

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

Kirre の発現分布の解析に関する研究

分担研究者 上野 博夫 国立がんセンター研究所 室長

研究要旨

ストローマ細胞に発現する膜タンパク質の中で造血幹細胞支持機能を有する分子として同定された Kirre の発現分布を免疫染色法にて解析した。

A. 研究目的

造血幹細胞は、再生医療への応用を含め近年その重要性が改めて注目されているが、現在までのところ、その生体外長期培養は臨床レベルでは実用化しておらず、その最大の理由として骨髄内において造血支持細胞が造血幹細胞を支持する機構が詳細にわかっていないことが挙げられる。In vitro においては骨髄由来のストローマ細胞株が複数樹立され、造血支持能を有することが証明されているが、成体骨髄内にて、どこにストローマ細胞や造血幹細胞が存在するかなど基本的な情報も良く分かっていなかった。ごく最近 Zhang, Calviらは骨髄内において骨組織と骨髄組織の境界領域に存在する osteoblast が造血微小環境 (niche) を構成し造血幹細胞を制御しているとの報告をした (2003 Calvi, LM Nature, 2003 Zhang J, Nature)。こうした背景のもと、私達は造血幹細胞支持機能を有する骨髄ストローマ細胞株、OP9 よりシグナル配列単離法にて同定された遺伝子のうち、ストローマ細胞の造血支持機能 (long term culture initiating cells assay; LTC-IC) を指標に mKirre を単離し

た。しかし、その造血支持作用の機序など、mKirre の生物学的機能は現在までのところほとんどわかっていないのが現状である。分担研究者は mKirre に対するポリクローナル抗体を作成して骨髄内発現部位を検索した。

B. 研究方法

1. RT-PCR による発現部位の検定

mKirre 及び GAPDH の塩基配列に基づきプライマーを設定、Multiple Tissue cDNA (MTC) Panels(クロンテック社)を template として PCR 反応 (LA-Taq, TAKARA) を行った。また、骨髄内の細胞は蛍光標識したモノクローナル抗体 (抗 B220, 抗 CD3, 抗 Gr1, 抗 MAC1, 抗 Sca1, Phamingen 社) を用い、FACS Vantage (Becton Dickinson 社) にてソーティングした Trizol 試薬 (Invitrogen 社) にて RNA を抽出し、ランダムヘキサマーを用いて RT 反応を行った上で、同様に PCR 反応を行った。

2. ノーザンブロッティングによる発現部位の検定

C57BL/6 マウス成体及び E17.5 胎児の各臓

器より抽出した mRNA は濃度測定後 $1\mu\text{g}$ ずつアガロースゲル上に電気泳動後、Hybond N(Amersham 社)上に転写し、mKirre の cDNA 断片をプローブにして標準的な方法にてノーザンブロットングを行った。

3. mKirre に対するポリクローナル抗体の作製と抗原カラム精製

mKirre のアミノ酸配列をもとに、合成ペプチド (GYMAKDKFRRMNEGQVY(第 32-48 番目のアミノ酸に相当する)) を設計しラビットに免疫して通常の方法にてポリクローナル抗体を作製した。

このペプチドを Epoxy-activated Sepharose 6B (ファルマシア社) に結合させ、抗原カラムを作製、これにより、得られたポリクローナル抗体をアフィニティー精製した。この抗体を用い、CHO-k1 細胞に pSSR α -bsr ベクターを用いて mKirre を発現させた細胞とベクターだけ導入した細胞 (mock) を比較してウェスタン解析を施行したところ、非常に特異的に mKirre 遺伝子産物を認識できることがわかった。また、得られた精製抗体 1mg を LinKit Fluoro-Link (ISL 社) により FITC 標識した。

4. mKirre に対するモノクローナル抗体の作製

mKirre アミノ酸配列の 32-48 番目 (GYMAKDKFRRMNEGQVY) を有する合成ペプチドを製造し、逆層カラムにて精製後、KLH キャリアタンパク質に結合させ、7 週齢のラット (♀) のフットパッドに計 3 回免疫した (初回免疫後、3 日目、7 日目)。

初回免疫後 9 日目にラットの鼠経リンパ節を採取し、ステンレスメッシュにて充分ほぐしてリンパ球を採取し、これをマウスミエロ

ーマ細胞株 P3U1 と PEG 法にて細胞融合させて融合細胞を製造した。細胞比はリンパ球 : ミエローマ細胞 = 5 : 1 とした。得られた融合細胞を HAT 培地中で培養し、ハイブリドーマを選択した。

得られたハイブリドーマを少数の細胞集団ごとに分割して、それらの上清に産生される抗体と、抗原ペプチドをコーティングした 96 穴プレートと反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG(H+L) による ELISA 反応にて陽性細胞集団を選択した。

これら陽性細胞集団を、限界希釈法にてさらに細かい細胞集団に分けていった。最終的に単クローンにて抗原ペプチドとの反応性を示すモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマを 3 クローン (1A8、4A8、および 4B10) 樹立した。

5. ウェスタン解析法

ウェスタン解析は過去に報告した方法 (1995 Ueno, JBC vol 270pp20135-42) にて行った。細胞は Triton lysis buffer (0.5% (v/v) Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM PMSF, 10U/ml aprotinin 1mM EDTA) にて可溶化した後、 $50\mu\text{g}$ を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて展開し、Immobilon-P メンブレインに転写後抗 mKirre 抗体ないし抗 FLAG 抗体、M2 (SIGMA 社) にて検出した。

6. Cobblestone Area Forming Cell Assay: CAFC (敷石状領域形成細胞アッセイ)

OP9 細胞に上記にて得られた遺伝子をレトロウイルスベクター (pMX-puro) にて遺伝子導入し 6well ディッシュに 2.5×10^5 ずつ蒔き、一晚培養した後、5 - 8 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨より採取した骨髓細胞を 1×10^5

個まき、6日後に形成された CAFC を免疫染色した。

7. 免疫染色法

サンプルは4%パラホルムアルデヒドにて固定後1%NP40にて permeabilization を行い、抗 mKirre ポリクローナル及びモノクローナル抗体を用いて染色した（二次抗体は FITC 標識抗マウスないしラビット抗体、Jackson 社）。核は DAPI（フナコシ社）染色を行った。

（倫理面への配慮）

ここまでの研究ではヒトのサンプルを使用していない。ヒトのサンプルを利用する場合は癌センターの倫理審査委員会の指針に従って、該当者に説明を行い、同意書に署名をいただく。

動物実験においては、Sacrifice するときの麻酔をしっかりと行うなど動物（主にマウス）に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

RT-PCR 及びノーザンブロットティングの結果 RT-PCR にて、mKirre の発現は脳と骨髄ストローマ細胞に発現しており、骨髄内造血細胞にては全く発現が認められなかった。また、ノーザンブロットティングでは成体マウスの脳と骨髄ストローマ細胞に、また胎児（E17.5）では頭部に特異的であった。その他の部位での発現はほとんど認められない。また、代表的な繊維芽細胞株である NIH3T3 細胞には発現していなかった。mKirre-FLAG を高発現した OP9 細胞と KSL 細胞を共培養し CAFC を形成させた細胞群を抗 FLAG 抗体にて免疫染色したところ、mKirre は OP9 細胞と造血細胞の接触する部位に集積しているこ

とが判明した。

次に endogenous の mKirre の発現分布を特定する目的にて mKirre に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体の作製を試みた。mKirre は、766個のアミノ酸からなるタンパク質である。このうち、1-523番目までが細胞外領域であると考えられる。そこで、mKirre のシグナル配列を除くアミノ酸番号18-523の細胞外領域のタンパク質とヒト免疫グロブリン Fc 領域との融合タンパク質（mKirre- Δ TM-Fc）を用いて、ラットに3日毎に3回フットパット免疫して細胞融合法によりモノクローナル抗体の作製を試みたところ、抗原反応が陽性の5クローン、即ち、1A3、1H9、2B1、2F1、及び2H8が得られた。得られた5クローンの抗体を ELISA 法により、mKirre-ヒト Fc 及びヒト IgG（ネガティブコントロール）と、それぞれ交叉反応された。

2種抗原による交叉反応（ELISA）結果

クローン名	mKirre-Human Fc	Human IgG(negative control)
1A3	+	+
1H9	+	+
2B1	+	+
2F1	+	+
2H8	+	+

この結果、得られた抗体は、いずれもより抗原性の高い Fc 領域に対するものばかりであり、mKirre を認識する抗体は全く得られなかった。

次に、細胞外領域の全領域では抗体を作成することができないので、抗原性の高い範囲を絞り込み抗原を大量に免疫する方法で抗体の作製を試みた。一般にタンパク質のアミノ基末端側がタンパク質の表面に露出している

可能性が高いため、mKirre のアミノ酸番号 18-139 からなるタンパク質を GST 融合タンパク質として大腸菌を用いて作製した。このタンパク質を抗原とし、ウサギに免疫して同様な方法でポリクローナル抗体の作製を試みた。比較として同時に文献 1 (Ueno H. et al, 2003 Nat Immunol) に SST-5 として記載されているタンパク質を同様に使用して作成した抗体を使用した。得られたポリクローナル抗体の抗体価を ELISA 法により測定した。この結果、同時に作製した GST-SST-5 の免疫効果と比べて GST-mKirre では抗体価の上昇が悪いことがわかった。このように、SST-5 に対する抗体に比べて抗体価の極めて悪いものしか作成することができなかったが、一応 mKirre を認識するポリクローナル抗体を作製することができる可能性があることがわかった。

次に、mKirre の cDNA のカルボキシル末端側に FLAG タグを付加したコンストラクトを構築して、これを COS7 細胞に一過性に発現させ抗 mKirre 抗体及び抗 FLAG 抗体にてウェスタン解析を行った。この結果、抗 FLAG 抗体にて mKirre-FLAG の発現が確認されるが、抗 mKirre 抗体にてはバックグラウンドが高く mKirre-FLAG の発現は確認できなかった。ウェスタン解析の結果から、この方法による抗体は、極めてバックグラウンドの高い、質の悪い抗体でしかないことがわかった。

このように、mKirre の抗体は通常的手法では作成することが困難であり、この原因としては次の 2 つの可能性が考えられる。

(1) mKirre の細胞外領域は極めて抗原性が低いこと、あるいは (2) 免疫グロブリン

様領域という多くのタンパク質に存在するモチーフを mKirre が有しており、これに反応する抗体ができると mKirre 特異性が失われる。

そこで、免疫グロブリン様領域を避け、抗原性の高いペプチド配列部分を想定する方法を検討した。免疫グロブリン様領域を避け、抗原性の高いペプチド配列部分を想定するためにコンピューターソフトウェアを用いた。用いたソフトウェアはマックベクター (Mac Vector)、ペプトール (Peptool)、及びスキャンプロサイト (Scan Prosite) の 3 種類である。その結果、最終的にタンパク質から切り離されるシグナル配列 (1-17)、及び免疫グロブリン様領域を除外した細胞外領域においては、アミノ酸配列で 32-48 番目の (GYMAKDKFRRMNEGQVY) 領域を想定することができた。この領域の平均疎水性値は -13.3 で、電荷密度 (Charge Density) は 0.53 であった。この値は、検討した配列の中で最良の結果を示すものであった。

このアミノ酸配列をヒトの配列と比較すると、100%一致していたが、免疫動物であるラットと比較するとアミノ酸配列 32-33 において異なっており (マウス GY、ラット AT)、抗原としても有利であると考えられた。

そこで、このアミノ酸配列 (GYMAKDKFRRMNEGQVY) よりペプチドを合成し、KLH キャリアタンパク質に結合させ、ラビットに免疫してポリクローナル抗体を作製、抗原カラムにて精製し、一部は FITC 標識した。この結果得られた抗体はウェスタン解析にて極めてバックグラウンドが低く mKirre を認識し、また mKirre を高発現

した CHO-k1 細胞を flowcytometry にて認識した。

そこで次の段階として同じ抗原を用い、モノクローナル抗体の作製を試みた。7週齢のラット（♀）のフットパッドに上記抗原を計3回免疫した。（初回免疫後、3日目、7日目）。初回免疫後9日目にラットの鼠経リンパ節を採取し、リンパ球を PEG 法にてマウスミエローマ細胞株 P3U1 と融合させて、融合細胞を作製した。HAT 培地中で培養し、ハイブリドーマを選択した。ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG(H+L)による ELISA 反応にて陽性細胞集団を選択した。

これら陽性細胞集団から最終的に単クローンにて抗原ペプチドとの反応性を示すモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマを3クローン（1A8、4A8、及び4B10）を樹立することができた。

得られたモノクローナル抗体の各クローンについて抗原とした合成ペプチドによる ELISA 反応を測定した。結果を次の表2に示す。

【表2】

クローン名	測定値
4B10	1.642
1A8	1.218
4A8	1.172
Negative control	0.091

これらのクローンは全て限界希釈法にて一個の細胞から樹立されたものであり、また、ミエローマ細胞はマウス由来であり、この ELISA 反応がラット特異的2次抗体を使用していることから、得られたモノクローナル抗体が、ラット由来であり、且つ mKirre ペプチドを認識していることが証明された。

また、抗原として用いたペプチド配列（GYMAKDKFRRMNEGQVY マウス mKirre のアミノ酸配列の32-48番目）は、ヒトホモログである KIAA1867 のアミノ酸配列32-48と完全に一致しており、本研究のモノクローナル抗体は、マウス由来ではあるが、ヒトの Kirre をも認識することができるものである。

これらの3クローンをウェスタン解析及び免疫染色に用いてみたところ、ウェスタン解析にはいずれも用いることができなかつたが、4B10 のみマウス成体骨髄の凍結切片を染色する事が判明し、骨髄の辺縁部で骨組織に接している部分に多くの陽性細胞が観察された。現在、より詳細に検討中である。

D. 考察

今回作製した抗 mKirre モノクローナル抗体は、現在詳細に検討中であるが、抗原としてはマウス、ヒトと共通配列部位を用いており、ヒト Kirre タンパク質を特異的に認識することを期待している。mKirre の検出、同定だけでなく、mKirre 発現細胞の分離・純化、mKirre シグナル伝達阻害実験など、骨髄造血微小環境による造血の制御機構の解析のための応用を検討中である。

こうした研究の延長線上に造血支持細胞を分離・純化し、それらと造血幹細胞を共培養することで in vitro で造血幹細胞の増幅をめざす。また、多くの白血病細胞は in vitro での増殖には限界があるにも関わらず、骨髄内では効率よく無制限に増殖できる事が知られている。これは、白血病細胞が正常の造血幹・前駆細胞の性質を一部保持しており、造血微小環境を占拠することで正常の造血を制御す

ると同時にストローマ細胞からのシグナルを受けて増殖しているためと考えられている。mKirre のシグナルはストローマ細胞の造血幹細胞支持能において重要であることから、本研究の抗 mKirre モノクローナル抗体が Kirre を介して伝達されるシグナルを阻害し、白血病などの骨髄内で増殖する悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果があるか検討したい。

E. 結論

mKirre に対して作成したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を利用した免疫染色を行ったところ、骨髄内の骨梁に接したオステオプラストと思われる細胞に mKirre が発現していることが示唆された。骨髄ストローマ細胞株 OP9 と造血細胞を共培養した場合、造血が盛んな cobble stone like area に接する OP9 細胞に、mKirre の発現が特異的に認められた。これらの結果は mKirre が造血ニッチと思われる場所に発現していることを示唆している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ueno H., Sakita-Ishikawa M., Nakano T., Morikawa Y., Kitamura T., Saito M. (2003) A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. Nat. Immunol.4(5):457-463.

2) Li N., Nakamura K., Jiang Y., Tsurui H., Matsuoka S., Abe M., Ohtsuji M., Nishimura H.,

Kato K., Kawai T., Atsumi T., Koike T., Shirai T., Ueno H., Hirose S. (2004) Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.13(2):171-179.

2. 学会発表

1) Hiroo Ueno, Mao Sakita-Ishikawa, Toru Nakano, Yoshihiro Morikawa, Toshio Kitamura, & Masaki Saito. Cloning and functional analysis of secreted and membrane molecules expressed in bone marrow stromal cells.(2003 Mar.29-Apr.3, Keystone Symposia, From Stem Cell to Therapy, Virology, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1) 造血幹細胞増殖調整因子及びそれをコードするポリヌクレオチド

(発明者：上野博夫)

日本国出願番号 特願 2003-523654

PCT 出願番号 PCT/JP02/08456

2) 抗 mKirre 抗体

(発明者：上野博夫)

日本国出願番号 特願 2004-28638

以上出願中

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者氏名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
北村 俊雄	Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics	Experimental Hematology	31	1007-1014	2003
上野 博夫	A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells	Nature Immunology	4	457-463	2003

20030400

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。