

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

平成16年度総括・分担研究報告書

平成17（2005）年3月

主任研究者 白井睦訓

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

2004 年度研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH ON THE DEVELOPMENT
OF ARTIFICIAL BLOOD BY INDUCTION OF DIFFERENTIATION
OF STEM CELL IN CULTURE

平成17（2005）年3月

主任研究者 白井睦訓

Chairman: Mutsunori SHIRAI

Department of Microbiology and Immunology,

Yamaguchi University School of Medicine

目次

I. 平成16年度総括研究報告	5
II. 平成16年度分担研究報告	11
1. 造血・免疫系幹細胞分化誘導技術の新規治療法開発への応用に関する研究	13
白井 睦訓	
2. マウス幹細胞から造血・免疫系細胞への分化誘導技術の開発に関する研究	24
鈴木春巳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
VI. 研究成果の刊行物・別冊	39

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

平成16年度

総括研究報告

白井睦訓

山口大学医学部医学科生殖・発達・感染医科学講座

総括研究報告書

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

主任研究者 白井睦訓 山口大学医学部医学科生殖・発達・感染医科学講座 教授
分担研究者 鈴木春巳 山口大学医学部医学科生殖・発達・感染医科学講座 助教授

研究要旨

平成16年度はほぼ計画どおりの成果を得ており、B細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働く Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞（造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞）を *in vitro* で調整して多分化能を長期間維持する技術（特許出願準備中）、多分化能を長期間維持させた同 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ、B細胞以外の造血・免疫系細胞へ分化させる技術、同 *in vivo* での分化制御解析を新規の分化制御遺伝子探索システムとして確立して利用する技術（特許出願）、さらに同システムで探索した様々な制御遺伝子を導入した Pax5 遺伝子欠損 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ胸腺内で特定な機能を保有する T 細胞への分化を調節できる技術（特許出願）をほぼ確立した。特に、Pax5 欠損 ProB細胞に独自の各種遺伝子ライブラリーや本計画で探索した Erk5、Rac1 などの分子が造血・免疫系の各分化系での分化、コミットメントに直接関与して T 細胞の正負の選択に大きな役割を果たしていることが分かってきた（投稿中）。多分化能を長期間維持する LIF は直接 T 細胞系列への分化を促進するというよりは、GATA 遺伝子など重要因子の発現上昇により未分化細胞における T 細胞系列への分化能力を維持させる作用があるものと考えられた。造血・免疫系の分化制御遺伝子候補5個程度については解析の成果をもとにノックアウトマウスなど遺伝子組み換えマウスの作製準備に入った。次年度以降の研究で幹細胞分化技術を利用した人工血液医療への応用を展開する計画である。

A.研究目標

幹細胞が多系列への分化能（未分化性）を保持しながら自己複製できるメカニズムの解明は、人工血液の開発を目指す遺伝子操作幹細胞を利用する再生医療技術の開発においても非常に重要である。全ての血球は骨髄中の造血幹細胞から分化するが、この多系列分化能とその自己複製能の維持機構はまだよくわ

かっていない。申請者らは胸腺 cDNA ライブラリーの遺伝子機能スクリーニング、バイオインフォマティクス情報解析を通じてすでに多くの胸腺特異的発現遺伝子、造血・免疫系再生分化候補遺伝子の独自探索に成功しており、今後の詳細な解析でさらに多くの再生分化因子の解明が期待できる。

我々の探索解析システムに用いる Pax5 遺伝

子欠損 ProB細胞は *in vitro*で長期間培養でき、 γ 線照射 RAG 欠損マウスに移入すると骨髄中で自己複製し、B細胞以外の全ての造血系細胞を長期間にわたって供給できることが最近解明されている。Pax5はB細胞の分化に必須の転写因子であるとともにB細胞以外の他の系列への分化を抑制するリプレッサーとして働くため、造血系細胞一般のコミットメントを制御している重要な分子であることがわかってきた。この Pax5 遺伝子欠損 ProB細胞は造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞であり、長期培養や遺伝子導入が容易な「モデル造血幹細胞株」として利用できる (特許考案中)。現在 *in vivo*でT細胞の分化を再構築できる株化細胞は今のところこの細胞以外には知られていない。

本研究ではこの Pax5 欠損 ProB細胞の特色を活かし、独自に作製した免疫細胞由来遺伝子ライブラリーや探索した多くの再生分化遺伝子候補をこの細胞に導入し、造血系各細胞系列再生分化のコミットメントに関わる新規分子の探索、および造血幹細胞の未分化性を維持する機構を解明する。さらにT細胞分化能の維持にかかわるサイトカイン作用機構を解明して造血・免疫系への *in vitro*再生分化技術を開発する。造血・免疫系の分化制御遺伝子候補5個程度については解析の成果をもとにノックアウトマウスなど遺伝子組み換えマウスの作製して、これら動物での分化の解析を進める。造血幹細胞の多分化能を回復、維持させる機能を持つ遺伝子の探索、造血・免疫系多分化能制御因子の *in vivo*解析、生体内造血・免疫系多分化能維持技術と造血・免疫系組織再構築技術の開発、*in vivo*での造血・免疫系組織再構築技術の開発し、その技術をもとにヒト造血・免疫系細胞の分化技術へ応用できる技術にまで開発して同技術を利用した人工血液医療の開発に繋げる。

B~D. 研究方法、成果、考察および結論

1. 造血・免疫系幹細胞分化制御因子の探索、解析システムの確立

Pax5はB細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働くが、この Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞は *in vitro*で長期間培養でき、 γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入すると骨髄中で自己複製し、B細胞以外の全ての造血系細胞を長期間にわたって供給できるので、造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞と考えられ (特許考案中)、本計画の探索、解析システムとして Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞に、独自に作製した免疫細胞由来 cDNAライブラリーや探索した多くの再生分化候補遺伝子を導入発現させることにより造血系細胞のコミットメントに関わる新規分子の探索、および造血幹細胞の未分化性を維持する機構を解明し、特殊培養法や遺伝子導入による造血・免疫系各細胞系列への *in vitro*再生分化技術、*in vivo*での造血・免疫系組織再構築技術の開発が可能となった。

2. 造血・免疫系幹細胞分化誘導技術の新規治療法開発への応用に関する研究

平成16年度の研究は、当初の計画書に従って順調に進捗し、計画の全てを年度内に実施できた。当初に期待した成果をほぼ得ており、B細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働く Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞 (造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞) を *in vitro*で調整して多分化能を長期間維持する技術 (特許出願準備中)、多分化能を長期間維持させた同 ProB細胞を γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ、B細胞以外の造血・免疫系細胞へ分化させる技術、同 *in vivo*での分化制御解析を新規の分化制御遺伝子探索システムとして確立して利用する技術 (特許出願)、さらに同システムで探索した様々な制御遺伝子を導入した Pax5 遺伝子欠損 ProB細胞を γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ胸腺内で特定な機能を保有する T細胞への分化を調節できる技術 (特許出願) をほぼ確立した。Pax5 欠損

ProB細胞に独自の各種遺伝子ライブラリーや探索した分化制御遺伝子候補を導入・発現させ、*in vitro*培養したマクロファージ、NK細胞、T細胞など造血・免疫系の各分化系での解析により、分化、コミットメントに直接関与する分子の同定を試み、Erk5、Rac1などの分子が胸腺内でのT細胞の分化段階で正負の選択に大きな役割を果たしていることが分かってきた（投稿中）。我々の解析の成果として探索した造血・免疫系の分化制御遺伝子候補5個程度については共同研究者とノックアウトマウスなど遺伝子組み換えマウスの作製準備に入った。次年度以降の研究でこれら重要分化関連遺伝子解析を推進して、幹細胞分化技術を利用した人工血液医療への応用を展開する計画である。

3. マウス幹細胞から造血・免疫系細胞への分化誘導技術の開発に関する研究—幹細胞の多分化能の維持機構の解明—

Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞を、1ヶ月程度 *in vitro* で培養したところ、多分化能を失い T 細胞への分化能が完全に失われてしまうことが明らかとなった。我々はこの長期の *in vitro* 培養中に T 細胞への分化能力を維持させる作用をもつサイトカインを探索する目的で、培養後の T 細胞の再構築を指標として各種サイトカインのスクリーニングを行った。その結果、培養液中に LIF を添加した場合にのみ、*in vitro*での長期培養後も T 細胞への分化能力が高く維持されていることを見いだした。一旦分化能力を失った ProB 細胞に再度 LIF を作用させても T 細胞への分化能は回復しなかったことから、LIF は直接 T 細胞系列への分化を促進するというよりは、未分化細胞における T 細胞系列への分化能力を維持させる作用があるものと考えられた。LIF 添加培養によって ProB 細胞中で GATA 遺伝子の発現上昇がみられた。LIF 処理した ProB 細胞は *in vitro* 培養後 NK 細胞への分化が確認できたが、マクロファージへは分化しなかった。

E. 結論

Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞を *in vitro* で調整して多分化能を長期間維持する技術、多分化能を長期間維持させた同 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ、B細胞以外の造血・免疫系細胞へ分化させる技術、同 *in vivo* での分化制御解析を新規の分化制御遺伝子探索システムとして確立して利用する技術、さらに同システムで探索した様々な制御遺伝子を導入した Pax5 遺伝子欠損 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ胸腺内で特定な機能を保有する T 細胞への分化を調節できる技術をほぼ確立した。Pax5 欠損 ProB細胞に独自の各種遺伝子ライブラリーや本計画で探索した Erk5、Rac1 などの分子が造血・免疫系の各分化系での分化、コミットメントに直接関与して T 細胞の正負の選択に大きな役割を果たしていることが分かった。多分化能を長期間維持する LIF は直接 T 細胞系列への分化を促進するというよりは、GATA 遺伝子など重要因子の発現上昇により未分化細胞における T 細胞系列への分化能力を維持させる作用があるものと考えられた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表 別掲

H.知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

出願申請中

- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他
権利者 山口大学

「新規T細胞機能遺伝子探索技術の開発とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

申請準備中

- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他
権利者 山口大学

「サイトカインを利用した新規造血・免疫系幹細胞の分化技術と人工血液医療への応用」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成16年度分担研究報告

厚生労働科学研究研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業)
幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究 分担研究報告書

造血・免疫系幹細胞分化誘導技術の新規治療法開発への応用に関する研究

分担研究者 白井 睦訓 山口大学医学部医学科 生殖・発達・感染医科学講座 教授

共同研究者 小田浩代*、酒井幸平*、北村俊雄**、小安重夫***、
Meinrad Busslinger****、Jonathan Kaye*****、鈴木春巳*

*山口大学医学部医学科 生殖・発達・感染医科学講座

**東京大学医科学研究所 先端医療研究センター

***慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

****ウィーンバイオセンター 分子病理学研究所 (オーストリア、ウィーン)

*****スクリップス研究所 (米国、ラホヤ)

研究要旨

平成16年度はほぼ計画どおりの成果を得ており、B細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働く Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞 (造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞) を *in vitro* で調整して多分化能を長期間維持する技術 (特許出願準備中)、多分化能を長期間維持させた同 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ、B細胞以外の造血・免疫系細胞へ分化させる技術、同 *in vivo* での分化制御解析を新規の分化制御遺伝子探索システムとして確立して利用する技術 (特許出願)、さらに同システムで探索した様々な制御遺伝子を導入した Pax5 遺伝子欠損 ProB細胞をγ線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ胸腺内で特定な機能を保有する T細胞への分化を調節できる技術 (特許出願) をほぼ確立した。

Pax5 欠損 ProB細胞に独自の各種遺伝子ライブラリーや探索した分化制御遺伝子候補を導入・発現させ、*in vitro* 培養後したマクロファージ、NK細胞、T細胞など造血・免疫系の各分化系での解析により、分化、コミットメントに直接関与する分子の同定を試みたが、Erk5、Rac1 などの分子が T細胞の正負の選択に大きな役割を果たしていることが分かってきた。造血・免疫系の分化制御遺伝子候補5個程度については解析の成果をもとにノックアウトマウスなど遺伝子組み換えマウスの作製準備に入った。

次年度以降の研究でこれら重要分化関連遺伝子解析を推進して、幹細胞分化技術を利用した人工血液医療への応用を展開する計画である。

A. 研究目的

免疫担当細胞を含めて全ての血球は骨髄中の造血幹細胞から分化するが、この多系列分化能と自己複製能の維持機構はよくわかっていない。幹細胞が多系列への分化能 (未分化性) を保持しながら自己複製できるメカニズムの解明は、血液学、発生学の大きな課題であるだけでなく、最終的に人工血液の開発を目指す遺伝子操作幹細胞を利用する再生医療のための技術の開発においても非常に重要である。Pax5 は B細胞分化に

必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働くが、本計画の探索解析システムとして Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB細胞に、独自に作製した免疫細胞由来 cDNA ライブラリーや探索した多くの再生分化候補遺伝子を導入発現させることにより造血系細胞のコミットメントに関わる新規分子の探索、および造血幹細胞の未分化性を維持する機構を解明し、特殊培養法や遺伝子導入による造血・免疫系各細胞

系列への *in vitro* 再生分化技術、*in vivo* での造血・免疫系組織再構築技術を開発する。その技術をもとに造血幹細胞の安定培養供給技術やヒト T 細胞などの造血・免疫系細胞の分化誘導・制御技術とそれを利用した人工血液医療の開発に繋げる。

B. 研究方法

【細胞培養と *vivo* 移植後解析】

プロ B 細胞は、2 週齢の Pax5 ノックアウトマウスの骨髄から樹立し、2% FCS、0.03% primatone および IL-7 を含有した IMDM 培地中、ST2 ストローマ細胞上で培養した。1 千万個の transduced Pax5^{+/+} プロ B 細胞を、4Gy の放射線照射をした C57BL/6-CD45.1-RAG2^{+/+} マウス (Shinkai, Y. et al., 1992, Cell 68:855-867) の尾静脈から静脈中に注入した。3-4 週間後に、フローサイトメトリック分析 (flowcytometric analysis) を行なった。

【レトロウイルス ベクターの作製】

レトロウイルス ベクターの作製法は、以下の通りである。ドミナントネガティブ (N17) ヒト Rac1 cDNA は、pEGFP-C1 (CloneTech) ベクター中にクローニングした。pMX-puro-dnRac1GFP の作製には、EGFP-Rac1N17 キメラ cDNA を pMXs-puro の Not I サイト中に PCR によりクローニングした。pMXs-PREP レトロウイルスベクターの作製には、マーモット プレ配列の ClaI 断片とピューロマイシン耐性遺伝子 (puromycin resistance gene) の SalI 断片とを、それぞれ pMXs-IRES-GFP の ClaI および SalI サイトに挿入した。PCR によりクローニングした Rac1N17 cDNA を pMXs-PREP 中に挿入し、pMXs-PREP-dnRac1 を作製した。

【レトロウイルス ベクターによる遺伝子導入】

ベクター (pMX-puro-GFP) または Plat-E パッケージング細胞をトランスフェクトされた pMXs-puro-dnRac1GFP からのレトロウイルスを含む上清液を濃縮し、プロ B 細胞のインフェクションに用いた。VSV シュードタイプ ウイルス (VSV-pseudo-typed viruses) は、DPK 細胞の感染に用いた。レトロウイルスによる形質導入細胞 (Retrovirally transduced cells) は、1-2.5 μ g/ml ピュー

ロマイシン (puromycin) により選抜し、セルソーター FACS Vantage SE (Becton Dickinson) を用いる単一細胞クローニング (single cell cloning) は行わずに、GFP 強度の高い細胞 (GFP^{hi} cells) を電子的に分別した。

PCR で増幅したヒト Bcl-2 cDNA を、IRES-human CD2 カセットを有する pMX-based retroviral vector pMI.2 に挿入した。pMI.2-Bcl2 からのレトロウイルスを含む上清を、それぞれ Bcl2-DPK および dnRac1、Bcl2-DPK を確立するために、control-DPK (pMXs-PREP) と dnRac1-DPK (pMXs-PREP-dnRac1) をトランスデュースするために用いた。

細胞へのレトロウイルス感染、導入遺伝子高発現細胞の分取は、Pax5 遺伝子欠損プロ B 細胞 1×10^6 個と高力価レトロウイルス溶液 200 μ l を混合した溶液を 37°C、1 時間インキュベートし、3000R の放射線を照射した ST2 細胞をあらかじめまいておいた細胞培養ディッシュに加え、通常の条件で培養した。16-24 時間後にピューロマイシンを 2.5 μ g/ml となるよう加え、薬剤選択を行った。選択後の細胞 1×10^7 個に対して、FACS Vantage (Becton Dickinson) を使用して GFP を高発現する細胞のソーティングを行った。

【幹細胞分化因子 *in vivo* 探索、解析システムの構築】

本計画の探索、解析システムとして Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞に、独自に作製した免疫細胞由来 cDNA ライブラリーや探索した多くの再生分化候補遺伝子を導入発現させることにより造血系細胞のコミットメントに関わる新規分子の探索、および造血幹細胞の未分化性を維持する機構を解明し、特殊培養法や遺伝子導入による造血・免疫系各細胞系列への *in vitro* 再生分化技術、*in vivo* での造血・免疫系組織再構築技術を開発する。

【CD 4、CD 8 ダブルポジティブ DPK 分化試験】

DPK 分化試験 (DPK differentiation assay) は、既報に従って、6 ウェルプレート内の各ウェル内に 9×10^5 の放射線照射した DC-I (E^k and ICAM-1 transfected murine fibroblast) を入れ、培養時間の最後の 2 時間だけ 100ng/ml SEA (Toxin Technology, Sarasota, FL) の存在下、非存在下において 24 時間の前培養を行ない、さらに 4.5×10^5 個の DPK 細胞を加えて 37°C、3 日間の培養を行なった。培養終了後に細

胞を収集し、anti-CD4-PE (GK1.5) 抗体と anti-CD8 α -Biotin (53-6.7) 抗体で染色した後、フローサイトメトリー用にストレプトアビジン-トルルーレッド (Streptavidin-TruRed) で染色した。総ての抗体および染色液は、Pharmingen (Palo Alto, CA) 製である。

【フローサイトメトリー解析】

胸腺細胞のフローサイトメトリー解析を行なった。Pax5 遺伝子欠損プロ B 細胞を RAG2 遺伝子欠損マウスに尾静注して 3 週間後、再構築された胸腺を摘出し、CD45.1、CD45.2、CD4、CD8、TCR β 、CD69、CD2、CD5、LFA-1 の発現についてフローサイトメトリー解析を行った。96 穴丸底プレートに胸腺細胞を 1 ウェルにつき 1×10^6 個まき、プレートを 2,000 rpm、1 分、4°C で遠心した。上清をデカントで捨て、各蛍光色素またはビオチンでラベルした抗体 (CD45.1-FITC、CD45.2-FITC、CD4-PE、CD8-biotin、CD8-APC、TCR β -biotin、CD69-biotin、CD2-biotin、CD5-biotin、LFA-1-biotin) を 10 μ l 加え、遮光下 4°C で 20 分インキュベートした。インキュベート後、FACS メディウム (1xHBSS、BSA、アジ化ナトリウム) を加えてプレートを 2 回洗った。ストレプトアビジン-Red670 試薬を 15 μ l 加え、遮光して室温で 10 分インキュベートした。インキュベート後、プレートを 2 回洗い、得られたペレットを FACS メディウム 200 μ l で再懸濁し、42 μ m ナイロンメッシュフィルターを通して細胞の塊を除いてからフローサイトメトリー解析に用いた。再構築された胸腺細胞のフローサイトメトリー解析は GFP または FITC、PE、TruRed の三色同時解析が可能な FACS Calibur (Becton Dickenson)、あるいは GFP または FITC、PE、APC、TruRed の四色同時解析が可能なデュアルレーザー搭載 FACS にて行った。

C. 研究結果

Pax5 は B 細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働くが、この Pax5 遺伝子欠損マウス由来 Pro B 細胞は *in vitro* で長期間培養でき、 γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入すると骨髄中で自己複製し、B 細胞以外の全ての造血系細胞を長期間にわたって

供給でき、造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞と考えられ、「モデル造血幹細胞株」として利用できるよう確立した。

B 細胞分化に必須の転写因子で他系列への分化も抑制するリプレッサーとして働く Pax5 遺伝子欠損マウス由来 Pro B 細胞 (造血幹細胞の基準をほぼ完全に満たした株化培養細胞) を *in vitro* で調整して多分化能を長期間維持する技術 (特許出願準備中)、多分化能を長期間維持させた同 Pro B 細胞を γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ、B 細胞以外の造血・免疫系細胞へ分化させる技術、同 *in vivo* での分化制御解析を新規の分化制御遺伝子探索システムとして確立して利用する技術 (特許出願)、さらに同システムで探索した様々な制御遺伝子を導入した Pax5 遺伝子欠損 Pro B 細胞を γ 線照射 RAG2 欠損マウスに移入して骨髄中で自己複製させ胸腺内で特定な機能を保有する T 細胞への分化を調節できる技術 (特許出願) をほぼ確立した。特には、Pax5 欠損 Pro B 細胞に独自の各種遺伝子ライブラリーや探索した分化制御遺伝子候補を導入・発現させ、*in vitro* 培養したマクロファージ、NK 細胞、T 細胞など造血・免疫系の各分化系での解析により、分化、コミットメントに直接関与する分子の同定を試み、Erk5、Rac1 などの分子が T 細胞の胸腺内での分化段階における正負の選択に大きな役割を果たしていることが分かってきた (投稿中)。

Pax5 欠損プロ B 細胞を利用した新規 T 細胞機能遺伝子探索技術とそれを利用した新規 T 細胞分化技術の開発を目的として、新規に開発された試験系を用いて T 細胞分化における Rac1 の機能を解析した。Pax5 は、BLNK のような B-lineage 特異的遺伝子の発現を促進することにより、また同時に Notch-1 のような non-B-lymphoid genes の転写を抑制することにより、Pax5 は B 細胞系コミットメントのためのクリティカルな転写因子として機能する。Pax5 を欠損しているプロ B 細胞は B 細胞に分化する能力を欠失しているが、Pax5 欠損プロ B 細胞はコミットメントされないままであり、RAG^{-/-} マウスにトランスファーした時には、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、顆粒球、樹状細胞および赤血球 (erythrocyte) を含む多系統の造血系細胞を再構成することができる。Pax5^{-/-} プロ B 細胞のような幹細胞が、多分化能を失うことなく、長

期間にわたる *in vitro* 培養が可能であれば、これらの細胞は、T 細胞分化の分析用の新たに調製された血液幹細胞に優る大きな利点を有している。我々は、*Rac1* 変異遺伝子を *Pax5*^{-/-} プロ B 細胞に導入し、ピューロマイシンで選抜し、GFP (Green Fluorescent Protein) の発現が高い細胞をソートして、多数の試験用のストックとして凍結保存を行なった。レトロウイルスのインサクションによる特定の遺伝子の破壊に起因するアーティファクトを回避するため、個々の細胞クローンではなく、transduced cell lines を用いた。図 1 に示したように、CD45.2⁺ *Pax5*^{-/-} プロ B 由来の胸腺細胞が、インジェクション後 3-4 週間で、CD45.1⁺ RAG2^{-/-} 胸腺において完全に発生していた。

Pax5 は B 細胞発生 (B cell development) のためのマスター転写因子であり、*Pax5* 欠損マウス由来の培養プロ B 細胞は、致死量以下の放射線照射された RAG2^{-/-} マウス中にトランスファーすることにより、B 細胞以外の正常な造血細胞を再構成することが示されている。培養した *Pax5* 欠損プロ B 細胞を、宿主細胞と注入した細胞とを識別するためのバックグラウンドである CD45.1 を有する RAG2^{-/-} マウス中に導入した。図 1 a に示したように、CD45.2 陽性、CD45.1 陰性 *Pax5*^{-/-} プロ B 由来の胸腺細胞は、注入 4 週間後において正常に発生していた。再構成された胸腺細胞のトータル数は、3000 万から 1 億 5000 万個に変化しており、接種したプロ B 細胞の数と再構成期間に依存していた。しかしながら正常な胸腺細胞と比較して、プロ B 細胞由来の CD4 および CD8 シングルポジティブ (以下 SP と略記する) 細胞の僅かな増加が、一貫して観察された (図 1 a)。

T 細胞の発生における *Rac1* の機能を調べるために、*Pax5*^{-/-} プロ B 細胞中に変異 *Rac1* 遺伝子を導入した。ドミナント ネガティブ *Rac1* (N17) cDNA (以下 dominant negative を dn と略記) の N 末端に EGFP をコードしている配列を融合させて、pMXs-puro レトロウイルス ベクター中に導入した。*Pax5*^{-/-} プロ B 細胞中に dn*Rac1*-GFP ウイルスを形質導入した時には融合蛋白質が細胞膜中に局在していたのに対し、GFP (green fluorescent protein) ベクターを形質導入した細胞には拡散した均一な緑色蛍光が見られた (図 1 b の左側パネル)。形質導入されたプロ B 細胞のイ

ンジェクション後 3 から 4 週目のマウスから胸腺細胞を採取し、種々の細胞表面抗原で染色した。dn*Rac1*-GFP *Pax5*^{-/-} プロ B 細胞に由来する胸腺細胞の顕微鏡による観察では、細胞膜に局在化した GFP 蛍光が検出された (図 1 b 右下のパネル)。胸腺における GFP 陽性細胞のポピュレーションにいくらかの試験ごとの変化が存在していたが、恐らく、gene silencing effect によるものと考えられる。しかしながら、dn*Rac1*-GFP 発現胸腺細胞の CD4/CD8 プロファイルは、GFP ベクターだけを発現している胸腺細胞のプロファイルとは、全く異なっていた。dn*Rac1* を発現している胸腺細胞は、ほんの僅かの CD4-SP および CD8-SP 細胞しか含まれていなくて、胸腺細胞の発生は DP ステージ (DP stage) において厳密に抑制されていることを示している (図 2 a)。GFP の発現レベルとポジティブセレクションの抑制の厳しさとの間に相関があり、これは競争的ドミナントネガティブ 阻害剤に対して予期されるものと同じである (図 2 b)。興味あることに、CD4 CD8 DN (double negative) 細胞からの DP 細胞の発生が抑制されており、*Rac1* は絶対的に β セレクション (β -selection) を必要としているわけではないことが示された。DP-TCR^{hi} 細胞もまた、dn*Rac1* 発現胸腺細胞において顕著に減少しており (図 2 c)、正の選択プロセスの初期段階において、dn*Rac1* が正の選択をブロックしていることが示された。

次に、dn*Rac1* 発現胸腺の TCR メディエイトッド アポトーシス (TCR-mediated apoptosis) について調べてみた。ベクター コントロールおよび dn*Rac1*-GFP 形質導入 *Pax5*^{-/-} プロ B 細胞を RAG2^{-/-} マウスに注射し、再構成された胸腺細胞の TCR メディエイトッド アポトーシスを、インビトロで試験した。図 3 に示したように、刺激が存在しない条件下においても、dn*Rac1* 発現胸腺細胞は、アネキシン V 染色により決定されたアポトーシスの増加を示しており、また、DP 胸腺細胞の刺激依存性アポトーシスもまた、dn*Rac1* の存在下において増加した。

正の選択の間の TCR を介するシグナル伝達における、*Rac* の詳細な機能を分析するために、CD4-SP 分化のインビトロ モデル実験系を利用することに決定した。DPK は、AND-TCR トランスジェニック マウス由来の自然発生 DP 胸腺リンパ種細胞である。この

セルラインは、インビトロでの抗原負荷 APC と一緒に培養すると、CD4-SP 細胞に分化することが示されている。また、未成熟胸腺の正の選択の間のシグナル伝達の研究にも用いられている。ドミナント ネガティブ (N17) Rac1 遺伝子を、新たに確立された pMXs-PREP レトロウイルス ベクター中に PCR クローニングにより導入した。この pMXs-PREP レトロウイルスベクターには、IRES-GFP カセット および mRNA 安定化エレメント (wPRE) 配列が、効率的な遺伝子発現のために導入されている。pMX-PREP-dnRac1 を導入した DPK は細胞のサイズがいくらか増加したが、CD4、CD8 および TCR の発現レベルは、コントロールのベクター (pMXs-PREP) を感染させた細胞 (図 4 a) とは区別が可能であった。図 4 b に示したように、コントロールのベクターで形質導入された DPK 細胞は、徐々に CD8 発現が減少し、抗原刺激後 3 日目には細胞のほとんど 80% が CD4-SP 細胞に分化した。対照的に、dnRac1-DPK (図 4 b) において、CD4-SP 細胞は、ほとんど完全になくなった。同時に、TCR 刺激 (TCR stimulation) における Annexin V 陽性のアポトーシス細胞の数は、対照例の DPK 細胞 (図 4 c) に比較して、dnRac1-DPK においてドラマチックに増加した。細胞の生存率を決定するためのトリパンブルー排除法 (trypan blue dye exclusion method) によっても、同様の結果が得られた (データ省略)。以上の結果を総合すると、DP 胸腺における dnRac1 の発現は、インビボとインビトロの両方の試験系において、ポジティブセレクションの抑制と TCR 誘導アポトーシスの増加に導くことが、明確に示された。

正の選択の間の TCR 依存性 シグナル トランスダクションにおける Rac1 の機能を調べるため、anti-CD3 ϵ モノクローナル抗体をコートしたビーズにより DPK 細胞を刺激し、ERK の活性化を ERK1 および 2 のリン酸化により評価した (図 5 a)。dnRac1 変異体は ERK 活性化に何の効果もなく、ERK の TCR 刺激による活性化は、Rac1 とは独立したものであった。また、dnRac1-DPK 細胞 における TCR-mediated による CD69 および CD5 のアップレギュレーションもまた、コントロールの DPK 細胞 (図 5 b) において見られたものと区別がつかなかった。

次に、dnRac1-DPK における TCR 依存性のアクチン重合 (actin polymerization) を試験したが、これは Rac が細胞骨格再構成 (cytoskeletal reorganization) においてクリティカルな役割を果たしていることが広く知られているからである。TCR 刺激の 15 分後に、パロイディン (phalloidin) 染色により、コントロール DPK 細胞はアクチン重合の集積を示したのに対し、dnRac1-DPK (図 5 c) においては TCR 依存性のアクチン重合はなくなった (図 5 c)。パロイディン染色により検出されたように、コントロールの DPK 細胞は、胸腺細胞発生の間におけるアクチン再構成 (actin reorganization) の要求性は、直接的には決定できなかった。そこで、DPK 細胞の分化におけるアクチン重合のインヒビターの効果を調べてみた。アクチン重合のインヒビターである Latrunculin A は、DPK インビトロ分化システムにおいて、抗原により誘導された CD4-SP 細胞の発生を完全にブロックした (図 5 b)。これらの結果は、dnRac1-DPK 細胞においては、アクチン重合における欠陥が、少なくとも正の選択の阻害メカニズムの一部であることを示している。

次に、dn(優性不能型)ERK5 発現レトロウイルス導入 Pax5 遺伝子欠損プロ B 細胞を利用した新規の T 細胞再構築実験系を確立するため、Pax5 欠損プロ B 細胞株に T 細胞分化制御する候補遺伝子である ERK5 の優性不能型をレトロウイルスベクターを利用して導入後、RAG2 欠失マウスに注入して胸腺での CD4 陽性 T 細胞への分化を解析して、ERK5 の T 細胞分化における機能解析を行った。優性不能型 ERK5 遺伝子を過剰発現した胸腺においては成熟 CD4 T 細胞および選択後の DP 細胞が対照に比べて増加していた。dnERK5 発現ダブルポジティブ細胞では分化の進んだ細胞が多く存在これらの結果から、ERK5 が胸腺において負の選択のシグナル伝達に関与していることが示唆された。(図 6)

D. 考察

RAG2 欠損マウスは、免疫担当細胞の T 細胞、B 細胞の分化機能が欠失しており、Pax5 欠損マウス由来プロ B 細胞 (造血幹細胞に似た性質を持つ培養細胞であり、RAG2 遺伝子欠失マウスに移入することにより、B 細胞以外のすべての造血系細胞へ分化する能力を

持つ：Rolink, A.G. et al., 1999, Nature 401:603-606)に種々の機能未知遺伝子を導入発現した細胞を RAG2 欠損マウスに注入して、新規の T 細胞再構築試験系を確立した。この試験系を利用して、新規 T 細胞分化遺伝子の探索が可能となり、Rac1 や ERK5 などの制御因子の幹細胞からの T 細胞分化における機能の解明を行ない、幹細胞の分化を操作して免疫治療への利用が可能となった。

Pax5 欠損プロ B 細胞への遺伝子導入を利用した新規免疫細胞制御・分化因子遺伝子探索法を用いて、Rac1 遺伝子が T 細胞の胸腺での CD4/CD8 ダブル ポジティブ細胞から、CD4 または CD8 ポジティブ細胞 8] (特に CD4) へのポジティブ セレクションに必要であることを解明した。今後、免疫機能不全や自己免疫疾患の治療薬標的遺伝子の探索技術として有用な方法となり、今回みつかった遺伝子も、免疫機能不全の治療薬標的となり得る。

Rac1 は正の選択に必要であるが、 β -セレクションには必要ではないことが示された。インビトロの正の選択モデル系を用いて、Rac1 は TCR メディエイテッド アクチン 細胞骨格再構成および抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の誘導において重要であることが示された。Bcl-2 インダクションの Rac1 依存性経路は、TCR を介するアポトーシスを妨げることにより、正の選択にクリティカルなプロセスであり得る。

ERK5 は、転写因子である MEF2C および MEF2D をリン酸化するが、MEF2D は神経および血管系のみならず胸腺細胞にも発現しており、T 細胞の負の選択において中心的な役割果たす Nur77 の発現を調節している。従って、ERK5 は、未熟 T 細胞の選択過程において重要な働きをしている可能性が考えられる。負の選択は、自己反応性の T 細胞を排除する重要なプロセスであり、自己免疫性の疾患の発症機序にも関与している可能性が考えられる。本発明においては、T 細胞の分化過程、特に負の選択に着目して、ERK5 の機能の検討を行なった。優勢不能型 ERK5 遺伝子を過剰発現した胸腺においては、成熟 CD4 T 細胞および選択後の CD4/CD8 ダブル陽性細胞が増加していた。ERK5 は、ERK、JNK、p38 に続く第 4 の MAP キナーゼカスケードの一員であり、右心室の形成、血管形成や血管平滑筋の分化に重

要であることが知られている。これらの結果から、ERK5 が胸腺において負の選択のシグナル伝達に参与していることが示唆された。

今後、平成 16 年度に開発した『多分化能を長期間維持できる"モデル造血幹細胞株" Pax5 遺伝子欠損 Pro B 細胞への各種遺伝子導入後 γ 線照射 RAG2 欠損マウスへの移入による分化制御遺伝子探索システムとその新規免疫・幹細胞療法への応用技術』をより精度の高い技術として確立する。また、既に同システムで探索した様々な造血・免疫系の分化制御遺伝子候補 5 個程度については解析の成果をもとにノックアウトマウスなど遺伝子組み換えマウスの作製中で、これら動物での分化の解析を推進する。また、成果として探索した種々の技術をもとに、造血幹細胞の多分化能を回復、維持させる機能を持つ遺伝子の探索、造血・免疫系多分化能制御因子の *in vivo* 解析、生体内造血・免疫系多分化能維持技術と造血・免疫系組織再構築技術の開発、*in vivo* での造血・免疫系組織再構築技術の開発を行い、さらにヒト造血・免疫系細胞の分化技術へ応用できる技術にまで開発して人工血液医療への利用の道を開く。

E. 結論

本発見により、Pax5 欠損プロ B 細胞への遺伝子導入を利用した新規免疫細胞制御・分化因子遺伝子探索法が開発できた。また、それを利用した Rac1 および ERK5 などの造血・免疫系幹細胞の分化制御因子の機能が解明され、新規遺伝子機能を利用した幹細胞からの免疫系細胞分化機構の調節による免疫幹細胞療法や人工血液医療への応用が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

- Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, Ichikawa H, Fujimoto M, Nakai A

Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1.

J Biol Chem.

2004 Sep 10;279(37):38701-9.

• Suzuki H, Oda H, Sakai K, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Busslinger M, Shirai M.

Rac1 mediated actin polymerization and Bcl-2 induction are critical in positive selection of thymocytes (投稿中)

参考関係業績

• M Ishihara, S Kojima, T Sakamoto, Y Asada, Chuwa Tei, K Kimura, S Miyazaki, M Sonoda, K Tsuchihara, M Yamagishi, Y Ikeda, M Shirai, H Hirakawa, Tinoue, FSaito, H Ogawa
Clinical implication of acute hyperglycemia as an independent predictor for mortality after acute myocardial infarction in the coronary intervention era
Journal of American College Circulation Society in press

• Kojima S, Sakamoto T, Ishihara M, Kimura K, Miyazaki S, Tei C, Hiraoka H, Sonoda M, Tsuchihashi K, Yamagishi M, Inoue T, Asada Y, Ikeda Y, Shirai M, Ogawa H
The white blood cell count is an independent predictor of no-reflow and mortality following acute myocardial infarction in the coronary interventional era.
Ann Med. 2004;36(2):153-60.

• Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H.pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.
Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, Okubo M, Zaito Y, Ariyoshi K, Nakamura Y, Nawata R, Oka Y, Shirai M, Tanizawa Y.
Br J Haematol.
2004 Jan; 124(1): 91-6.

• Fukuoka K, Sawabe A, Sugimoto T, Koga M, Okuda H, Kitayama T, Shirai M, Komai K, Komemushi S,

Matsuda K.

Inhibitory actions of several natural products on proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by Hsp60 from *Chlamydia pneumoniae* J138.

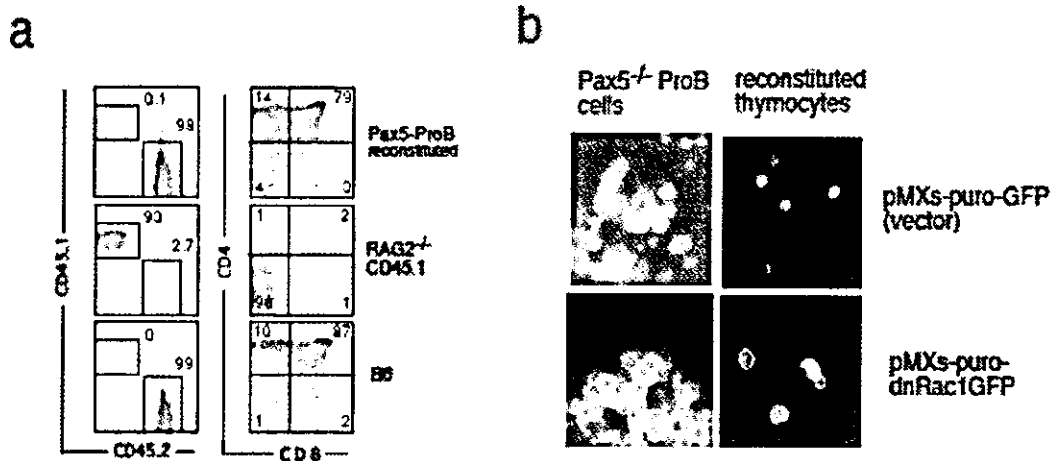
J Agric Food Chem.
2004 Oct 6;52(20):6326-9.

1. 学会発表
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会
2004.12.1-3 (札幌)
学術集会記録 第 34 巻
• 鈴木春巳、小田浩代、酒井幸平、白井睦訓
「LIF は Pax5 プロ B 細胞の T 細胞系列への分化能を制御する」 P67
• 小田浩代、酒井幸平、白井睦訓、鈴木春巳
「FoxP3 遺伝子の強制発現による T 細胞シグナル伝達の制御」 P144
• 酒井幸平、鈴木春巳、小田浩代、白井睦訓
「クラミジアの感染排除における一酸化窒素合成を介した PI3 キナーゼの役割」 P291

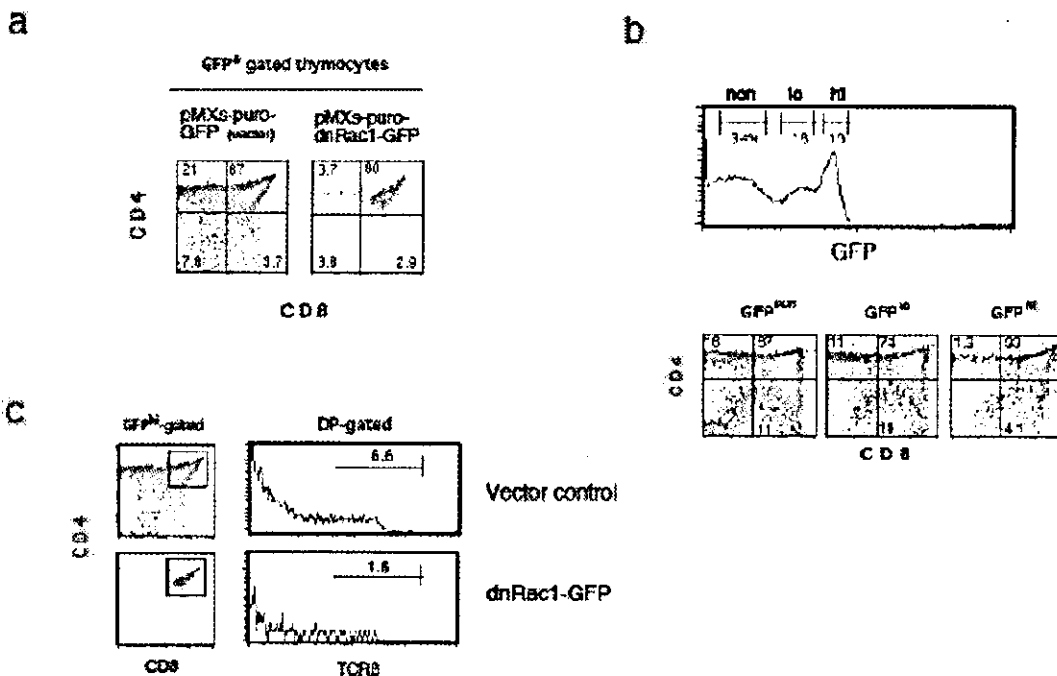
第 27 回日本分子生物学会年会
2004.12.8-11 (神戸市)
プログラム・講演要旨集
• 井上幸江、藤本充章、高木栄一、鈴木春巳、白井睦訓、横田義史、市川仁、中井彰
「熱ショック応答と免疫応答のクロストーク」 p29

H. 知的財産権の出願・登録情報
【特許の取得】
出願申請中
• 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他
権利者 山口大学
「新規 T 細胞機能遺伝子探索技術の開発とそれを利用した新規 T 細胞分化遺伝子」

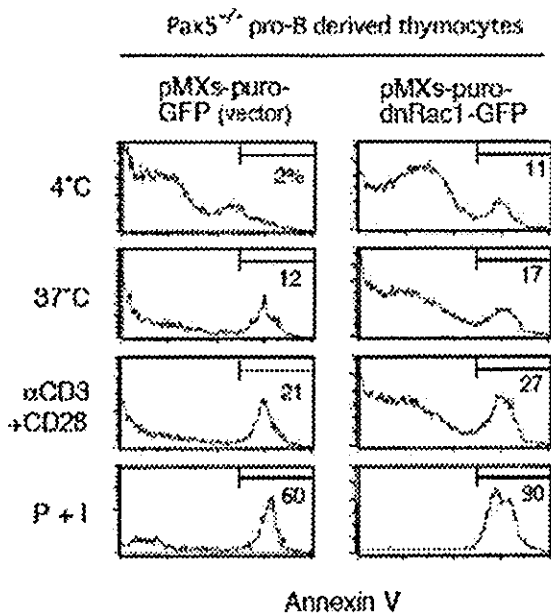
出願申請準備中
• 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他
権利者 山口大学
「サイトカインを利用した新規造血・免疫系幹細胞の分化技術と人工血液医療への応用」



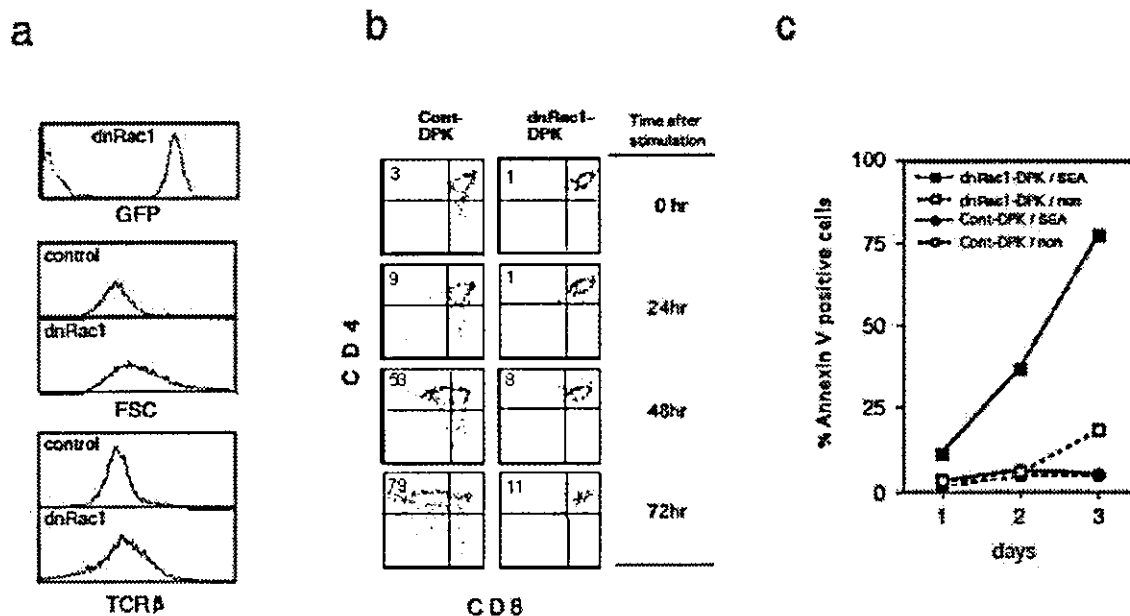
【図1】 図1は、Pax5 欠損プロB細胞前駆体による、T細胞分化の再構成に係わる図である。
 (a) Pax5^{-/-} マウス (CD45.2)由来のプロB細胞を IL-7 存在下に培養した後、致死量以下の放射線を照射した CD45.1、RAG2^{+/+}マウスにトランスファーした。インジェクションしてから4週間後に、胸腺細胞を4-color FACSにより分析した。CD45.1⁺、CD45.2⁻ (中央の図)または CD45.1、CD45.2⁺ (上 および下の図)のゲートに入った細胞が示されている (右のパネル)。
 (b) ベクター(pMXs-puro-GFP)または pMXs-puro-dnRac1 を形質挿入した Pax5^{-/-} プロB細胞(左のパネル)の顕微鏡分析結果および結果として得られたプロB細胞由来の胸腺細胞 (右のパネル) を示す図である。



【図2】 dn-Rac1 を発現している胸腺細胞において、正の選択が損なわれていることを示す図である。
 (a) ベクターまたは dnRac1 形質導入 Pax5^{-/-}プロB細胞由来胸腺細胞の CD4 と CD8 を染色した。GFP 陽性 gated 細胞の CD4/CD8 プロファイルが示されている。これらのプロファイルは、3回の独立した試験の代表例である。
 (b) dnRac1 プロB細胞で再構成されたマウスの胸腺細胞を、GFP ネガティブ、GFP 低発現、GFP 高発現ポピュレーションに区分し、それぞれのグループの CD4/CD8 プロファイルを示した。
 (c) GFP ポジティブで DP のゲートに入った細胞の TCR 発現 (左のパネル) を示した (右のパネル)。

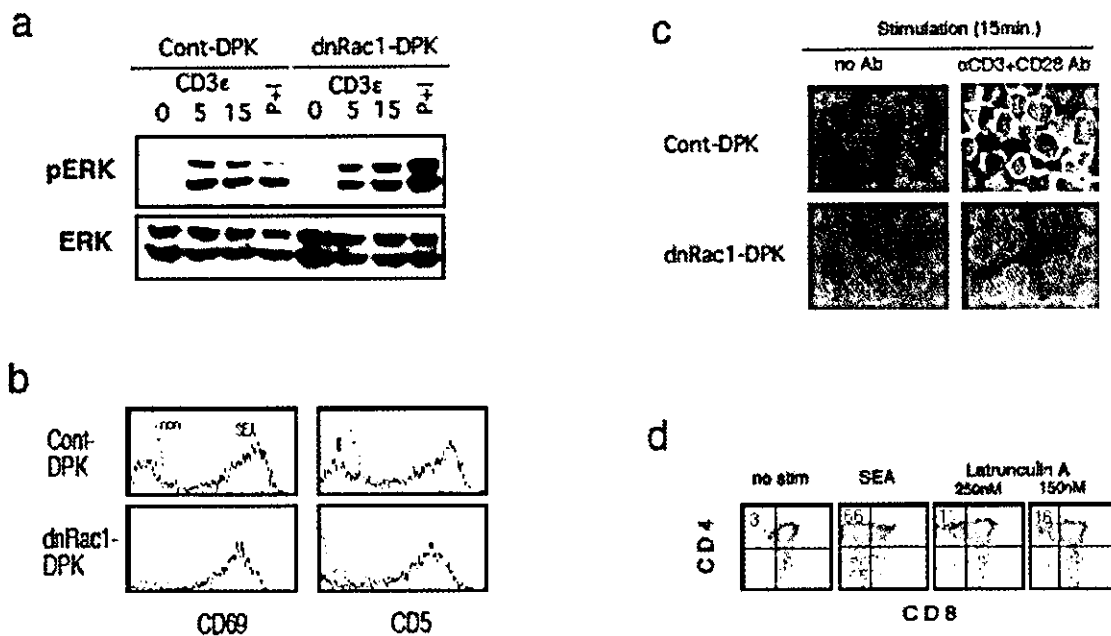


【図3】 dn-Rac1 の存在下において、TCR 誘発アポトーシスが增加することを示す図である。dnRac1-GFP で形質導入された Pax5^{+/+}プロB細胞由来胸腺細胞およびコントロールのベクターで形質導入された Pax5^{+/+}プロB細胞由来胸腺細胞は、プレートにコートされた種々の抗体または 10ng/ml PMA と 1μg/ml A23187 により、それぞれ6時間の間、活性化された。図3には、GFP 陽性で CD4、CD8 ダブル ポジティブな細胞のアネキシン V (Annexin V) 染色プロファイルが示されている。



【図4】 ドミナント ネガティブ Rac1 (Dominant negative Rac1) が CD4-SP の分化をブロックし、DPK 細胞のアポトーシスを増加させることを示す図である。

- (a) dnRac1 形質導入 DPK 細胞の GFP、FSC および TCRβ の発現を示す図である。
- (b) ベクター (pMXs-PREP) と pMXs-PREP-dnRac1 形質導入 DPK 細胞を、DC-I および 100ng/ml SEA と いっしょに共培養した。指定した培養時間ごとに細胞を回収し、フローサイトメトリーにより分析した。図4のbには GFP 陽性細胞のフェノタイプが示されている。
- (c) dnRac1 の存在下において、TCR 活性化がアポトーシスを誘起することを示す図である。GFP ポジティブ dnRac1 またはコントロールのベクターにより形質導入した DPK 細胞を、指定の培養時間ごとに回収して Annexin V で染色し、Annexin V で染色された細胞の比率を、それぞれのグループごとにグラフ上にプロットした。



【図5】 dnRac1 (dominant negative Rac1) は TCR 依存性の初期 MAPK 活性化 (TCR-dependent early MAPK activation) を阻害しないが、TCR メディエーテッド アクチン重合 (TCR-mediated actin polymerization) は阻害することを示す図である。

- (a) anti-CD3 ϵ 抗体により、DPK 細胞は活性化されることを示す図である。指定時間 (分) 後に、細胞上清 (cell lysates) を調製し、anti-phospho-ERK または anti-ERK 抗体を用いて、ウェスタン プロットにより分析した。
- (b) 16 時間培養後の dnRac1-DPK 細胞上の CD5 および CD69 の発現量の分析を、FACS により行なった。APC 存在下で 16 時間培養後の細胞数を、SEA 非存在下の結果を点線で、SEA 存在下の結果を実線で示してある。
- (c) TCR メディエーテッド アクチン重合は、dnRac1 により阻害されることを示す図である。dnRac1 コントロールのベクターまたは dnRac1 により形質導入した DPK 細胞を、anti-CD3 および CD28 モノクローナル抗体を塗布したカバースリップ上で 15 分間培養後、固定化と permeabilized した後、重合したアクチン繊維を検出するため、Alexa594 コンジュゲイテッド ファロイジンで染色した。
- (d) CD4-SP 細胞の発生 (Generation) がアクチン重合に必要なことを示す図である。アクチン重合のインヒビターである Latruncullin A を、図 5 d に示した量の存在下に、DC-I および SEA と一緒に、DPK 細胞を 3 日間、共培養した。

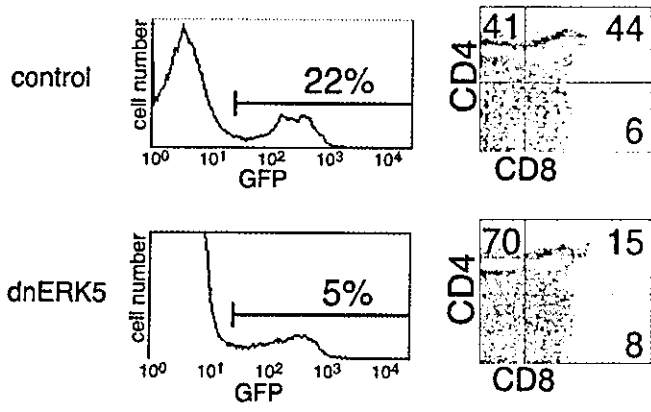


図4.dnERK5発現胸腺細胞のフローサイトメトリー解析

【図6】 CD 4 陽性 T リンパ球の分化機能を幹細胞の遺伝子操作により改変