

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yujiri, T., Nawata, R., Takahashi, T., Sato, Y., Tanizawa, Y., Kitamura, T., and Oka, Y. (2003) MEK kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression. *J. Biol. Chem.* 278:3846-3851.
- 2) Ozawa, T., Sako, Y., Sato, M., Kitamura, T., and Umezawa, Y. (2003) A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat. Biotechnol.* 21:287-293.
- 3) Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y-C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S.Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M., and Kitamura, T. (2003) Phosphorylation by Aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev. Cell* 4:549-560.
- 4) Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003) Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning, powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* 31:1007-1014.
- 5) Bao, Y-C., Ysuruga, H., Hirai, M., Kitamura, T., and Kumagai, H. (2003) Identification of a human cDNA sequence which encodes a novel membrane-associated protein containing a zinc metalloprotease motif. *DNA Research.* 10:123-128.
- 6) Murata, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Irie, M., Nakajima, H., Tamitsu, K., Nosaka, T., Asano, S., and Kitamura, T. (2003) A novel tyrosine kinase inhibitor GTP14564 specifically inhibits constitutively active fms-like tyrosine kinase-3 through inactivation of STAT5. *J. Biol. Chem.* 278:32892-32898.
- 7) Hisaoka, T., Morikawa, Y., Kitamura, T., and Semba, E. (2003) Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing and the adult mouse brain. *Brain Research* 143:105-109.
- 8) Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T., and Taga, T. (2003) Requirement of gp130 signaling for the AGM hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 31:283-289.
- 9) Tahara, H., Fujio, K., Araki, Y., Setoguchi, K., Misaki, Y., Kitamura, T., and Yamamoto, K. (2003) Reconstitution of CD8+ T cells by retroviral transfer of the T-cell receptor ab chain genes isolated from a clonally expanded P815 infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 171:2154-2160.
- 10) Kumagai, H., Oki, T., Tamitsu, K., Feng, S-Z., Ono, M., Nakajima, H., Bao, Y-C., Kawakami, Y., Nagayoshi, K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Kawakami, T., and Kitamura, T. (2003) Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:719-729.

- 11) Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Masuoka, N., Ymane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2004) Functional analysis of PU.1 domains in monocyte-specific gene regulation. *FEBS letters* 561:63-68.
- 12) Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Maeda, K., Masuoka, N., Yamane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2004) Overproduction of PU.1 in mast cell progenitors: its effect on monocyte- and mast cell-specific gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:516-521.
- 13) Chamoto, K., Tsuji, T., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Sato, T., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Takeshima, T., Togashi, Y., and Nishiyama, T. (2004) Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. *Cancer Res.* 64:386-390.
- 14) Nakayama, Y., Nara, N., Kawakita, Y., Takeshima, Y., Arakawa, M., Katoh, M., Morita, S., Iwatsuki, K., Tanaka, K., Okamoto, S., Kitamura, T., Seki, N., Mtsuda, R., Matsuo, M., Saito, K., and Hara, T. (2004) *American J. Pathol.* 164:1773-1782.
- 15) Ohtsuka M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, M., Kitamura, T., Moriya, H., and Saito, T. (2004) NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8126-8131.
- 16) Ikeda, Y., Imai, Y., Kumagai, H., Nosaka, T., Morikawa, Y., Hisaoka, T., Manabe, I., Maemura, K., Nakaoka, T., Imamura, T., Miyazono, K., Komuro, I., Nagai, R., and Kitamura, T. (2004) Vasin, a novel TGF- $\beta$  binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:10732-10737.
- 17) Nishizawa, H., Matsuda, M., Yamada, Y., Kawai, K., Suzuki, E., Makishima, M., Kitamura, T., and Shimomura, I. (2004) Musculin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J. Biol. Chem.* 279:19391-19395.
- 18) Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Bao, Y.C., Moon, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kawashima, T. and Kitamura, T. (2004) A GTPase activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and differentiation of a leukemic cell line. *Blood* 104: 3550-3557.
- 19) Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., and Tsuji, K. (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cell* 22:649-658.

- 20) Sasanuma, H., Tatsuno, A., Tsuji, K., Hidano, S., Morita, S., Kitamura, T., Kubo, M., Kitamura, D., and Goitsuka, R. (2004) Transcriptional regulation of SLP-76 family hematopoietic cell adaptor MIST/Clnk by STAT5. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 321:145-153.
- 21) Ocegüera-Yanez, F., Kimura, K., Yasuda, S., Higasida, T., Kitamura, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, N., and Narumiya, S. (2005) Ect-2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. **J. Cell Biol.** 168:221-232.
- 22) Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Suzuki, R., Kitamura, T., Akira, S., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2005) Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. **Cell Metabolism**, in press.
- 23) 北村俊雄 (2003) レトロウイルスによる遺伝子導入法 新遺伝子工学ハンドブック (羊土社) p174-178
- 24) 箕嶋幸範、川島敏行、北村俊雄 (2003) Aurora B によりリン酸化された MgcRacGAP は細胞質分裂を制御する 実験医学 21:1218-1221.
- 25) 北村俊雄 (2003) レトロウイルスベクター・ポストゲノム研究の強力なツール 必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール (羊土社) p82-88
- 26) 北村俊雄、野阪哲哉 (2003) 新規チロシンキナーゼ GTP14564 と Flt3 今日の移植 17:416-420.
- 27) 北村俊雄、野阪哲哉 (2004) 新規チロシンキナーゼ GTP14564 と Flt3 今日の移植 17:416-420.
- 28) 北村俊雄、熊谷英敏、野阪哲哉 (2004) Flt3 阻害剤 血液フロンティア 14: 47-53.
2. 学会発表
- 1) 細胞内情報伝達・分子細胞医学：造血幹細胞のシグナル伝達 北村俊雄 (日本医学会総会、2003年4月6日)
- 2) マウス骨髄マスト細胞由来新規抑制性レセプターの同定と解析 熊谷英敏、沖俊彦、北村俊雄 (日本血液学会・臨床血液学会、2003年8月28日)
- 3) Rho/Rac/MgcRacGAP による細胞質分裂と細胞分化の調節 北村俊雄 (東京大学医科学研究所—大阪大学蛋白質研究所合同プロテオミックスシンポジウム、2003年11月25日)
- 4) IgE 感作により惹起されるマスト細胞接着の解析 沖俊彦、熊谷英敏、北村俊雄 (免疫学会、2003年12月9日)
- 5) Aurora B によりリン酸化された MgcRacGAP は細胞質分裂を制御する 箕嶋幸範、川島敏行、廣瀬晃一、河尻愛恵、達家雅明、野阪哲哉、佐藤孝哉、稲垣昌樹、北村俊雄 (日本分子生物学会、2003年12月10日)

6) 白血病に対する分子標的療法 北村俊雄  
(産学連携フォーラム、2004年2月19日)

7) High Efficiency Retrovirus-Mediated Gene Transfer and Its Application in a Variety of Experiments. Toshio Kitamura. (“免疫システムの構築・作動の分子機構とその制御技術の開発” 国際ワークショップ 2004年2月16日～17日)

8) Co-ordinate Control of Cell Division and Differentiation by a GTPase Activating Protein MgcRacGAP/Cyk4. Toshio Kitamura. (日豪シンポジウム、2004年3月29日～31日)

## 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

#### 1) パッケージング細胞 PLAT-E

(発明者：北村俊雄、森田純代)

PCT 国際公開 WO00/73423 号

欧州公開 EP1186655A 号

#### 2) シグナルシーケンストラップ法

(発明者：北村俊雄、小嶋哲郎)

PCT 国際公開 WO99/26978 号

日本とロシアでのみ特許成立

(日本国特許番号 3499528 号)

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 東京大学医科学研究所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試みたが、現在まで成功していない。

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。

そこで平成 16 年度は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替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、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 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) Nosaka, T., Morita, S., Kitamura, H., Nakajima, H., Shibata, F., Morikawa, Y., Kataoka, Y., Ebihara, Y., Kawashima, T.,

- Itoh, T., Ozaki, K., Senba, E., Tsuji, K., Makishima, F., Yoshida, N., and Kitamura, T. (2003) Mammalian twisted gastrulation is essential for skeleto-lymphogenesis. **Mol. Cell. Biol.** 23: 2969-2980.
- 2) Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003) Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning, powerful tools in functional genomics. **Exp. Hematol.** 31: 1007-1014.
- 3) 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.
- 4) Ikeda, Y., Imai, Y., Kumagai, H., Nosaka, T., Morikawa, Y., Hisaoka, T., Manabe, I., Maemura, K., Nakaoka, T., Imamura, T., Miyazono, K., Komuro, I., Nagai, R. and Kitamura, T. (2004) Vasorin, a novel TGF- $\beta$  binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101:10732-10737.
- 5) 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.
- 6) 北村俊雄、野阪哲哉 (2004) 新規チロシンキナーゼ GTP14564 と Flt3 今日の移植 17:416-420.
- 7) 北村俊雄、熊谷英敏、野阪哲哉 (2004) Flt3 阻害剤 血液フロンティア 14: 47-53.
2. 学会発表
- 1) 細胞質分裂における MgcRacGAP の働き 箕嶋幸範、川島敏行、廣瀬晃一、河尻愛恵、野阪哲哉、稲垣昌樹、北村俊雄 (第 56 回日本細胞生物学会大会、2003 年 5 月 14 日~16 日)
- 2) Phosphorylation by AURORA A-B converts MGCRCACGAP during cytokinesis. Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Nosaka, T., Kitamura, T. (International Society for Experimental Hematology, 2003.7.7)
- 3) MLL-SEPT6 Requires Both a GTP-binding Domain and a Colicin-like Region of SEPT6 to Transform Murine

- Primary Bone Marrow Cells in Concert with FLT3 Internal Tandem Duplication. Ryoichi Ono, Hideaki Nakajima, Hidetoshi Kumagai, Ktsutoshi Ozaki, Tomohiko Taki, Toshio Kitamura, Yasuhide Hayashi, Tetsuya Nosaka. (The American Society of Hematology, 2003.12.4~12.9)
- 4) Aurora B によりリン酸化された MgcRacGAP は細胞質分裂を制御する 箕嶋幸範、川島敏行、廣瀬晃一、河尻愛恵、達家雅明、野阪哲哉、佐藤孝哉、稲垣昌樹、北村俊雄 (第 26 回日本分子生物学会年会、2003 年 12 月 10 日)
- 5) 小児急性骨髄性白血病における血小板由来増殖因子  $\alpha$  受容体 (PDGFRA) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 小児急性骨髄性白血病における血小板由来増殖因子  $\alpha$  受容体 (PDGFRA) 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)
- 9) 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)
- 10) 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

## 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と考えられた。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に存在し、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<sup>R755A</sup>, ShIF<sup>R755A</sup>)、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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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、ウェ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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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<sup>R755A</sup>, MS10/ShIF<sup>R755A</sup> 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 週間には数%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 $\kappa$ 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、骨髄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) Tonzuka 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 $\alpha$  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 中島秀明、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。また、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

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、造血支持機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等、現在までのところほとんど分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及び、モノクローナル抗体を作成して骨髄内発現部位を検索した。また、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

### 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 抗体、Pharmingen 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。

### ノーザンブロットイ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 µg 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イングを行った。

### 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。

### mKirre に対するモノクローナル抗体の作製

mKirre のアミノ酸配列の 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小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、及び4B10)樹立した。

#### 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  $\mu$ 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。

#### 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 $2.5 \times 10^5$ 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 $1 \times 10^5$ まき、6日後に形成されたCAFCを免疫染色した。

#### 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。

#### 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 $1 \times 10^5$ 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

[<sup>35</sup>S]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 $\alpha$ -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。

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

RT-PCR 及びノーザンブロッティングの結果 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- $\Delta$ 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 ELIZA 法により、mKirre-HitFc 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。結果を次の表 1 に示す。

#### 2 種抗原による交叉反応 (ELIZA) 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 ELIZA 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はわかった。

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とわかった。