



# T-Cell-Specific Expression of Kinase-Defective Eph-Family Receptor Protein, EphB6 in Normal as well as Transformed Hematopoietic Cells

下山, 学

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2141

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002141>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



|            |  |       |
|------------|--|-------|
| 氏名・（本籍）    | しもやま まなぶ<br>下山 学   | （兵庫県） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学）   |       |
| 学位記番号      | 博い第1284号   |       |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当   |       |
| 学位授与の日付    | 平成12年3月31日   |       |
| 学位論文題目     | T-cell-Specific Expression of Kinase-Defective Eph-Family Receptor Protein, EphB 6 in Normal as well as Transformed Hematopoietic Cells<br>（正常造血細胞および造血器悪性腫瘍におけるキナーゼ欠損型 Eph ファミリー受容体蛋白 EphB 6 の T 細胞系列特異的発現） |       |
| 審査委員       | 主査 教授 千原 和夫<br>教授 片岡 徹 教授 春日 雅人  |       |

### 論文内容の要旨

#### 〔目的および方法〕

受容体型チロシンキナーゼは様々な細胞の分化，増殖に重要な役割を果たしている。Eph ファミリー受容体は既知の受容体型チロシンキナーゼ中で最大のファミリーを形成し，様々な悪性腫瘍，胎児，神経系組織に発現している。その機能については，神経ガイダンスや組織の形態形成に関わるとの報告が近年急速に蓄積されつつある。また，血管形成，発癌にも関わっているとされているが，Eph ファミリー受容体の発癌における特異的な機能は不明である。その機能を解明するためには，これらの受容体の正常ならびに腫瘍化組織における発現形式を探索することが重要と思われる。

本研究において，最近私達が見出したキナーゼ欠損型 Eph ファミリー受容体ヒト EphB 6 の正常血液細胞および造血器悪性腫瘍における発現を検索し，両者における EphB 6 の発現の相違を明らかにすることを目的とした。ノザンプロットにてヒト正常組織における EphB 6 の発現分布を検索すると共に，抗ヒト EphB 6 特異的モノクローナル抗体を作成し正常ヒト血球および種々の造血器悪性腫瘍において蛋白レベルでの発現を検討した。

#### 〔結果〕

正常ヒト組織において EphB 6 は mRNA レベルではこれまでに報告した大脳および臓腑に加え，胸腺および胎児の脳においても非常に強い発現を認めた。

フローサイトメトリーを用いた検索にて正常ヒト末梢血白血球中  $0.57 \pm 0.07\%$  (mean  $\pm$  SE, n=12) に EphB 6 の発現を認めた。EphB 6 発現白血球はリンパ球分画内に存在し，全リンパ球中の  $1.8 \pm 0.16\%$  であった。

フローサイトメトリーによる2重染色法で解析したところ，EphB 6 発現細胞は CD11b および CD19 陰性で，CD2，CD7，CD3 陽性であった。EphB 6 陽性細胞は T 細胞性のマーカーうち CD4 陽性細胞分画に大多数が含まれ CD8 陽性細胞分画には少数認められるのみであった。骨髓細胞を用いて同様の実験を行ったところ骨髓リンパ球中の  $1.5 \pm 0.19\%$  に EphB 6 陽性細胞を認めた。2重染色では

末梢血と同じく CD 2, CD 7, CD 3 陽性, CD 4 ないし CD 8 陽性で CD 11b, CD 19 は陰性であった。また, CD 34 陽性細胞を含む骨髄前駆細胞中の EphB 6 陽性細胞は骨髄細胞内のリンパ球中の EphB 6 陽性細胞の割合よりもわずかであった。このことから, EphB 6 蛋白は末梢 T 細胞のごく一部に特異的に発現し成人の骨髄系の成熟白血球と骨髄前駆細胞にはほとんど認めないものと考えられた。

ヒト白血病細胞株を用いて, EphB 6 の発現を調べたところ全例の T 細胞性白血病細胞株 (10 例) で陽性であり, 未分化 T 細胞性白血病細胞株に特異的強発現を認め末梢 T 細胞性白血病細胞株では発現が弱かった。B 細胞および骨髄系白血病細胞株 (4 および 5 例) では発現は認めず, EphB 6 は正常白血球と同様に造血器悪性腫瘍においても T 細胞系に特異的に発現していた。

更に, 様々な白血球および悪性リンパ腫の患者から得られた検体を用い EphB 6 の発現を調べた。その結果, 白血病細胞株と同様に白血病・リンパ腫の検体の検索においても EphB 6 の発現は T 細胞由来の造血器悪性腫瘍に特異的に認められた。

胸腺腫から得られたヒト胸腺細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を抗 EphB 6 抗体, 抗 CD 4 抗体, 抗 CD 8 抗体を用いた 3 重染色で行ったところ, CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>胸腺細胞に EphB 6 の強い発現を認めた。CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>胸腺細胞の大部分は EphB 6 の発現を認めなかったが, ごく一部の細胞が発現している可能性が示唆された。

正常マウスの組織を用いて EphB 6 の発現をウェスタンブロットにて検索したところ脳および胸腺に強い発現を認めた。更にマウスの胸腺細胞から CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>胸腺細胞分画, CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>胸腺細胞分画を分離し, マウス末梢血中から分離した CD 4<sup>+</sup>T 細胞分画, CD 8<sup>+</sup>T 細胞分画と共に EphB 6 の発現をウェスタンブロットにて調べた。その結果, CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>胸腺細胞に EphB 6 の強い発現を認め CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>胸腺細胞に弱い発現を認めたが末梢 CD 4<sup>+</sup>T 細胞, 末梢 CD 8<sup>+</sup>T 細胞における EphB 6 の発現は検出されなかった。

以上の結果より EphB 6 蛋白の発現は生体において T 細胞の分化に伴い生理的に制御されていることが示唆された。

#### [考察]

本研究において我々は, キナーゼ欠損型 Eph ファミリー受容体蛋白 EphB 6 のヒト血球における発現をモノクローナル抗体を作成して解析した。Eph ファミリー受容体遺伝子の造血組織, リンパ組織への発現の報告は蓄積されつつあり, なかでも胸腺における mRNA の発現は多くの遺伝子で報告されている。しかし, 胸腺ないし末梢 T 細胞への蛋白レベルでの発現の報告はなく, 今回我々は正常ヒト末梢 T リンパ球および胸腺細胞での EphB 6 蛋白の特異的発現を報告した。

蛋白レベルでの造血組織およびリンパ組織における Eph ファミリー受容体の発現の検索ではこれまで, 系統特異的な発現は報告されていなかったが EphB 6 蛋白は正常造血細胞および造血器悪性腫瘍において T 細胞系に特異的な発現が認められた。

Eph ファミリー受容体遺伝子の発現は個体の発生, 成熟に伴って発現制御されているとされる。我々のマウスの胸腺を用いた実験では, 成熟過程にある CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>の胸腺細胞に EphB 6 蛋白の強発現を認めたが, より未熟である CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>の胸腺細胞にはわずかな発現しか認められず, 成熟 T リンパ球である CD 4<sup>+</sup>リンパ球, CD 8<sup>+</sup>リンパ球では発現が認められなかった。ヒト白血病・リンパ腫細胞株における EphB 6 蛋白の発現も未熟な T 細胞系の細胞株に強く, 分化の進んだ末梢性 T 細胞系である ATL 由来の細胞株では発現は弱かった。このことより, EphB 6 遺伝子の発現は, T 細胞の成熟過程において生理的に発現制御されていると思われる。また, T 細胞系の腫瘍細胞においてもこの

制御機構は保持されていると思われる。

造血器悪性腫瘍における T 細胞系特異的発現は他の Eph ファミリー受容体には認められないものである。EphB 6 は正常骨髄および末梢血中の T リンパ球にも発現しているが 1% にも満たない。EphB 6 の機能的意義はまだ明らかでないが、今後 EphB 6 は新しい T 細胞系腫瘍のマーカーとして、あるいはパージングなどの新しい治療の標的分子として使用できる可能性がある。

Eph ファミリー受容体は様々なヒト悪性腫瘍における過剰発現が報告され、細胞の腫瘍化に関連している可能性が示唆されている。しかし、ヒト造血器悪性腫瘍における EphB 6 の T 細胞系特異的な発現は、正常血液細胞でも同様に認められており異所性発現でも過剰発現でもないと思われる。

一般に、Eph ファミリー受容体およびリガンドは細胞間相互作用に深く関与していると考えられている。EphB 6 は T 細胞特異的に発現し特に未熟な段階の T 細胞に強く発現していることより、T 細胞の成熟に関連する機能分子である可能性がある。EphB 6 はキナーゼ活性を持たないが、細胞内ドメインを欠く EphB 6 受容体があたかもリガンドの如く作用して、リガンドである ephrin のリン酸化を惹起することにより、受容体からリガンドへのシグナル伝達が可能であるとの報告がある。このことより、キナーゼ活性を持たない EphB 6 受容体が発現している細胞に対してシグナル伝達している可能性は十分に考えられる。

T 細胞系における分化に伴う EphB 6 の発現制御機構の解明は、現在まだ明らかでない EphB 6 の生理機能の解明につながると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

細胞増殖や分化と関係深いチロシンキナーゼ型受容体の中で最大のファミリーを形成している Eph 受容体ファミリーは神経回路形成におけるガイダンスや各種組織の形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。1997年、教室の松岡らが見出したキナーゼ欠損型 Eph ファミリー受容体ヒト EphB 6 はユニークな構造を有し、細胞内チロシンキナーゼドメインのアミノ酸置換により内因性チロシンキナーゼ活性は消失していた。一般的に成長因子受容体でキナーゼ活性を失ったものは腫瘍細胞で検出されたものばかりであることより、正常組織からクローニングされた EphB 6 の生理的役割の解明は興味深いことであった。申請者は、ヒト EphB 6 の正常血液細胞および造血器悪性腫瘍における発現を調べ両者を対比することによりヒト EphB 6 の生体内における意義を明らかにすることを試みた。実験方法として、まずノザンブロット法でヒト正常組織における EphB 6 の発現分布を検索し、次に抗ヒト EphB 6 特異的モノクローナル抗体を作製し正常ヒト血球および種々の造血器悪性腫瘍について蛋白レベルでの発現も検討した。フローサイトメトリーを用いた検索で正常ヒト末梢血白血球中  $0.57 \pm 0.07\%$  に EphB 6 の発現を認め、それらはリンパ球分画に存在していた。さらにフローサイトメトリーによる 2 重染色法で解析したところ、EphB 6 発現細胞は CD11b および CD19 陰性で、CD 2, CD 7, CD 3 陽性であった。EphB 6 陽性細胞は T 細胞性のマーカーうち CD 4 陽性細胞分画に大多数が含まれ CD 8 陽性細胞分画には少数認めるのみであった。骨髄細胞を用いて同様の実験を行ったところ骨髄リンパ球中の  $1.5 \pm 0.19\%$  に EphB 6 陽性細胞を認めた。2 重染色では末梢血と同じく CD 2, CD 7, CD 3 陽性、CD 4 ないし CD 8 陽性で CD11b, CD19 は陰性であった。また、CD34 陽性細胞を含む骨髄前駆細胞中の EphB 6 陽性細胞は骨髄細胞内のリンパ球中の EphB 6 陽性細胞の割合よりもわずかであった。このことから EphB 6 蛋白は末梢 T 細胞のごく一部に特異的に発現し成人の骨髄系の成熟白血球と骨髄前駆細胞にはほとんど認めないものと考えられた。次にヒ

ト白血病細胞株を用いて、EphB 6 の発現を調べたところ全例の T 細胞性白血病細胞株（10例）で陽性であり、未分化 T 細胞性白血病細胞株に特異的に強発現を認め末梢 T 細胞性白血病細胞株では発現が弱かった。B 細胞および骨髄系白血病細胞株（4 および 5 例）では発現を認めず、EphB 6 は正常白血球と同様に造血器悪性腫瘍においても T 細胞系に特異的に発現していた。更に、様々な白血球および悪性リンパ腫の患者から得られた検体を用い EphB 6 の発現を調べた。その結果、白血病細胞株と同様に白血病・リンパ腫の検体の検索においても EphB 6 の発現は T 細胞由来の造血器悪性腫瘍に特異的に認められた。これまで Eph ファミリー受容体の造血組織およびリンパ組織における発現について系統特異的な特徴は知られていなかったが、申請者らの成績により EphB 6 蛋白が正常および腫瘍にかかわらず T 細胞系に特異的に発現することが明らかとなった。次に、正常マウスの組織を用いて EphB 6 発現をウェスタンブロットにて検索したところ脳および胸腺に強い発現を認めた。更にマウスの胸腺細胞から CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>胸腺細胞分画、CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>胸腺細胞分画を分離し、マウス末梢血中から分離した CD 4<sup>+</sup>T 細胞分画、CD 8<sup>+</sup>T 細胞分画と共に EphB 6 の発現をウェスタンブロットにて調べた。その結果、CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>胸腺細胞に EphB 6 の強い発現を認め CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>-</sup>胸腺細胞に弱い発現を認めたが末梢 CD 4<sup>+</sup>T 細胞、末梢 CD 8<sup>+</sup>T 細胞における EphB 6 の発現は検出されなかった。また、ヒト白血病・リンパ腫細胞株における EphB 6 蛋白の発現も未熟な T 細胞系の細胞株に強く、分化の進んだ末梢性 T 細胞系である ATL 由来の細胞株では発現は弱かった。このことより、EphB 6 遺伝子の発現は、T 細胞の成熟過程において生理的に発現制御されていると思われる。また、T 細胞系の腫瘍細胞においてもこの制御機構は保持されていると思われる。これらの成績より EphB 6 の生理機能的意義はまだ明らかでないが、造血器悪性腫瘍における T 細胞系特異的発現は他の Eph ファミリー受容体には認められないものであり、今後 EphB 6 は新しい T 細胞系腫瘍のマーカーとして、また、パージングなどの新しい治療の標的分子として使用できる可能性が示唆された。

以上、本研究は申請者達が新規にクローニングしたキナーゼ欠損型 Eph ファミリー受容体ヒト EphB 6 についてその特性を研究したものであるが、従来知られていなかった発現部位の特徴について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。