

マクロファージの抗腫瘍活性化シグナルに及ぼす 受容体型チロシンホスファターゼ CD45 の役割

片桐達雄, 深沢耕平, 梅川正夫

1. 概要

免疫学的監視理論に基づけば、我々の体内では常に癌の芽とも言うべき異常細胞が常にどこかで一定の割合で発生しており、その異常細胞を免疫担当細胞が早期に殺傷するため、そう簡単には、癌の発症に至らないと考えられている。この時、癌細胞を正常細胞より識別し、殺傷する免疫担当細胞群には、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞そして抗腫瘍マクロファージ(M ϕ)が重要な役割を果たしており、これらの殺し屋細胞達は、抗腫瘍エフェクター細胞群と呼ばれている。それぞれの細胞は、各々独自の異常細胞認識機構を介して、異常細胞を殺傷することが明かされ、各々の細胞は異なる研究スピードで解析されている。これらの抗腫瘍エフェクター細胞群の中で最も研究の立ち後れているのが抗腫瘍M ϕ である。我々はこの抗腫瘍M ϕ について、活性化メカニズムを細胞内シグナル制御の観点、特にチロシンリン酸化/脱リン酸化のシグナル伝達システム解析という観点から研究しようと試みた。そこで、研究の端緒としてリンパ球の抗原認識において非常に重要な役割を持つCD45をまず研究標的とした。CD45は、白血球およびリンパ球表面に豊富に存在する細胞膜型のチロシン脱リン酸化酵素(PTP)である。CD45のM ϕ の抗腫瘍活性化における役割は、現在全く不明である。そこで、我々は、CD45ノックアウトマウス由来のM ϕ (CD45KOM ϕ)と野生型M ϕ の抗腫瘍活性化を比較検討した。また、CD45の特異的阻害剤を野生型M ϕ と培養M ϕ 細胞株に作用させることにより、先天的にCD45を欠失したM ϕ で得られた実験結果の再現が得られるか否かを検討した。実験の結果、腫瘍細胞株を標的とした抗腫瘍アッセイではCD45欠失M ϕ もしくはCD45阻害剤処理M ϕ は、正常M ϕ よりも強い抗腫瘍活性を示すことが明かとなった。一方、CD45KOM ϕ では、正常M ϕ よりもTNF- α (Tumor Necrosis Factor α)産生誘導能力が劣っていた。また、CD45阻害剤で処理した正常M ϕ でもTNF- α 産生の阻害が認められた。これらの結果は、一見、相反するものであるが、以前より、過剰産生されたTNF- α は、抗腫瘍エフェクター分子として機能せず、むしろ、腫瘍の増殖を強めるという報告があり、これらの報告に基づけば、我々の結果は納得のいくものである。また、CD45欠失もしくはCD45阻害剤による細胞内シグナルへの影響は、特にJNK(Jun N-terminal kinase)の活性化が観察された。JNK活性化と抗腫瘍活性の発現の因果関係を詳細に解析する必要があるのはもちろんであるが、抗腫瘍M ϕ 誘導という観点からは、CD45阻害剤を適宜用いること、あるいはJNKを活性化させることで臨床的な癌治療に応用が出来る可能性が示されたことは意義深い。

2. 背景

免疫系は「非自己」であるもの（細菌やウイルスなど）を排除するシステムであり、進化の過程で内なる非自己である腫瘍を免疫系が認識し、これを排除すべく免疫応答していることが明らかとなった。最終的に腫瘍細胞を傷害するエフェクター機構の主要役であると考えられているのは、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞そして活性化マクロファージ（M ϕ ）である¹⁻³。これらのうちキラーT細胞は腫瘍抗原特異的T細胞抗原受容体を介して活性化する²。また、ナチュラルキラー細胞は主要組織適合性抗原（MHC）を認識する独自の受容体を介するシグナルで活性化する³。一方、活性化M ϕ は腫瘍細胞を如何に認識し、さらに如何にして傷害するかはほとんど不明である¹。少なくとも、細かな局所的メカニズムを度外視して、腫瘍細胞をT細胞抗原受容体で認識したヘルパーT細胞の産生するサイトカインによる活性化を介して、腫瘍細胞を殺傷するモノカインを産生して腫瘍を攻撃するというシナリオは有力である¹。1980年代より、M ϕ はIFN- γ （Interferon- γ ：主に活性化されたT細胞より産生されるM ϕ 活性化作用のあるタンパク質）によるPriming、次いでLPS（Lipopolysaccharide：グラムネガティブ細菌の菌体成分で免疫活性化作用のある糖脂質）によるTriggeringにより活性化され、癌細胞を破壊することが報告されている⁴⁻⁶。その後の免疫学の進歩により、インターフェロンの受容体を介したM ϕ 活性化機構の大筋やトル様受容体（TLR）を介したM ϕ の活性化機構はかなり理解が進んできた。すでにIFN- γ の受容体がクローニングされ、受容体タンパクの理解は進んだ。この受容体刺激による細胞内シグナルは、Ca²⁺シグナル伝達系⁴⁻⁷、JAK/STAT系^{9, 10}とMAPK系^{11, 12}によりiNOS（誘導型一酸化窒素合成酵素）が転写翻訳され、NO（一酸化窒素）を産生することは明らかにされた¹⁰。一方、LPSの受容体に関する研究も進み、LPS結合タンパクであるLBPおよびそれらの受容体であるCD14がTLR4と相互作用することで細胞内にシグナルが通じることが明らかとされた。さらに、TLR4を介してMyD88依存的経路や非依存的経路により^{11, 12, 13}、サイトカインが産生されるというアウトラインが報告されているに至っている。また、高濃度のLPS刺激では、LPS単独でもNOが産生されることも報告されている¹⁴。このように、IFN- γ やLPSによる細胞内シグナルは、これらの受容体の本質が明らかとされることにより、着実に理解が進んでいる。もちろん、個々の細胞内シグナル伝達機構の詳細に関しては、現在でも不明な点が多い。なかでも、これらの受容体を介した細胞内シグナルのそもそもの開始シグナルが如何にして発火するのかに介しては全く分かっていない。他方、抗原受容体を介するシグナル研究が先行しているT細胞とB細胞においては、活性化シグナル開始がタンパク質チロシン脱リン酸化酵素（Protein Tyrosine Phosphatase：PTP）により、制御されたリン酸化酵素であるSrc family kinase (SFK)の活性化に端を発することが明らかになっている^{15, 16}。特にT細胞とB細胞そしてナチュラルキラー細胞の活性化には、PTPの中でもCD45がシグナル制御の最上流に位置することが示されている¹⁷。このことから、当然、M ϕ の抗腫瘍活性化の起点もCD45が担うものと予想され、本研究が企画された。

CD45は全ての有核造血系細胞表面に多量に発現し、以前は白血球共通抗原（LCA）として、白血球の細胞表面マーカーとして、多くの研究に寄与してきた¹⁷⁻¹⁹。タンパク質としての分類としては、I型膜貫通タンパク質であり、細胞内領域は2つのProtein Tyrosine Phosphataseドメイン（PTPドメイン）からなる、受容体型チロシンホスファターゼである。2つのPTPドメインのうち、ホスファターゼ活性が認められるのは、N末側のPTPドメインのみであり、C末側のPTPドメインは基質との結合やホスファターゼ活性の制御に関与

しているのではないかと考えられている^{20, 21)}。また、CD45 のホスファターゼ活性の制御機構については、二量体化することにより相互に酵素活性を抑制する「ウェッジモデル」が提唱されている²²⁻²⁵⁾。このモデルによると、CD45 の膜貫通部位直下に存在するアミノ酸配列ループ（ウェッジ）が互いに立体干渉することで、相互の PTP 活性を阻害するとしている。しかしながら、近年の CD45 細胞内ドメインの結晶解析により、立体的に「ウェッジモデル」が不可能であることが示されている^{26, 27)}のだが、このモデルはあまりにも美しく研究者を引きつけるモデルであるため根強く支持されている。このため CD45 自身のホスファターゼ活性の制御機構については、未だ議論が続いている。

CD45 に関する上述の報告やこれから述べるシグナル伝達への関与は、1989 年から 1992 年にかけて次々と樹立された CD45 欠損 T 細胞株、そして 1996 年に作製された CD45 欠損マウス（9 番目のエクソン欠損）を用いた研究が大いに貢献している^{28, 29)}。最も研究が進んでいる T 細胞において、CD45 欠損マウスでは T 細胞の発生・分化に異常がみられ、未熟な胸腺細胞（CD4+CD8+）の分化段階で停止し、CD45 欠損 T 細胞株では T 細胞抗原受容体（TCR）を介した抗原刺激を与えても活性化しないことが報告されている^{27, 28)}。また、CD45 欠損未熟 B 細胞株では B 細胞抗原受容体（BCR）を介したシグナルが刺激以前から亢進しており、正常な制御がなされないことが報告されている^{30, 31)}。これら TCR や BCR を介した活性化には、前述のように SFK と呼ばれるチロシンキナーゼによるリン酸化シグナル伝達が必須であることが知られている。そして、この SFK を正にも負にも制御しうるポテンシャルを持つ分子が CD45 なのである^{18, 19)}。

一方、CD45 はサイトカイン受容体のシグナル伝達にも重要な役割を担っていることが報告されている³²⁻³⁴⁾。サイトカインが受容体に結合すると、その細胞内ドメインに会合した Janus kinase (JAK) を介して細胞内にシグナルが伝達される。ここで、CD45 は JAK ファミリーである JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2 に結合し、これらの分子を直接脱リン酸化することが示されている。つまり、CD45 分子は JAK ファミリーの脱リン酸化を促進することにより、サイトカイン受容体からのシグナルを負に制御しているとされている。

さらに、マスト細胞やナチュラルキラー細胞の抗原受容体シグナル形成に必須であることが明らかとされている³⁵⁻³⁸⁾。このように、免疫担当細胞における CD45 の重要な役割が次々と解明されて入るにもかかわらず、Mφ における役割は、未だに明らかとされていない。

3. 材料と方法

マウス

CD45 欠損マウス²⁸⁾は、Background Strain が C57BL/601aHsd である B6.129-*Ptprc*^{tm1Hollm}/J（17-25 週齢、雄あるいは雌）を富山大学大学院・医学薬学研究部医学領域・免疫学講座より恵与されたものを用いた。Control mice は、C57BL/6 Jms（17-25 週齢、雄あるいは雌）を日本エスエルシー株式会社（Hamamatsu Japan）より購入した。また、BALB/c（17-25 週齢、雄あるいは雌）は日本エスエルシー株式会社（Hamamatsu Japan）より購入した。

細胞

マクロファージ細胞株 RAW 264.7

RAW 264.7 (murine macrophage cell line)³⁹⁾を American Type Culture Collection (ATCC, USA) より購入して用いた。細胞培養には Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wako, Japan) (以下、Wako と略記) に 10%の非働化したウシ胎仔血清 (Nichirei Biosciences, JAPAN), 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol (Wako) とするように加え、さらに抗生物質として Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (Wako) を 10 units/mL Penicillin, 10 μ g/mL Streptomycin, 25 ng/mL Amphotericin B とするように加えたもの (これを DMEM completed Medium; DCM とする) を用いた。細胞は 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養し、2-3 日毎に継代した。継代時には細胞を Phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄した後、1×Trypsin EDTA (Invitrogen, USA) (以下、Invitrogen と略記) を用いて細胞を剥がし、細胞数を調整して培養した。継代あるいは実験に用いた PBS の調製には、すべて Wako の特級試薬を用いた。

TGC 誘導腹腔滲出マクロファージ (Peritoneal-elicited Macrophage; PEMs) の調製

5% TGC solution (TGC 培地顆粒; Nissui Pharmaceutical Co., Ltd, Japan) を PBS で希釈した後、高温加圧滅菌 (120°C, 20 min) し、冷蔵保存したものをマウス腹腔内に 500 μ L 投与した。投与 5 日後、HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Wako) を用いて、腹腔内を洗浄して細胞を回収した。回収した細胞を遠心 (1800 rpm, 5 min) した後、顕微鏡下でマクロファージをカウントし、24 well plate (MULTIWELL™ 24-well Tissue Culture Plate; Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, USA) (以下、Becton Dickinson と略記) に播き、培養した。2 時間後、37°C pre-warmed RPMI-1640 medium で 2 回洗浄して浮遊細胞を除去し、付着した細胞を TGC 誘導腹腔滲出マクロファージとした。

試薬

LPS は Lipopolysaccharide (E. Coli, 0111: B4) (Sigma-Aldrich Co., USA) (以下 SIGMA と略記) を用いた。PTP CD45 特異的阻害剤として PTP CD45 Inhibitor (Santa Cruz, USA) (sc-222223)³⁹⁾を用いた。

Western blot 解析には以下の試薬と抗体を用いた。

Albumin, from Bovine Serum (以下 BSA と略記) (cat. No. A7906) (Wako)、Phospho-p42/44 MAP Kinase (pERK1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (lot. #20) (cat. #9101S) (Cell Signaling Technology, Int., USA) (以下 Cell Signaling と略記)、p42/44 MAP Kinase (ERK1/2) Antibody (lot. #20) (cat. #9102) (Cell Signaling)、phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (lot. #10) (cat. #9251S) (Cell Signaling)、SAPK/JNK Antibody (lot. #5) (cat. #9252) (Cell Signaling)、phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody (lot:#16) (cat. #9211S) (Cell Signaling)、p38 MAPK Antibody (lot. #8) (Cat. #9212) (Cell Signaling)、I κ B- α Antibody (cat.# 9242S) (Cell Signaling)、HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (lot. #749183A) (cat. #656120) (Invitrogen, USA)

以上の抗体は添付カタログの指示にしたがって希釈した。一次抗体及び二次抗体の希釈には GELATIN (SIGMA) を 0.5w/v%添加した TBS (Tris-buffered saline: 2 mMTris, 50 mMNaCl, pH 7.4) を用いた。

FACS

抗腫瘍活性の測定には、標的細胞中の CFSE の蛍光測定して行った。詳細は結果の Fig. 1 に示す。標的細胞とエフェクターMφの表面マーカー解析には、以下の抗体を用いてそれぞれの基礎検討を行った。Anti-TLR4 (MTS 5101) PE (Phycoerythrin) Antibody (lot. #A0203) (cat. #sc-13591 PE) (Santa Cruz Biotechnology, USA) (以下 Santa Cruz と略記)、Anti-CD45 Antibody (104)²¹⁾、Protein A-FITC conjugate は、矢倉英隆博士 (東京都医学研究機構・神経細胞機能研究分野・参事研究員) より恵与された。

FACS 解析は FITC を加え、または加えずに、遮光し 30 分間氷冷した。FACS buffer (3 % FCS, 0.2 % NaN₃-PBS) を加えて細胞を洗浄し、FACS Canto™ II を用いて蛍光測定を行った。画像解析には Win MDI を用いた。

TNF-α の測定

RAW 264.7 を DCM に再懸濁し、24 well plate に 5×10^5 cells/well ずつ播き、37°C, 5% CO₂ の条件下で 2 時間インキュベートした。実験を行った 24 well plate を plate ごと冷凍し、解凍した後に細胞を含む培養液を遠心チューブに回収して遠心 (15000rpm, 4°C, 10 sec) し、上清の TNF-α 産生レベルを Murine TNF-alpha ELISA Development Kit (Peprotech, USA) (900-K54) を用いて測定した。スタンダードとしてリコンビナントマウス TNF-α を用いて、TNF-α の産生レベルを ELISA により測定した。

Cell Lysate の調製

実験後の細胞は遠心チューブに回収して遠心 (1500 rpm, 5 min) した後に、pellet に 1% TNE (1% Triton-X100, 150 mMNaCl, 10mMTris pH 8.0, 1 mM Na₃VO₄, 1mM EDTA, 10 μg/mL Aprotinin) 20 μL を加えて懸濁させ、氷上で 10 分静置して溶解した。この溶解液を遠心チューブに回収して遠心 (15000rpm, 4°C, 10 sec) し、この上清を Cell Lysate として用いた。

1% TNE を調製するのに用いた試薬は以下の通りである。Triton™X-100 (Cat. No. 93443) (SIGMA)、Na₃VO₄ (Cat. No. 450243) (SIGMA)、Aprotinin (Cat. No. A6279) (SIGMA) を用いた。その他の試薬は全て Wako の特級試薬を用いた。

SDS-PAGE と Western blot 解析

調製した Cell Lysate を Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (以下、Bio-Rad と略記) (5% 2-mercaptethanol 添加) と 1:1 で混合し、95°C で 10 分間加熱し、室温まで冷却したものを SDS-PAGE で展開した。SDS-PAGE は、全て 10% アクリルアミドゲルを用いた。泳動条件は以下の通りである。15 mA/gel で 30 分間電気泳動後、25 mA/gel で泳動した。装置は、ミニプロティアン III (Bio-Rad) を用いた。泳動後、ゲルを Blotting buffer (25 mMTris, 192 mM Glycine, 20 % v/v Methanol, pH 8.3) で平衡化した。平衡化後のゲルを Pure nitrocellulose membrane (Bio-Rad) に 90V, 2 時間 transfer した。Transfer 後のメンブレンは、5% BSA-TBS にて over night blocking 後、TTBS (0.05% Tween 20-TBS, pH 7.4) で 2 回、TBS で 2 回洗浄した。この洗浄は 1 回につき 5 分間洗浄した。洗浄後、メンブレンは一次抗体と 4°C で over night

反応させた。次に、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄し、二次抗体と 1 時間反応させた。反応後、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄し、ECL 発色キット (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., UK) で処理した後、FUJI MEDICAL X-RAY FILM RX-U (FUJIFILM Corporation, JAPAN) 上に露光した。また、同一メンブレンを再び blot する 場合には HRP の阻害剤である NaN_3 (5 % NaN_3 -TBS) を用いて、HRP の活性を非可逆的に阻害した。Tween 20 は Wako の特級試薬を用いた。

4. 結果

CFSE 染色腫瘍細胞株を標的とした抗腫瘍活性の測定

CFSE は長時間細胞質中に留まる蛍光色素であり、CFSE 染色された細胞は、細胞分裂にしたがって段階的に CFSE 蛍光強度が半減する。この CFSE で染色した標的腫瘍細胞を $\text{M}\phi$ と共培養した後、標的細胞を回収してフローサイトメトリー (FACS) で解析することにより、 $\text{M}\phi$ の抗腫瘍活性を測定した。エフェクターとなる $\text{M}\phi$ と染色された腫瘍細胞の共培養イメージを Fig. 1A に示した。CFSE 染色直後を Day 0 とし、Day 1、Day 2 と細胞分裂に伴う段階的蛍光強度の半減、細胞数の増加、細胞の大きさ、および細胞内顆粒の状態を測定したパターンを Fig. 1B に示した。FS (Forward Scatter) / SS (Side Scatter) プロットでは、生存細胞の大きさ、および細胞内顆粒状態を示した典型的なパターンが示され、CFSE ヒストグラムでは、培養日数による CFSE の段階的蛍光強度の半減、およびピークの増加を示した典型的なパターンが示された。

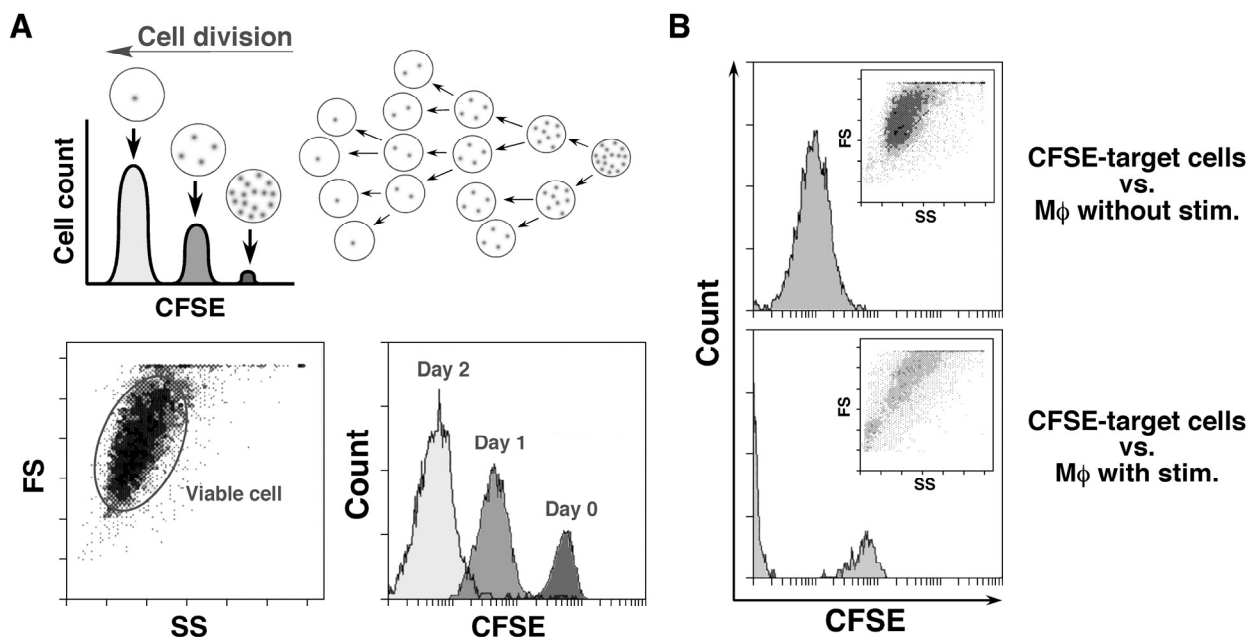


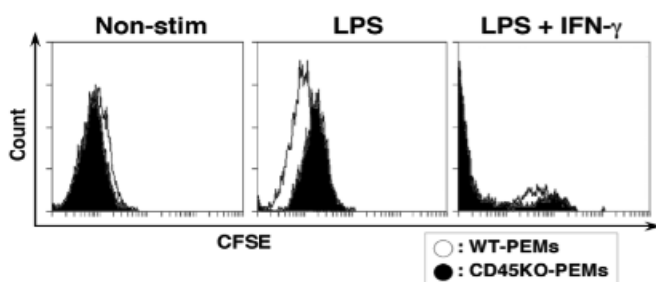
Fig. 1 CFSEで染色した腫瘍細胞を標的とした抗腫瘍活性測定法 (CFSE法) の概略
 A: CFSE法の測定原理とフローサイトメトリー解析パターン
 B: CFSE法による $\text{M}\phi$ 抗腫瘍活性測定パターン

共培養に用いる $\text{M}\phi$ として、マウス腹腔より採取した腹腔滲出 $\text{M}\phi$ (PEM) を用いた実験例を Fig. 1B に示した。無刺激 PEM ($\text{M}\phi$ without stim) と共培養した標的腫瘍細胞は、共培養の影響が全く見られず、順調に増殖した事を示す CFSE の蛍光減少パターンを示した。一方、LPS + $\text{IFN-}\gamma$ 刺激により活性化した PEM ($\text{M}\phi$ with

stim)と共培養した標的腫瘍細胞は、FS/SS プロットより、傷害された細胞を示すパターンが示された。また、CFSE ヒストグラムより、標的腫瘍細胞は増殖抑制された状態を示す CFSE 高蛍光強度でのピークが観察されると共に、傷害され減少した細胞を示す低下したピーク高が示された。このように細胞傷害および細胞増殖抑制を同時かつ詳細な抗腫瘍活性パターンとして評価できることが示されたので、以下本研究において Mφ の抗腫瘍活性はこの抗腫瘍アッセイ系を用いて算出した。

CD45 の有無が Mφ の抗腫瘍活性に及ぼす効果

A



B

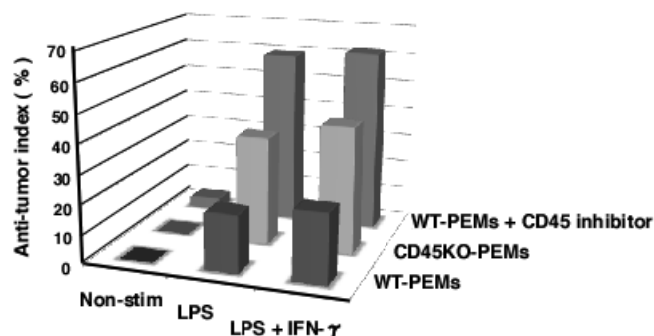


Fig. 2 正常およびCD45KOマウスの腹腔Mφ (PEM) の in vitro 抗腫瘍活性とCD45阻害剤の抗腫瘍活性に及ぼす効果

A: Fig1に示した方法で野生型マウスより得た腹腔Mφ (WT-PEM) とCD45KOマウスより得たPEM(CD45KO-PEM)の抗腫瘍活性を測定した。PEMを無処理で標的腫瘍細胞と共培養した場合が左パネル、LPS (100ng/mL) で刺激後、標的細胞と共培養した結果を中央パネル、PEMをLPS (100ng/mL) とIFN-γ (50U/mL)で刺激した後、標的細胞と共培養した結果を右パネルに示した。

B:Aと同様の方法で、WT-PEMとCD45KO-PEM、そしてCD45 inhibitor (20 μM処理をしたWT-PEMを、それぞれ刺激無し、LPS (100ng/mL)、LPS (100ng/mL) +IFN-γ (50U/mL)で刺激した後、標的細胞と共培養した結果を算出して三次元棒グラフで示した。Anti-tumor index (%)は、 $ATI = (\text{実験群の総蛍光強度} - \text{対照群の総蛍光強度}) / (\text{実験群の総蛍光強度} + \text{対照群の総蛍光強度}) \times 100$ で示した。

CFSE法を用いて、CD45 ノックアウトマウスの腹腔より調製した Mφ (CD45KO-PEMs)の抗腫瘍活性を測定し、野生型マウスの腹腔より調整した Mφ (WT-PEMs)と比較実験を行った結果を Fig. 2 に示した。

無刺激において、CD45KO-PEMs および WT-PEMs の抗腫瘍活性は、ほとんど認められなかった (Fig. 2A パネル左端)。一方、LPS 単独刺激において、WT-PEMs は抗腫瘍活性がわずかにしか認められなかった (Fig. 2A パネル中央と Fig. 2B 最前列中央棒グラフ、Anti-tumor index[※]: ATI=18)にもかかわらず、CD45KO-PEMs は、細胞増殖抑制が認められた (Fig. 2A パネル中央と Fig. 2B 前から二番目列中央棒グラフ ATI=33)。さらに、LPS + IFN-γ 刺激において、CD45KO-PEMs は WT-PEMs に対して、より強い抗腫瘍活性を示した (Fig. 2A パネル右端と Fig. 2B 最前列右端棒グラフ)。WT-PEMs (ATI=23)に対して、CD45KO-PEMs (ATI=42)であった。また、このような抗腫瘍活性に及ぼす効果が CD45 の有無に依存して生じたのか否かを確認するため、CD45 の活性を阻害する薬剤 (CD45 inhibitor) を用いて抗腫瘍活性測定を行った。この結果、CD45 を正常に発現する野生型の PEM においても CD45 の活性を抑制することで抗腫瘍活性は増強されることが明らかとなった (Fig. 2B 最後列棒グラフ)。CD45 阻害剤処理 WT-PEMs の ATI は、LPS 刺激時で ATI=59、LPS+IFN-γ 刺激時で ATI=61 であった。[※]

ATI は、Fig2 のレジェンドに示したように算出した。このインデックスでは、マクロファージの活性化が全くなければ、数値は 0 となり、Mφ の活性化が強いと数値は 100 に近づく。

次に CD45KO-PEMs が WT-PEMs に比べて強い抗腫瘍活性を示す原因として、抗腫瘍 PEMs より産生される TNF- α の関与を検討した。

CD45 が Mφ の TNF- α 産生に及ぼす効果

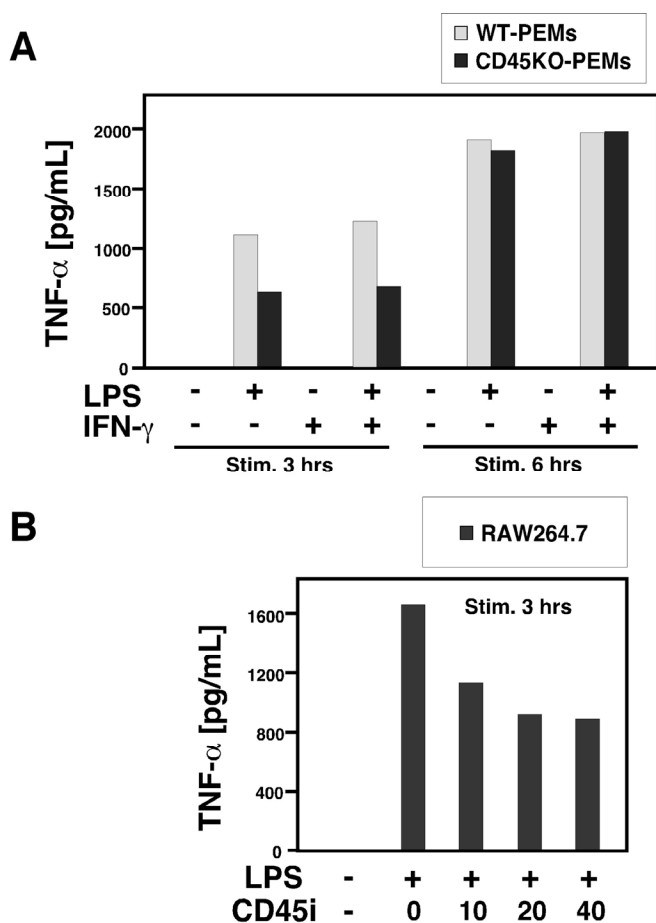


Fig. 3 活性化MφのTNF- α 産生に及ぼすCD45の影響とCD45阻害剤の抗腫瘍活性に及ぼす効果
A: 無刺激、LPS (100ng/mL)、またはLPS (100ng/mL) + IFN- γ (50U/mL)で刺激したMφを図に示した時間培養して上清に放出されたTNF- α の濃度をELISAで測定した結果を示した。MφはWT-PEMとCD45KO-PEMである。
B:Aと同様の方法で、TNF- α の産生量を測定しているが、Bでは、腹腔Mφ (PEM) ではなく、Mφ細胞株のRAW264.7を用い、CD45 inhibitorを図に示した濃度 (10-40 μ M) で加えてTNF- α の産生量を測定した。

TNF- α は、Tumor necrosis Factor- α の略であり、文字通り腫瘍を壊死させる抗腫瘍活性化 Mφ より産生されるモノカインとして知られている⁴¹⁾。一般的な認識としては、腫瘍細胞の増殖抑制の直接実行分子として考えられており、多くの論文では、単純に Mφ の抗腫瘍活性と同義に扱われている^{41, 42)}。そこで、CD45 欠失 Mφ と正常 Mφ および正常 Mφ を CD45 阻害剤で処理した場合の TNF- α 産生量を測定した。この結果を Fig. 3 に示した。実験計画時の予想に反し、CD45KO-PEM では、野生型の PEM よりも TNF- α 産生量はむしろ低いことが明らかとなった (Fig. 3A)。特に Mφ を LPS で刺激して 3 時間時点での TNF- α 産生量は、野生型 Mφ (WT-PEMs) の産生量の約半分であった。刺激後 6 時間の時点では、ほとんど差が無くなるが、これは培養液中に産生された TNF- α の量が飽和してしまったため、もしくは TNF- α 検出系での検出量が飽和点に達したためと考えら

れる。

さらに、CD45 ノックアウトマウス由来の Mφ で得られた結果を検証するため、Mφ の細胞株として LPS 産生シグナルの解析が進んでいる RAW264.7 を Mφ ソースとした実験を行った (Fig. 3B)。RAW264.7 Mφ セルラインは、LPS 刺激により、正常 Mφ と同等の TNF-α 産生が認められるため、TNF-α 産生に至るシグナル解析によく用いられている細胞である。この TNF-α 産生系に 10-40 μM の CD45 阻害剤⁴⁰⁾を添加すると、TNF-α 産生は、阻害剤無添加時の半分にまで低下した。

CD45 の有無が Mφ の細胞内シグナル IκB と MAPK に及ぼす効果

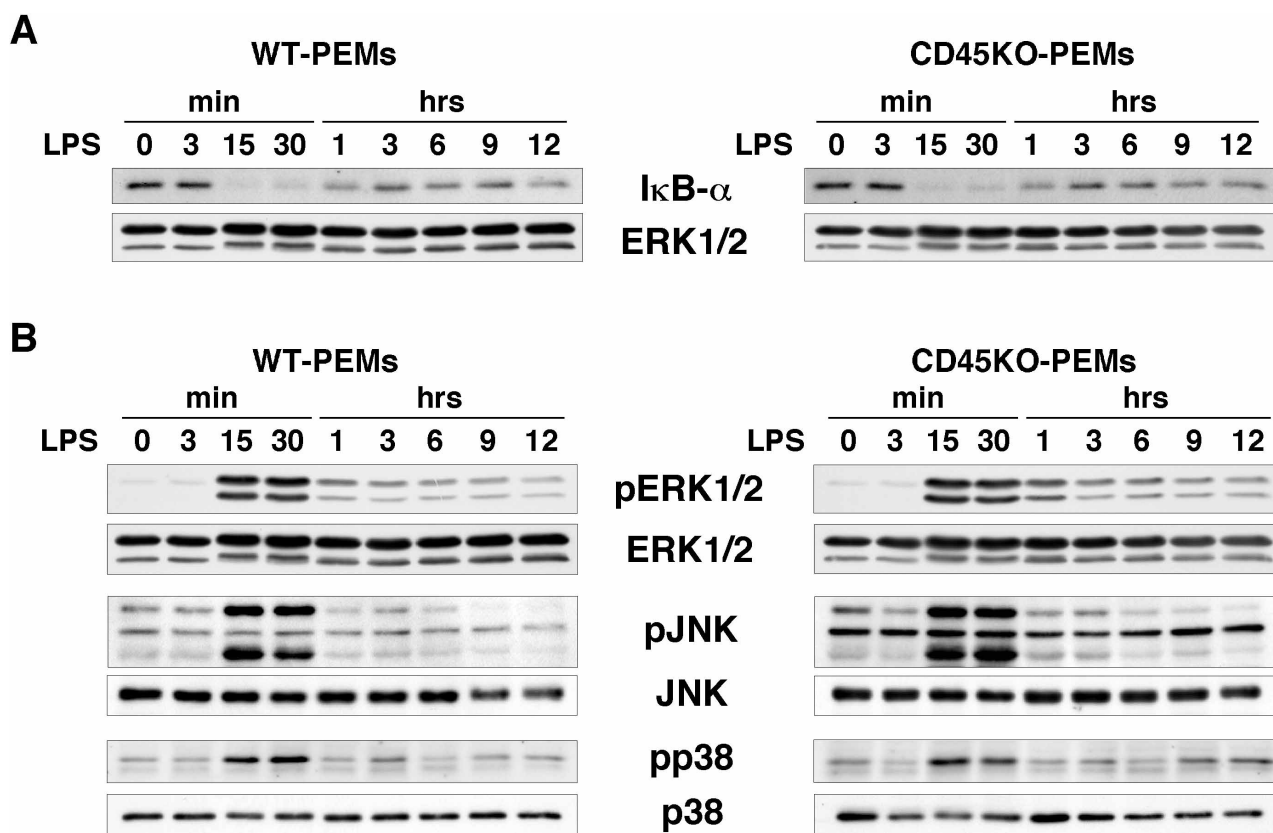


Fig. 4 Mφ の細胞内シグナル IκB の分解と MAPK のリン酸化に及ぼす CD45 の影響

A: 野生型腹腔 Mφ (WT-PEM) と CD45 ノックアウトマウスの腹腔 Mφ (CD45KO-PEM) を LPS (100ng/mL) で図に示した時間間隔刺激した後、速やかに細胞を可溶化し、ウエスタンブロット法で細胞中の IκB 検出を行った。下に示す ERK1/2 は各ライゼートに含まれるタンパク量に著しい違いがないことを示すコントロールである。

B: A と同様の細胞と刺激時間で細胞を可溶化しウエスタンブロット法で ERK, JNK, p38 のリン酸化を検討した。リン酸化の検出はそれぞれのタンパク質のリン酸化特異抗体を用いた。

CD45 欠失もしくは CD45 阻害剤による Mφ の抗腫瘍活性の増強と TNF-α 産生抑制という相矛盾するデータが、細胞内のシグナル伝達分子のリン酸化の際として検出されるか否かを検討するため、LPS 依存的に誘導される IκB-α の分解と MAPK リン酸化についてシグナル解析を行った。

この結果を Fig. 4 に示した。IκB-α はリン酸化された後、ユビキチン化により分解されることにより、NF-κB が核内に移行し、TNF-α や炎症性サイトカインなどを誘導することが知られている⁴³⁾。したがって、LPS

刺激 15-30 分後で見られる $I\kappa B-\alpha$ 消失は、NF- κB の核移行シグナルが伝達されたことを意味している。Fig. 4A より、LPS 刺激 15-30 分後で $I\kappa B-\alpha$ の消失が見られた。一方、MAPK はその代表的な分子として、ERK1/2、JNK、および p38 が知られ、それぞれがリン酸化されると核移行シグナルが伝達される。Fig. 4B より、LPS 刺激 15-30 分後で ERK1/2、JNK、および p38 のリン酸化が見られた。ここで、野生型 M ϕ (Fig. 4 左) と CD45 欠失 M ϕ のリン酸化パターン (Fig. 4 右) を詳細に比較すると、 $I\kappa B-\alpha$ の消失パターン、ERK1/2 および p38 のリン酸化プロファイルに差異は認められないが、JNK のリン酸化が亢進していることが明らかになった。

CD45 阻害剤が M ϕ 細胞株 RAW264.7 の細胞内シグナル $I\kappa B$ と MAPK に及ぼす効果

CD45 ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ を用いた実験で細胞内シグナルの正常マウスの違いとして、JNK の過剰リン酸化のみが検出されたので、次に培養 M ϕ を用いて CD45 阻害剤を添加すると同様の結果が得られるか否かを検討した。その結果を図 5 に示した。

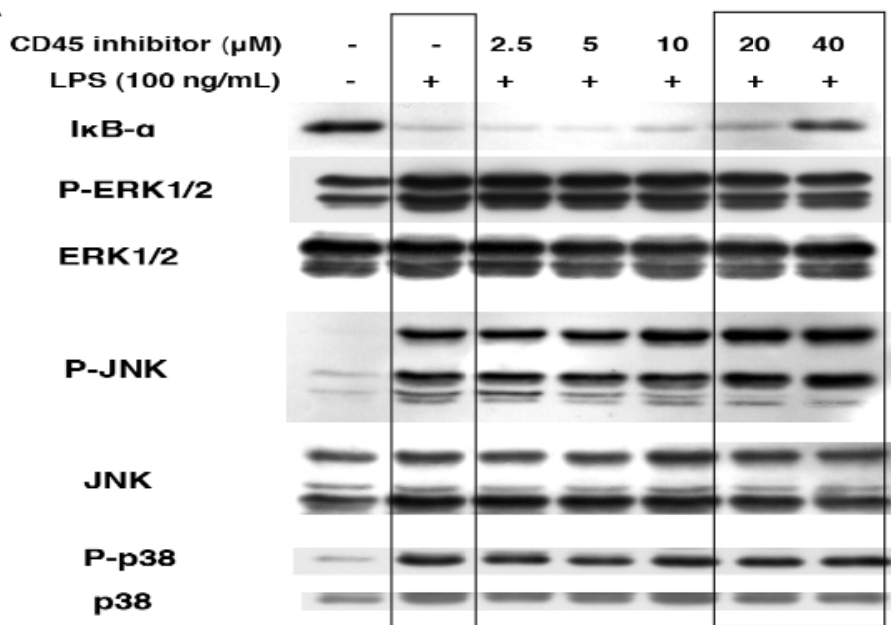


Fig. 5 RAW264.7M ϕ においてLPSで誘導される細胞内シグナル $I\kappa B$ の分解とMAPKのリン酸化に及ぼすCD45阻害剤の影響
M ϕ 細胞株RAW264.7をLPS無しまたは100ng/mLで刺激して活性化する系に0~40 μM のCD45阻害剤を添加して、 $I\kappa B$ の分解については、 $I\kappa B$ 特異抗体を用いて検出することでその分解パターンを見た。また、ERK、JNK、p38のリン酸化パターンについては、これらタンパクのリン酸化部位特異抗体を用いてプロッティングを行うことでそのリン酸化パターンを検討した。

Fig. 5 に示したように、RAW264.7 を M ϕ ソースとした場合には、CD45 阻害剤抗濃度処理時 (40 μM) には、 $I\kappa B$ の分解抑制が観察された。MAPK のリン酸化パターンでは ERK のリン酸化のわずかな減弱と JNK のリン酸化亢進が認められたる p38 のリン酸化に影響は認められなかった。

5. 考 察

CD45 欠損 M ϕ である CD45KO-PEMs を WT-PEMs と比較解析することにより、抗腫瘍活性における CD45 の役割を検討した。データには示していないが、プレ実験として、少なくとも無刺激における細胞表面の LPS 受容体の発現量に CD45 欠損の影響が認められなかった。一方、IFN- γ 受容体の発現量は確認していないが、IFN- γ 単独刺激による PEMs の抗腫瘍活性には、CD45 の有無に対して差が認められなかった（データは示していない）。CD45 は、IFN- γ 受容体直下のシグナル分子である JAK ファミリーのリン酸化を制御して、受容体シグナルをネガティブに制御するという報告がある^{32, 33)}ので、むしろ IFN- γ のシグナルに影響があるであろうと当初期待したのであるが、この結果は興味深い。一方、LPS 単独刺激において、WT-PEMs では、弱い抗腫瘍活性しか認められなかったにもかかわらず、CD45KO-PEMs では、強い細胞増殖抑制が認められた。さらに IFN- γ +LPS 刺激では、両 M ϕ の抗腫瘍活性が検出されたが、この場合にもやはり CD45 欠失 M ϕ は、野生型 M ϕ よりも高い抗腫瘍活性を示した (Fig. 2A, B)。さらに、野生型 M ϕ を CD45 特異的阻害剤で処理すると抗腫瘍活性の有意な増強が認められた (Fig. 2B)。これは、今までに全く報告されていない興味深い結果である (Fig. 2B)。

IFN- γ 刺激は、LPS 依存性抗腫瘍活性化シグナルにおいて LPS 刺激を強力に補助して、標的がん細胞の増殖を抑制するだけでなく、殺傷して腫瘍細胞数を減らしてしまうほどの細胞傷害を誘導することが示されたことは興味深い結果であるが (Fig. 2)、この IFN- γ による LPS 刺激の synergy 効果についてはすでに報告があり⁶⁻⁸⁾、IFN- γ により転写された IRF-8 (Interferon regulatory factor-8) が、LPS 刺激による TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) のユビキチン化を促進させることによりシグナルを増強していることが影響するものと考えられる。CD45 がない方が高い抗腫瘍活性を示す結果は、これらのシグナル伝達について CD45 はむしろ抑制的に作用しているのかもしれない。

抗腫瘍 M ϕ の TNF- α 放出量は、多くの論文で M ϕ の抗腫瘍効果発現の指標の一つとして扱われている。ところが、Fig. 3 に示したように CD45 を欠失もしくは CD45 阻害剤処理は TNF- α 産生の低下をもたらした。樹状細胞においては CD45 は TNF- α 産生を抑制するという報告がある⁴⁴⁾ので、CD45 阻害剤がマクロファージの TNF- α 産生を抑制するという結果は全く逆の結果である。樹状細胞とマクロファージは近縁の発生分化をたどる細胞であるが、別の TNF- α 産生制御機構が存在するものと思われる。また、抗腫瘍効果の増強と TNF- α 産生の抑制は、一見相矛盾する結果であるが、TNF- α は抗腫瘍効果において二面性を持つという結果も以前から指摘されており⁴⁵⁾、今回用いた実験系の標的細胞は TNF- α 単独では殺傷効果や増殖抑制効果が認められない（データは示していない）ことから、むしろ CD45 が働く状態では過剰な TNF- α が抗腫瘍活性を抑制している可能性がある。この可能性を検証するためには更なる実験が必要である。

CD45 欠失がもたらす、細胞内シグナル伝達への影響は、大変興味深いものであった。すでに CD45 の研究が先行している T 細胞や B 細胞においては、CD45 欠失に伴いシグナルが無応答になる場合と過剰シグナルが発生する場合の全く相反する報告がある^{17-19, 29-31)}

今回の M ϕ の場合は、T 細胞や B 細胞と異なり、全シグナルの遮断や増強が起こるのではなく、JNK のみが過剰リン酸化されるという結果が得られた (Fig. 4)。この結果は、さらに JNK 阻害剤を用いた実験などで検証が必要であるが、JNK の活性化が M ϕ の抗腫瘍活性化の鍵につながるとすれば、大変有用な結果である。この結果をさらに強めるデータとして、Fig. 5 に示したように、M ϕ 細胞株を LPS 刺激で活性化する系において

も、CD45 の阻害剤は JNK の過剰リン酸化をもたらした。この結果からも M ϕ の JNK 活性化によって生じる細胞応答を詳細に解析することで、M ϕ を有効に抗腫瘍方向に活性化させることができるようになると期待される。また、CD45 阻害剤の抗腫瘍効果を詳細に検討することで、M ϕ をエフェクターとする新たな抗がん剤の開発につながると思われる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、本学医学部生物学教室の荒館忠助教に数々の適切な御指導と御助言を賜りました。そして、本学医学部免疫学教室の村口篤教授と同教室の皆様にご学術・物資の両面で多くの御援助をいただきました。皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. Jinushi M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2012;1(2):189-194.
2. RAibers AE, Strauss L, Liao T, Hoffmann TK, Kaufmann AM. T cell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer. *ClinDevImmunol*. 2010;236378.
3. Alderson KL, Sondel PM. Clinical cancer therapy by NKcells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:379123.
4. Pace JL, Russell SW, Torres BA, Johnson HM, Gray PW. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J Immunol*. 1983;130(5):2011-3.
5. Lambert LE, Paulnock DM. Modulation of macrophage function by gamma-irradiation. Acquisition of the primed cell intermediate stage of the macrophage tumoricidal activation pathway. *J Immunol*. 1987;139(8):2834-41.
6. Weiel JE, Hamilton TA, Adams DO. LPS induces altered phosphate labeling of proteins in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*; 1986;136(8):3012-8.
7. Weiel JE, Adams DO, Hamilton TA. Biochemical models of gamma-interferon action: altered expression of transferrin receptors on murine peritoneal macrophages after treatment in vitro with PMA or A23187. *J Immunol*. 1985;134(1):293-8.
8. Somers SD, Weiel JE, Hamilton TA, Adams DO. Phorbol esters and calcium ionophore can prime murine peritoneal macrophages for tumor cell destruction. *J Immunol*. 1986;136(11):4199-205.
9. Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Larner AC, Finbloom DS. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14333-6.
10. Park JS, Woo MS, Kim SY, Kim WK, Kim HS. Repression of interferon-gamma-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in microglia by sodium butyrate is mediated through specific inhibition of ERK signaling pathways. *J Neuroimmunol*. 2005;168(1-2):56-64.
11. Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(3):C441-50.
12. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.

J Leukoc Biol. 2004; 75 (2): 163-89.

13. Shuto T, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T, Okiyoneda T, Arima H, Suico MA, Kai H. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338 (3): 1402-9.
14. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004;113 (2): 153-62.
15. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene.* 2004;23(48):7990-8000.
16. Gauld SB, Cambier JC. Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene.* 2004;23(48):8001-6.
17. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:107-37.
18. Yakura H. The role of protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and differentiation. *Crit Rev Immunol.* 1994;14(3-4):311-36.
19. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2012; 13(5): 439-47.
20. Nam HJ, Poy F, Saito H, Frederick CA. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med.* 2005; 201 (3): 441-52.
21. Okumura M, Matthews RJ, Robb B, Litman GW, Bork P, Thomas ML. Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains. *J Immunol.* 1996; 157 (4): 1569-75.
22. Xu Z, Weiss A. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol.* 2002; 3 (8): 764-71.
23. Hermiston ML, Tan AL, Gupta VA, Majeti R, Weiss A. The juxtamembrane wedge negatively regulates CD45 function in B cells. *Immunity.* 2005;23(6):635-47.
24. Gupta VA, Hermiston ML, Cassafer G, Daikh DI, Weiss A. B cells drive lymphocyte activation and expansion in mice with the CD45 wedge mutation and Fas deficiency. *J Exp Med.* 2008;205(12):2755-61.
25. Hermiston ML, Zikherman J, Tan AL, Lam VC, Cresalia NM, Oksenberg N, Goren N, Brassat D, Oksenberg JR, Weiss A. Differential impact of the CD45 juxtamembrane wedge on central and peripheral T cell receptor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):546-51.
26. Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(1):43-57.
27. Nam HJ, Poy F, Saito H, Frederick CA. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med.* 2005;201(3):441-52.
28. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med.* 1996;183(4):1707-18.
29. McNeill L, Salmond RJ, Cooper JC, Carret CK, Cassady-Cain RL, Roche-Molina M, Tandon P, Holmes N, Alexander DR. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses.

Immunity. 2007;27(3):425-37.

30. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Mizuno K, Yakura H. Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells. *J Biol Chem*. 1995;270(47):27987-90.

31. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Arimura Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K, Yakura H. CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol*. 1999;163(3):1321-6.

32. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*. 2001;409(6818):349-54.

33. Sasaki T, Sasaki-Irie J, Penninger JM. New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(11):1041-6.

34. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Penninger JM. CD45 regulated signaling pathways. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(7):783-96.

35. Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *CellSignal*. 2010;22(3):339-48.

36. Grochowy G, Hermiston ML, Kuhny M, Weiss A, Huber M. Requirement for CD45 in fine-tuning mast cell responses mediated by different ligand-receptor systems. *CellSignal*. 2009;21(8):1277-86.

37. Mason LH, Willette-Brown J, Taylor LS, McVicar DW. Regulation of Ly49D/DAP12 signal transduction by Src-family kinases and CD45. *J Immunol*. 2006;176(11):6615-23.

38. Huntington ND, Xu Y, Nutt SL, Tarlinton DM. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J Exp Med*. 2005;201(9):1421-33.

39. McKernan LN, Largen MT. Identification of multiple-molecular-weight forms of thymocyte comitogenic activity from the monocyte/macrophage cell line RAW 264.7. *Cell Immunol*. 1983;80(1):84-96.

40. Urbanek RA, Suchard SJ, Steelman GB, Knappenberger KS, Sygowski LA, Veale CA, Chapdelaine MJ. Potent reversible inhibitors of the protein tyrosine phosphatase CD45. *J Med Chem*. 2001;44(11):1777-93.

41. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science*. 1985;230 (4726): 630-2.

42. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007. 18 (3-4): 335-343

43. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol*. 2004;6 (2): 97-105.

44. Piercy J, Petrova S, Tchilian EZ, Beverley PC. CD45 negatively regulates tumour necrosis factor and interleukin-6 production in dendritic cells. *Immunology*. 2006;118(2):250-6.

45. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*. 1985;230(4728):943-5.