

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 のノックアウトマウスの作成に関する研究

分担研究者 野阪哲哉 東大医科研 造血因子探索研究部 客員助教授

研究要旨

Kirre はストローマ細胞に発現する膜蛋白質の中で造血幹細胞支持機能を有する分子として同定した分子である。Kirre の発現部位は造血幹細胞が増幅することと考えられる骨髄内の造血ニッチおよび胎生期には造血幹細胞の発生の地として知られている AGM 領域である。このことは Kirre が成体においても造血において重要な働きをしていることを示している。Kirre が vivo において造血にどのような機能を発揮するのかを明らかにするためにノックアウトマウスの作成を行っている。

A. 研究目的

造血幹細胞の自己増幅を支持するニッチの構成分子と考えられる mKirre (Nat. Immunol. 2003) のノックアウトマウスを作成し解析すること。

B. 研究方法

mKirre cDNA をプローブにして BAC ライブラリーをスクリーニングし、mKirre 遺伝子を含む BAC クローンを単離、BAC クローンおよびマウス遺伝子データベースをもとに、mKirre 遺伝子座の制限酵素マップを作成した。これをもとに、mKirre 遺伝子のプロモーター領域および第 1 エクソンを neomycin カセットで置換するよう

にターゲティングベクターをデザインし作成した。現在このターゲティングベクターを E14 ES 細胞にエレクトロポレーションで導入し、相同組み替え体を平成 15 年度にスクリーニングし約 900 コロニーを調べたが相同組み替え体は得られなかった。

そこでターゲティングベクターを変更し、ATG のところに LacZ およびネオマイシンカセットを挿入したコンストラクトも作成し ES 細胞にエレクトロポレーションで導入し、相同組み替え体をスクリーニングしている。さらに第一エクソンの前後に Lox-p サイトを導入し、リコンビネース Cre で Lox-p サイトに挟まれた部分を除ける

ようにしたベクターも構築して、組み換え型 ES 細胞の獲得を目指している。組み換え型 ES 細胞ができた時点で、ES 細胞内で Cre を発現させて mKirre の遺伝子をひとつ欠失する ES 細胞を作成する。これらのベクターでノックアウトマウスが作成できれば mKirre の発現部位に変わりに LacZ が発現することになり、ヘテロマウスにおいて mKirre の発現部位を胎生期から成体マウスにかけて追うことができる。

(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医科研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する。また1年に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

C. 研究成果と考察

2つ目のターゲティングベクターで800クローンをスクリーニングしたが、現在までに相同組み換え体は得られていない。ターゲティングが難しい遺伝子座であり、もう2つ目のターゲティングベクターでスクリーニングを継続するとともに以下のように

に lox-p の系を利用した3つ目のターゲティングベクターを作成した。現在のターゲティングベクターにおいてやや短めの5'側のアームを伸ばすために、もう一度 BAC ライブラリーをスクリーニングし、lox-p サイトおよび LacZ を挿入したターゲティングベクターを作成した。現在、このベクターで ES 細胞のスクリーニングを開始するところである。ヘテロマウスが作成できれば胎生期から成体にかけて Kirre が発現する部位を確認できる。Kirre は骨髄のニッチと思われる場所に発現しているが、脳においては神経細胞に、また胎生期には AGM 領域および migrating myocyte にも発現していることが、in situ hybridization 法あるいは免疫染色法によって示唆されている。それぞれの発現部位をヘテロマウスで確認すると同時にノックアウトマウスでは Kirre の生体内における機能を知ることが期待される。

D. 結論

現在までにノックアウトマウスの作成に成功していない。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005) Two-step model of

leukemogenesis in multiple lineages by dimerization of MLL fusion protein. *J Clin. Invest.* in press.

2) Urano, A., Endoh, M., Wada, T., Morikawa, Y., Itoh, M., Kataoka, Y., Taki, T., Akazawa, H., Nakajima, H., Komuro, I., Yoshida, N., Hayashi, Y., Handa, H., Kitamura, T., and Nosaka T. Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia. *Mol. Cell. Biol.* in press.

2. 学会発表

1) 小児急性骨髄性白血病における血小板由来増殖因子 α 受容体(PDGFR α)の解析 樋渡光輝、滝智彦、小埜良一、土田昌宏、花田良二、本郷輝明、迫正廣、野阪哲哉、林泰秀 (第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会、2004年9月17日～19日)

2) 二段階発癌モデル系を用いた MLL 融合蛋白による白血病発症の分子機構の解析 小埜良一、中島秀明、尾崎勝俊、熊谷英敏、川島敏行、滝智彦、北村俊雄、林泰秀、野阪哲哉 (第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会、2004年9月17日～19日)

3) MLL-SEPT6 融合蛋白は homo-oligomer を形成し、恒常的活性型チロシンキナーゼの存在下に白血病発症を誘導する 小埜良一、中島秀明、尾崎勝俊、熊谷英敏、川島敏行、滝智彦、北村俊雄、林泰秀、野阪哲哉 (第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日)

4) 小児急性骨髄性白血病における血小板由来増殖因子 α 受容体(PDGFR α)の変異解析 樋渡光輝、滝智彦、小埜良一、本郷輝明、野阪哲哉、林泰秀 (第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日)

5) MLL-SEPT6 融合蛋白は恒常的活性型チロシンキナーゼと協調的に急性白血病を発症する 小埜良一、野阪哲哉、滝智彦、林泰秀 (第20回日本小児がん学会・第46回日本小児血液学会、2004年11月21日～23日)

6) 遺伝子欠損マウスを用いた小児急性白血病関連遺伝子の機能解析 浦野敦司、遠藤正紀、和田忠士、伊藤美由紀、片岡由起、赤澤宏、滝智彦、中島秀明、小室一成、森川吉博、吉田進昭、林泰秀、半田宏、北村俊雄、野阪哲哉 (第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～11日)

F. 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

なし

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

ISF の機能解析に関する研究

分担研究者 中島 秀明 東京大学医科学研究所 特任助教授

研究要旨

プロトンポンプサブユニット ISF の生理機能解析を進めた。ISF のプロトンポンプ機能を消失させた変異体を作成し検討を行ったところ、ISF 変異体では造血幹細胞の支持活性が著しく低下していることが判明した。このことは、ISF 過剰発現による造血幹細胞支持能の増強はプロトンポンプ機能に依存していることを示し、プロトンポンプを介した細胞質内あるいは細胞内小器官の pH 変化がこれらの変化を引き起こしているかと推察された。また、ISF および ShIF を発現している間質細胞株から抽出した RNA を用いて cDNA マイクロアレー解析を行い、ISF 過剰発現により発現が変化する遺伝子として TIMP-3 と SFRP-1 を同定した。興味深いことに、生化学的な検討から TIMP-3 は Ang-1 と直接結合し、そのシグナルを抑制することが明らかとなった。また、TIMP-3 あるいは SFRP-1 を強制発現した造血幹細胞／前駆細胞をマウスに骨髄移植するとこれらの細胞の長期骨髄再建能は著しく低下していた。SFRP-1 は Wnt の内因性抑制因子として知られ、Wnt 活性の抑制を介して造血幹細胞の自己複製を抑制していると考えられる。以上のことより、TIMP-3 と SFRP-1 はそれぞれ Ang-1, Wnt シグナルを抑制することにより、造血幹細胞機能を負に制御していることが明らかになった。

A. 研究目的

造血幹細胞（hematopoietic stem cell: HSC）は、成体骨髄中にごくわずか存在し、自己複製を行うとともにすべての血液細胞に分化する能力を持った細胞である。造血幹細胞は骨髄中の niche とよばれる微小環境に存在し、

自らを複製・維持するとともに、必要に応じて分化・増殖し各種の血球細胞を産生する。このような造血幹細胞の動態は、サイトカイン・増殖因子・ケモカイン・接着因子・細胞外マトリックスなど、様々な外的因子により制御されていると考えられているが、このなかで骨髄ストローマ細胞が果たす

役割はきわめて重要である。骨髄ストローマ細胞は線維芽細胞・内皮細胞・脂肪細胞・骨芽細胞などからなるが、造血幹細胞は通常これらの細胞により構成される niche に存在し、互いの細胞表面に発現する細胞膜表面分子を介して接着 (homing)、静止状態を保ちながらゆっくりと自己複製を行っている。このように静止期にある造血幹細胞は、ひとたび血球産生の需要が高まると細胞周期に入り niche から動員されるとともに、G-CSF・エリスロポイエチンなどの系列特異的サイトカインの影響で分化・増殖し、各種血球産生を行う。以上のように、ストローマ細胞は造血幹細胞と緊密に相互作用しその自己複製・分化・増殖に深く関わっていると考えられているが、その分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

我々のグループは、造血幹細胞の自己複製メカニズムについてストローマ細胞による制御の観点から研究を行ってきたが、近年これに関わる骨髄ストローマ細胞由来因子として ISF (immune suppressor factor) (J. Biol. Chem. 2001) および mKirre (Nat. Immunol. 2003) を同定し報告してきた。ISF は 6 回膜貫通型の糖タンパク質で、vacuolar ATPase とよばれるプロトンポンプのサブユニットであり、これを強発現させたストローマ細胞株では

マウス骨髄細胞の増殖支持能が亢進することが判明している。一方 mKirre は骨髄ストローマ細胞株 OP9 よりクローニングされた 1 回膜貫通型分子で、in vitro における造血幹細胞の指標である LTC-IC (long term culture initiating cell) や CAFC (cobble stone-like area forming cell) を増幅させることを報告した。

本研究では、ISF および mKirre の解析を通じて、骨髄ストローマ細胞による造血幹細胞支持の分子メカニズムを明らかにし、ひいては造血幹細胞の自己複製・分化・増殖メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. ISF による造血幹細胞の増幅

ISF による造血幹細胞増幅が、ISF のプロトンポンプ機能に依存しているかどうかを検討するため、プロトンポンプ機能を欠失した ISF mutant を作成し造血幹細胞支持能を検討した。

(1) プロトンポンプ機能欠失 ISF mutant の作成

ISF の 755 番目の arginine を alanine に変えた mutant ではプロトンポンプ機能が失われることが報告されている。この変異を ISF および ShIF に導入し (ISF^{R755A}, ShIF^{R755A})、骨髄間質細胞株 MS10 に強制発現させた。

(2) ISF mutant による造血幹細胞支持

能の解析

マウス骨髄より分離した骨髄単核球を MS10/mock, MS10/ISF, MS10/ShIF, MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} 上で5週間共培養し、5週間後に回収した細胞をコロニーアッセイで解析した (LTC-IC アッセイ)。

2. ISF の下流分子の探索

昨年度の研究で ISF により発現が変化する遺伝子として TIMP-3 と SFRP-1 が同定された。本年度はこれら分子が ISF によりいかに制御されているか、また以下に述べるように TIMP-3, SFRP-1 が生理的造血に果たしている役割を検討した。

(1) ISF mutant による TIMP-3, SFRP-1 発現の制御

ISF による TIMP-3, SFRP-1 の発現抑制が ISF のプロトンポンプ機能に依存しているかどうかを検討するため、MS10/mock, MS10/ISF, MS10/ShIF, MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} での TIMP-3, SFRP-1 の発現をノーザンブロット、RT-PCR で検討した。

3. TIMP-3, SFRP-1 の造血に果たす役割

(1) TIMP-3, SFRP-1 の造血組織における発現

TIMP-3, SFRP-1 の生理的造血における役割を検討するため、定常状態およ

び 5FU 処理により造血刺激を加えた骨髄での発現を免疫組織染色法により検討した。

(2) TIMP-3 の Ang-1 シグナルに対する効果

TIMP-3 が造血幹細胞の生理的動態に与える影響を検討するために、造血幹細胞に作用する代表的なサイトカインである Ang-1 に与える影響を検討した。Ang-1 の受容体である Tie-2 を発現した BaF3 細胞を PBS で洗浄し IL-3 を除去した後、さらに TIMP-3 で 30 分処理し、Ang-1 で刺激した。刺激後 3, 5, 10, 15 分にて細胞を回収し、ウエスタンブロット法にて Tie-2 の自己リン酸化を検討した。

(3) TIMP-3 と Ang-1 の結合

TIMP-3 が Ang-1 シグナルを抑制する分子メカニズムを明らかにするため、TIMP-3 と Tie-2, Ang-1 の結合を BIACORE にて解析した。

(4) TIMP-3, SFRP-1 が正常造血に与える効果

TIMP-3, SFRP-1 の正常造血に与える影響を検討するため、TIMP-3, SFRP-1 マウス造血幹細胞に発現させ、その効果を骨髄移植の系で検討した。5FU 処理したマウスから採取した骨髄単核球にレトロウイルスを用いて TIMP-3, SFRP-1 を発現させ、放射線照射したレシピエントマウスに骨髄移植、移植後 4・8・12 週の末梢血を

解析し GFP 細胞の割合を FACS にて検討した。

C. 研究結果と考察

1. ISF による造血幹細胞の増幅

ISF による造血幹細胞増幅が、ISF のプロトンポンプ機能に依存しているかどうかを検討するため、プロトンポンプ機能を欠失した ISF mutant を作成し造血幹細胞支持能を検討した。

マウス骨髄より分離した骨髄単核球を MS10/mock, MS10/ISF, MS10/ShIF, MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} 上で 5 週間共培養し、5 週間後に回収した細胞をコロニーアッセイで解析した (LTC-IC アッセイ)。MS10/ISF, MS10/ShIF では MS10/mock に比して LTC-IC が約 10 倍に増加したのに対し、MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} では mock の約 3 倍へと減少した。以上より、ISF による造血幹細胞支持能亢進の少なくとも一部には ISF のプロトンポンプ機能が重要であることが明らかとなった。

2. ISF の下流分子の探索

昨年度の研究で ISF により発現が変化する遺伝子として TIMP-3 と SFRP-1 が同定された。本年度はこれら分子が ISF によりいかに制御されているか、また以下に述べるように TIMP-3, SFRP-1 が生理的造血に果たしている

役割を検討した。

ISF による TIMP-3, SFRP-1 の発現抑制が ISF のプロトンポンプ機能に依存しているかどうかを検討するため、MS10/mock, MS10/ISF, MS10/ShIF, MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} での TIMP-3, SFRP-1 の発現をノーザンブロット、RT-PCR で検討した。MS10/ISF, MS10/ShIF では TIMP-3, SFRP-1 の発現が mock の 10 分の 1 以下に減少していたのに対し、MS10/ISF^{R755A}, MS10/ShIF^{R755A} では MS10/mock と同じレベルに回復していた。このことから、ISF による TIMP-3, SFRP-1 の発現抑制には ISF のプロトンポンプ機能が必須であることが明らかとなった。

3. TIMP-3, SFRP-1 の造血に果たす役割

TIMP-3, SFRP-1 の生理的造血における役割を検討するため、定常状態および 5FU 処理により造血刺激を加えた骨髄での発現を免疫組織染色法により検討した。定常状態では骨髄での TIMP-3, SFRP-1 の発現はほとんど認められなかったが、5FU 処理した骨髄では骨髄表面上の骨芽細胞で TIMP-3, SFRP-1 の発現上昇が観察された。

また、TIMP-3 が造血幹細胞の生理的動態に与える影響を検討するために、造血幹細胞に作用する代表的なサ

イトカインである Ang-1 に与える影響を検討した。Ang-1 の受容体である Tie-2 を発現した BaF3 細胞を TIMP-3 で処理した後 Ang-1 で刺激したところ、処理しない細胞に比して Tie-2 のチロシンリン酸化が数分の一に減少した。以上より TIMP-3 は Ang-1 シグナルを抑制することが明らかとなった。

さらに、TIMP-3 が Ang-1 シグナルを抑制する分子メカニズムを明らかにするため、TIMP-3 と Tie-2, Ang-1 の結合を BIACORE にて解析した。これにより、TIMP-3 は Ang-1 に直接結合することが明らかとなった。

TIMP-3, SFRP-1 の正常造血に与える影響を検討するため、TIMP-3, SFRP-1 マウス造血幹細胞に発現させ、その効果を骨髄移植の系で検討した。5FU 処理したマウスから採取した骨髄単核球にレトロウイルスを用いて TIMP-3, SFRP-1 を発現させ、放射線照射したレシピエントマウスに骨髄移植した。移植後 4・8・12 週の末梢血を解析すると、コントロールに比して TIMP-3, SFRP-1 を発現した細胞の割合は経時的に減少し、12 週後には数%以下となった。以上より、TIMP-3, SFRP-1 は正常造血を負に制御することが明らかとなった。

D. 結論

1. ISF の造血幹細胞増幅能支持メカニ

ズム

ISF による造血幹細胞支持能増強作用は、以上の研究により ISF のプロトンポンプ機能を介した作用によるものであることが明らかとなった。ISF によるプロトンポンプ輸送増強により細胞内環境が変化し、遺伝子発現の変化やサイトカインのプロセッシング変化を引き起こし、結果として造血幹細胞支持能増強につながっているものと考えられる。実際、細胞内 pH の変化により NF κ B などの細胞内シグナル伝達分子の機能が変化することが知られており、このようなメカニズムが関与している可能性もある。

2. TIMP-3, SFRP-1 による造血幹細胞機能の調節

ISF により発現が抑制される分子として TIMP-3, SFRP-1 を同定した。これら分子の発現は、5FU 処理などの造血刺激により造血幹細胞のニッチとして知られる骨芽細胞領域を中心に発現が上昇した。一方、TIMP-3 は造血幹細胞を静止状態に保つ因子として重要な Ang-1 の機能を抑制することが明らかとなり、これは TIMP-3 と Ang-1 の直接結合を介するものであることが示唆された。また SFRP-1 は、造血幹細胞の自己複製因子として知られる Wnt の受容体、Frizzled と相同性を有する可溶性因子であり、Wnt の内因性抑制因子と考えられている。以

上をまとめると、5FUなどの造血刺激により一過性に造血の需要が高まると、骨髓中の造血幹細胞ニッチにおいてTIMP-3 およびSFRP-1の発現が上昇し、それぞれAng-1, Wntのシグナルを一時的に抑制することが明らかとなった。これにより造血幹細胞は静止状態から細胞周期に入るとともに、細胞動態が自己複製から増殖・分化へとシフトし、大量の前駆細胞・成熟血球産生へ向かうと考えられる。

今後はTIMP-3 およびSFRP-1ノックアウトマウスの解析などにより、これら分子の生体内での役割をさらに明らかにしてゆきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tonozuka Y, Minoshima Y, Bao YC, Moon Y, Tsubono Y, Hatori T, Nakajima H, Nosaka T, Kawashima T, Kitamura T. (2004) A GTPase activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line. *Blood* 104 : 3550-3557

2) Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K.: Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. (2004) *Stem Cells*. 22:649-58

3) Walkley CR, Purton LE, Snelling HJ, Yuan YD, Nakajima H, Chambon P, Chandraratna RA, McArthur GA. (2004) Identification of the molecular requirements for an RAR α mediated cell cycle arrest during granulocytic differentiation. *Blood*, 103: 1286-1295

2. 学会発表

1) Immune suppressor factor (ISF) による造血幹細胞増幅のメカニズム 虫島秀明, 越野裕子, 福地由美, 柴田文, 北村俊雄 (日本血液学会・臨床血液学会総会, 2004年9月18日)

2) Immune suppressor factor confers enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells in bone marrow stroma. Hideaki Nakajima, Fumi Shibata, Yumi Fukuchi, Yuko Goto, Miyuki Ito, Toshio Kitamura. (The American Society of Hematology 2004.12.4-7)

G. 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

なし

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 の細胞外分泌型フォームの解析および同時に得られたストローマ細胞由来の膜・分泌型タンパク質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 の細胞外分泌型フォームの解析および同時に得られたストローマ細胞由来の膜型・分泌型タンパク質に関する解析を行った。

A. 研究目的

Kirre はストローマ細胞株 OP9 の cDNA library からシグナル配列単離法にて同定した 205 クローンから造血幹細胞支持機能を指標に選択された遺伝子であるが、その機序についてはほとんど分かっていない。昨年度の研究において、分担研究者は Kirre の抗体を作成する事で、その発現部位の詳細な解析および、細胞内情報伝達機構の解析を試みた。本年度は Kirre に細胞外分泌型が存在する事から、その分泌型フォームのリコンビナント蛋白を大量精製する事で、細胞外領域のリガンド/受容体の同定を試みた。また、シグナル配列単離法にて得られた他の遺伝子に関して得られた知見について述べる。

B. 研究方法

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, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM PMSF, 10 U/ml aprotinin 1mM EDTA) にて可溶化した後、50 μ 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。

細胞培養上清の分泌蛋白質のメチオニン標識による検出

COS-7 細胞を 6cm ディッシュに 1×10^5 まき一晚培養する。FuGene 法 (ロシ

ユ社)にて遺伝子導入した。これらの遺伝子にはカルボキシル末端に FLAG タグが付加されており抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析にて発現した蛋白質を検出できるようにしてある。36 時間後培養上清を除去し PBS にて 2 回洗浄後、0.5 mCi [³⁵S]methionine(ICN 社 TRAN-S) in 0.5 ml DMEM (Methionine-, SIGMA 社)を加え 4 時間培養。培養上清から遠心にて細胞成分を除去し、Microcon 10 (ミリポア社)にて蛋白を濃縮した。15%SDS-PAGE にて泳動後、標識された蛋白質を BAS2000 (富士フイルム社)にて検出した。

mKirre の細胞外分泌型リコンビナントタンパク質の作成と Fluorescein 標識

mKirre の細胞外領域に相当する cDNA 部分を PCR 法にて増幅し、ヒト免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域と結合した。コンストラクトはシーケンスして確認した後、発現ベクター pSSR α -bsr にサブクローニングして、CHO-k1 細胞に安定的に遺伝子導入した。リコンビナントタンパク質はこの細胞を無血清培地 (CD-CHO、インビトロジェン社)で培養した上清より protein G によってアフィニティー精製した。得られたリコンビナントタンパク質の一部は Fluorescein 標識キット (ISL 社)に

て標識した。

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。

オイルレッド O 染色

SST-6 遺伝子をレトロウィルスベクター(pMX-puro)導入した細胞とベクターのみを導入した OP9 細胞を Alpha-MEM+20%FBS の条件にて培養。培地を 3 日おきに交換した。4 週間細胞の継代せずに Confluent の状態で培養し続けた。染色時、細胞は 3.7% Formaldehyde/PBS にて 15 分間固定、Oil Red O 染色液に浸し、室温 15 分染色後、蒸留水にて 10 回洗浄した。

C. 研究成果

単離された膜型タンパク質の分泌型フォーム

以前の本研究において、ストローマ細胞株 OP9 よりシグナル配列単離法にて単離された 205 クローンの内、その発現組織部位、増殖因子 LIF 刺激による発現の変化、構造を指標に 7 クロー

ンの未知遺伝子の全長 cDNA を単離し SST1-7 とした。これらの cDNA のカルボキシル末端に FLAG タグを付加した全長 cDNA を一過性に COS7 細胞に発現させると、一部の cDNA(SST1, SST4 (mKirre), SST5)において、全長タンパク質の他に 20-30 kDa の短いタンパク質の発現が確認された。この際、ウェスタン解析はカルボキシル末端に付加した FLAG タグに対するモノクローナル抗体で行ったこと、SST1, SST4, SST5 はいずれも構造上 Ia 型の膜型タンパク質であること、これらの短いバンドの大きさがそれらのタンパク質の膜貫通領域および細胞内領域の合計に相当する事などから、これらのタンパク質において、細胞外領域がプロテアーゼによって切断されることが予想された。

そこで、COS7 細胞に一過性に発現ベクターを遺伝子導入した後、メチオニン標識し、培養上清中の標識タンパク質を検出した。この際、COS7 細胞自身も多くの分泌タンパク質を産生しているが、empty vector のみを遺伝子導入した control の COS7 細胞の培養上清と比較する事により、遺伝子導入した cDNA 由来の細胞外分泌タンパク質を全て検出する事ができる。この実験において、SST1, SST4, SST5 にて培養上清への蛋白質分泌が検出された。これらの遺伝子は構造的に膜型蛋白

質であること、分泌蛋白質の分子量がウェスタン解析で検出された成熟型蛋白質よりも約 20kDa 小さくなっていることから、これらの分泌型蛋白質はカルボキシル末端の膜貫通領域が切断されたものと考えられる。カルボキシル末端の膜貫通領域が切断されて分泌されるタイプの増殖因子として SCF がある。一方で、構造上分泌型のタンパク質である SST3 および SST7 においては、メチオニン標識された分泌タンパク質が検出されなかった。これらについては細胞外マトリックスタンパク質であり、培養上清中ではなく、大半が細胞外マトリックスの複合体内にトラップされる可能性や、細胞膜に付加した形で存在する可能性などを考えている。

上記の SST1, SST4, SST5 が、細胞膜貫通領域直上にて切断される事により細胞外領域のみが培養上清中に分泌されるという仮説を証明するために、それぞれの細胞外領域を抗原とした、ポリクローナル抗体を作成した。COS7 細胞に一過性にこれらの発現ベクターを遺伝子導入した後、無血清培地に置換し、得られた培養上清を濃縮してウェスタン解析を行ったところ、SST1 および SST5 においては、メチオニン標識の実験にて確認されたバンドと同じ大きさのタンパク質の存在が確認された。しかし SST4 について

は、メチオニン標識の実験の際に確認されたタンパク質と同じ大きさのタンパク質は検出できなかった。切断後の高次構造の変化、糖鎖付加による抗原性の変化などの可能性も考えられる。

mKirre の細胞外領域に結合するリガンド／受容体の探索

SST4(mKirre)はOP9細胞に高発現させた場合、マウス造血幹細胞の支持機能を高める事が明らかとなっているが、その機序は不明である。最も単純なものとしては、mKirre がリガンドとして造血幹細胞に発現されている未知の受容体に作用する可能性、あるいは逆に造血細胞が発現する膜／分泌型タンパク質の受容体となり、ストローマ細胞の造血細胞支持機能を間接的に増強しているという可能性があげられる。これらのモデルでは mKirre の細胞外領域に結合する受容体あるいはリガンドが存在すると仮定され、これらを同定する事で mKirre の機能解析が大きく前進することになる。そこで、mKirre の細胞外領域全長を含み細胞膜貫通領域以下を欠失した細胞外分泌型 cDNA をヒト免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域との融合タンパク質の形で作成し、CHO-k1 細胞に安定的遺伝子導入してその培養上清から精製した。このリコンビナントタンパク質

を Fluorescein 標識し FACS 解析にていくつものヒト白血病細胞株の細胞膜上にその受容体／リガンドが存在するかどうかを検索した。この際、作成したリコンビナントタンパク質はマウスの配列であり、入手可能な白血病細胞株の大半がヒト由来であるため、マウスの mKirre がヒトの受容体／リガンドに結合しない可能性も考えられたが、ヒトの mKirre の配列も判明しており、細胞外領域においてはアミノ酸レベルにてマウス mKirre と数個の違いしかないことから使用可能と判断した。

FACS 解析の結果

BALL1	1.97%
BalmI	0.23%
Daudi	0.01%
HA	0.26%
Hel	1.47%
IM9	0.08%
JoskI	52.02%
(FcBlock 1.55%)	
Jurkat	0.66%
K562	3.12%
(FcBlock 2.87%)	
P300HK	0.28%
Ramos	0.96%
THP1	57.4%
(FcBlock 1.73%)	

Joksi, THPI に関しては、単球系の細胞株であり、FcBlock にてその陽性細胞が劇的に減っていることから、ヒト免疫グロブリン Fc 部分を Fc 受容体が認識している擬陽性と考えられた。K562 に関しては、FcBlock にてもほとんど陽性率が変化しなかったが、その陽性率は低く受容体/リガンド分子を単離する有望な材料とは考えられなかった。また、もし mKirre の細胞外領域に結合する分子が分泌型の分子であった場合、この方法で高発現細胞を選別するのは困難である可能性も考えられる。

SST7 の脂肪細胞分化に対する効果
SST7 は構造的には非常に短い分泌型のタンパク質と考えられるが、既存の遺伝子と相同性が認められない事、メチオンin標識実験にて培養上清中に分泌が認められなかった事から、解析が進んでいなかった。しかし、OP9 細胞を LIF で刺激した際に一過性の発現低下が認められる事から、ストローマ細胞において、造血支持機能に関与する何らかの役割を担っている可能性も考えられた。しかし、その造血支持機能を調べるために SST7 をレトロウイルス発現ベクター pMX-puro を用いて OP9 細胞に高発現させたところ、約 4 週間の培養の後、OP9 細胞を高率に脂肪細胞に分化させる効果があるこ

とが判明した。この遺伝子が、造血幹細胞よりもむしろ間葉系の細胞に作用して脂肪細胞への分化に関与している可能性が考えられた。

D. 考察

分泌型フォームの存在

シグナル配列単離法によって得られた遺伝子の大半は膜型タンパク質であり、また構造的には分泌型であっても細胞外マトリックスの場合には基本的にこれら遺伝子が発現する細胞に接着した細胞に対してのみ作用を持ちうると考えられる。しかし、造血幹細胞を造血支持細胞とともに培養してその切片を電子顕微鏡によって観察すると、造血幹細胞の細胞膜は必ずしも造血支持細胞と直接は接着しておらず、造血支持細胞の作る閉鎖空間内に浮遊しているか、造血支持細胞の突起に限局的に接触している像が観察される。この事は造血支持細胞の産生するタンパク質の内、造血幹細胞に作用しうる遺伝子産物としては膜型タンパク質よりも分泌型タンパク質の方が有利である事を示唆している。実際、これまで、単離された造血因子の多くは分泌型のタンパク質である。一方で、SCF は膜型と分泌型の両方のフォームを持っており、膜型分子は接着分子的役割も担っている事が報告されている。今回私たちが単離

した未知遺伝子の7個のうち3個までもが細胞外領域が切断されることで分泌される事は興味深い事実である。もちろん増殖因子であれば、造血支持細胞と直接接触しなくても遠隔的に造血細胞に作用しうる事になり、一方で接着分子としても、その切断によって接着の強さの調整などに関与している可能性も考えられる。

造血における細胞外マトリックスタンパク質の役割

今回のシグナル配列単離法によって多くの既知細胞外マトリックスタンパク質が単離され、また未知遺伝子のなかでも構造上 SST3 は細胞外マトリックスタンパク質である可能性が高い。造血支持細胞は多くの細胞外マトリックスタンパク質を産生しており、造血支持細胞自身の形態維持、造血微小環境 (niche) の立体的構築に重要な役割を担っている事はもちろんであるが、一方で、前述の電子顕微鏡的観察からも、造血幹細胞の増殖、生存、ホーミングに重要な役割を果たしている事が予想される。実際、(1) fibronectin のノックアウトマウスは造血障害を起こす事が知られている事、(2) その受容体のひとつである Integrin が造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要である事が報告されている事、(3) Integrin などマトリックス

タンパク質受容体の細胞内情報伝達経路も詳細に解析されており、そのシグナル伝達経路が受容体型チロシンキナーゼおよびサイトカイン受容体と、一部共通である事、などの事実から、マトリックスタンパク質も広い意味での造血因子と考えられる。今後の研究において、ストローマ細胞の産生するマトリックス蛋白質の機能に関しても興味深い。

mKirre の造血支持機序について

前述の様に mKirre がストローマ細胞の造血支持機能を増強する機序は不明であり、我々はいくつかの仮説を立てて解析を進めている。(1) リガンドとして造血幹細胞に発現されている未知の受容体に作用する可能性、(2) 造血細胞が発現する膜/分泌型タンパク質の受容体となり、ストローマ細胞の造血細胞支持機能を間接的に増強しているという可能性、(3) ストローマ細胞自身が受容体/リガンドを発現しており、autocrine に造血支持機能を増強している可能性、などが考えられる。また、Eph, Eph-ligand の様に互いの細胞内情報伝達経路に作用して双方向に受容体-リガンド関係を担っている可能性も考えられる。これまで得られた知見では、mKirre はストローマ細胞存在下においてのみ造血幹細胞を支持しており、少なくともその

機能を発揮するためにはその他の多くの造血関連分子との協調が必要であると考えられる。

SST7 と脂肪細胞分化

成体骨髄内には造血組織だけでなく、間葉系幹細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脂肪細胞などの多くの種類の細胞が存在し様々な機能を担っている。造血支持細胞であるストローマ細胞は間葉系幹細胞に由来していると考えられるが、近年の報告により、造血微小環境を構成し、造血支持機能を有している細胞は骨芽細胞であるという報告がなされている。今回の研究においても、OP9 細胞自身がある一定の条件下においては脂肪細胞に分化したり、OP9 細胞から単離された遺伝子の中に osteopontin など骨代謝関連遺伝子が含まれているなど、それらの密接な関係を示唆する知見が得られている。こうした背景の元、ストローマ細胞から単離された遺伝子の中に、造血関連遺伝子だけでなく、骨代謝や脂肪細胞制御に関連する遺伝子群が含まれている事は充分予想できる。実際現段階では非常に preliminary な知見であるが、SST7 がストローマ細胞の脂肪細胞分化に関与している事を示唆する結果が得られた事は大変興味深い。

E. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. 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. Hum Mol Genet, 2004; 13(2) :171-179

2. 学会発表

1) Cloning and functional analysis of secreted and membrane molecules expressed in bone marrow stromal cells. Hiroo Ueno, Mao Sakita-Ishikawa, Toru Nakano, Yoshihiro Morikawa, Toshio Kitamura, & Masaki Saito. (Virology, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan, 2003. Mar29-Apr3, Keystone Symposia, From Stem Cells to Therapy)

F. 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

日本国出願番号 特願 2003-523654

PCT 出願番号 PCT/JP02/08456

2) 抗 mKirre 抗体

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
殿塚 行雄	A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemia cell line	Blood	104	3550- 3557	2004
福地 由美	Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell potential	Stem Cells	22	649- 658	2004

A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line

Yukio Tonzuka, Yukinori Minoshima, Ying Chun Bao, Yuseok Moon, Yohei Tsubono, Tomonori Hatori, Hideaki Nakajima, Tetsuya Nosaka, Toshiyuki Kawashima, and Toshio Kitamura

We previously identified a guanosine triphosphatase (GTPase)-activating protein (GAP) male germ cell Rac GAP (MgcRacGAP) that enhanced interleukin-6 (IL-6)-induced macrophage differentiation of murine M1 leukemia cells. Later, MgcRacGAP was found to play crucial roles in cell division. However, how MgcRacGAP enhanced IL-6-induced differentiation remained elusive. Here we show that MgcRacGAP enhances IL-6-induced differentiation through enhancement of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) activation. MgcRacGAP, Rac, and STAT3 formed a

complex in IL-6-stimulated M1 cells, where MgcRacGAP interacted with Rac1 and STAT3 through its cysteine-rich domain and GAP domain. In reporter assays, the wild-type MgcRacGAP enhanced transcriptional activation of STAT3 while a GAP-domain deletion mutant (Δ GAP) did not significantly enhance it, suggesting that the GAP domain was required for enhancement of STAT3-dependent transcription. Intriguingly, M1 cells expressing Δ GAP had no effect on the differentiation signal of IL-6, while forced expression of MgcRacGAP rendered M1 cells hyper-responsive to the IL-6-induced differentia-

tion. Moreover, knockdown of MgcRacGAP by RNA interference profoundly suppressed STAT3 activation, implicating MgcRacGAP in the STAT3-dependent transcription. All together, our data not only reveal an important role for MgcRacGAP in STAT3 activation, but also demonstrate that MgcRacGAP regulates IL-6-induced cellular differentiation in which STAT3 plays a pivotal role. (Blood. 2004;104:3550-3557)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

The signal transducer and activator of transcription (STAT) family members STAT1-4, STAT5A, STAT5B, and STAT6 are activated through phosphorylation by the Janus kinase (JAK) family upon cytokine stimulation. The phosphorylated STATs form homodimers or heterodimers and translocate into the nucleus, where they regulate expression of their target genes.¹⁻⁴ Among them, STAT3 is activated mainly by the interleukin-6 (IL-6) family cytokines including IL-6, oncostatin M, and leukemia inhibitory factor (LIF), and is implicated in a wide range of biologic processes, including nephrogenesis, gliogenesis, hepatogenesis, T-cell proliferation, inflammation, and oncogenesis.⁵⁻¹¹ The critical role of STAT3 in myeloid differentiation was demonstrated by the use of dominant negative mutants.¹²⁻¹⁴ In contrast, in embryonic stem cells, STAT3 is required for self-renewal.¹⁵⁻¹⁹ In addition, STAT3 is activated in a broad spectrum of human hematologic malignancies.²⁰ STAT3 can also be negatively regulated. Among the known inhibitors of STAT proteins are the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins,²¹ also known as Janus kinase binding (JAB) proteins²² or STAT-induced STAT inhibitors (SSIs).²³ While SOCS proteins interact with JAKs and reduced their tyrosine kinase activity,²¹⁻²³ a STAT3 inhibitor protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) directly binds to STAT3 and inhibits its activity.²⁴ A zinc finger protein Gfi-1 enhances STAT3 signaling by preventing this binding of PIAS3 to STAT3.²⁵ Several other molecules have been found to interact with activated STAT3. Among them, cellular Jun (c-Jun)

forms a complex with STAT3 and activates the α_2 -macroglobulin promoter that contains both STAT3- and c-Jun-binding sites.^{26,27} Like many other transcription factors, STAT3 associates with a transcriptional cofactor, cAMP response element binding protein-binding protein/p300 (CBP/p300), to form a transcriptional complex.²⁸ A protein called gene-associated with retinoid interferon-induced mortality (GRIM)-19 suppresses STAT3 activity through cytoplasmic retention of STAT3, whereas an endothelial cell-derived zinc finger protein (EZI) enhances STAT3 activity through nuclear retention of STAT3.^{29,30} There may be more such regulators in various steps of STAT3 action, such as translocation to the nucleus, induction of chromatin remodeling, and proteolysis.

In a search for key molecules that prevent IL-6-induced terminal differentiation of murine myeloid leukemia M1 cells, we identified an antisense DNA for the full-length form of male germ cell Rac guanosine triphosphatase-activating protein (MgcRacGAP) through functional cloning.³¹ An N-terminus-truncated form of MgcRacGAP had been isolated and named male germ cell Rac GAP, as its expression was highest in testis.³² Rac, Cdc42, and RhoA, the Rho family of small guanosine triphosphates (GTPases), play pleiotropic roles in a variety of cell functions such as transformation, migration, cytokinesis, and transcriptional activation.³³⁻³⁵ Recently, MgcRacGAP and Cyk4, a counterpart of *Caenorhabditis elegans*, have been proven to be essential for cell cycle progression, in particular completion of cytokinesis.³⁶⁻⁴⁰

From the Division of Cellular Therapy and the Division of Hematopoietic Factors, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Submitted March 26, 2004; accepted July 6, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, July 29, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-03-1066.

Supported by the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture and the Ministry of Health and Welfare, Japan; the Division of Hematopoietic Factors is supported by the Chugai Pharmaceutical Co.

Reprints: Toshio Kitamura, Division of Cellular Therapy, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan; e-mail: kitamura@ims.u-tokyo.ac.jp.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology