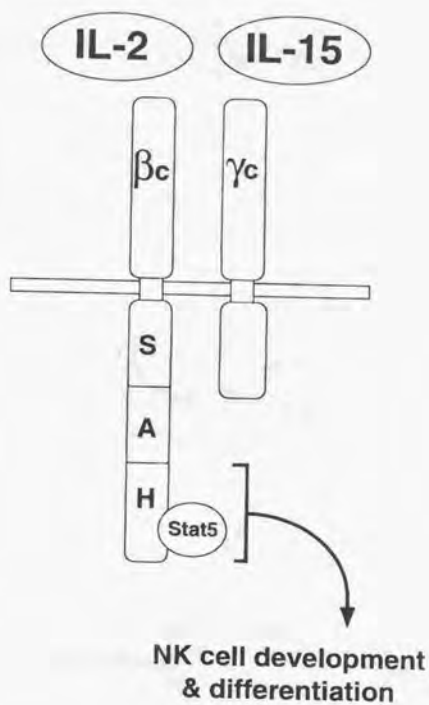


図 2-5. NK 細胞の分化における IL-2R $\beta_c$  H 領域の役割

H 領域は恐らくは Stat5 活性化を介して NK 細胞の分化を誘導する。

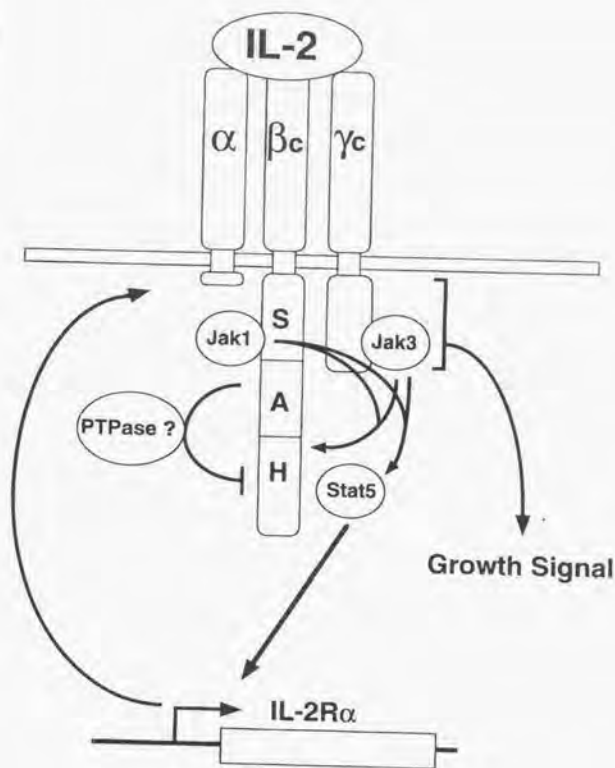


図 2-6. T 細胞の増殖における H 及び A 領域の役割

H 領域は Stat5 活性化を介して IL-2R $\alpha$  の発現を誘導し、高親和性 IL-2R を増加させて IL-2 のシグナル伝達効率を増加させる。A 領域は IL-2R $\beta$ c のリン酸化チロシンの脱リン酸化によって IL-2 シグナル伝達を負にも制御している。H 及び A の両領域とも IL-2R からの増殖シグナル伝達に必須ではない。



Figure 1

Figure 2



Figure 3

Figure 4

Figure 5

