

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

2005 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18（2006）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17年度総括研究報告	5
II.	平成17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	31
	鈴木春巳	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	44
VI.	研究成果の刊行物・別冊	47

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17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

Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞は多分化能を保持した造血幹細胞株として特定の遺伝子導入により分化制御遺伝子探索に利用可能であった(特許出願)。Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞は長期 *in vitro* 培養後多分化能、T 細胞分化能を失うが、培養液中 LIF 添加時のみ長期培養後に T 細胞分化能が高く維持された。この効果は LIF による ProB 細胞での GATA3 遺伝子発現上昇に依存する。LIF 処理した ProB 細胞は *in vitro* 培養後 NK 細胞にも分化できるが、マクロファージへは分化しなかった。Pax5 欠損 ProB 細胞に各種遺伝子ライブラリーや探索分化制御遺伝子候補を導入・発現させ解析して、Erk5、Rac1、RhoH などの T 細胞の正負選択への関与を見つけた。これら遺伝子導入 Pax5 欠損 ProB 細胞を、RAG2 欠損マウスに移植、解析し、*in vivo* 造血・免疫系多分化能維持と組織再構築技術を開発した。解析成果をもとに遺伝子改変マウス；RhoH コンディショナルノックアウトマウス、RhoH トランスジェニック (Tg) マウス、ドミナント・ネガティブ Rac1 Tg マウス作製に着手し、うち後者 2 種で Rac1, RhoH の T 細胞分化への関与が解明でき、さらに解析中である。本成果は今後、生体由来の造血幹細胞を希望の系列の血球へと優先的に分化させて患者に供給する医療の実現を可能にするものである。

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

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（特許出願済）。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を作製して、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を開発し、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、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できる（特許出願済）。

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

これまでに、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（投稿後 RIVISE 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。

すなわち、解析成果をもとに造血・免疫系分化制御候補遺伝子改変マウス; RhoHコンディショナルノックアウトマウス、RhoHトランスジェニック (Tg) マウス、ドミナント・ネガティブ型Rac1 Tgマウス作製に着手し、うち後者 2 種について完成し、Rac1,RhoHのT細胞分化への関与が解明でき、さらに解析中である。

本成果は今後、生体から容易に得られる造血幹細胞を希望の系列の血球へと優先的に分化させて患者に供給する医療の実現を可能にするものであり、膨大な社会的効果を生み出す可能性を秘めている。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。

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。

DNA マイクロアレイ解析により Pax5 遺伝

子欠損マウス由来 ProB 細胞の LIF で処理、未処理で 3 万遺伝子の発現変化を解析した。数十の転写制御因子や分化制御因子の発現変化が見つかったが、これら因子が実際に幹細胞の多分化能の維持機構にどのように関与しているかを解析中である。LIF で処理、未処理で Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞とその培養に用いるフィーダー細胞である ST 2 細胞の LIF のレセプターの発現も解析したが、両細胞でその発現は上昇しており、両細胞で LIF で処理後に発現変化した因子が相互にどのように関与しているかを解明中である。

この LIF の Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞への未分化性維持の作用は通常マウスの骨髄幹細胞を用いても検証できたことから、この特殊な未分化性維持の作用は特殊な細胞の場合だけではなく普遍的に骨髄幹細胞でも応用可能な作用であると考えられ、ヒト骨髄幹細胞への応用が可能であると判断された。

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(これらの一部の発明については特許出願済み)。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。

この LIF の Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞への未分化性維持の作用は通常マウスの骨髄幹細胞を用いても検証できたことから、ヒト骨髄幹細胞への応用が可能であると判断された。

LIF で処理した Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞の DNA マイクロアレイ解析で関与する転写制御因子や分化制御因子の絞り込みを行った。また LIF で処理した Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞とその培養に用いるフィーダー細胞である ST2 細胞では LIF レセプターの発現は上昇しており、さらにその作用効果を検証している。遺伝子改変マウスを作製して、T 細胞 Lineage 分化制御での Rac1, RhoH などの関与が解明できつつある。

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. 特許出願

発明者 白井睦訓、鈴木春巳

権利者 山口大学

「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と、それを利用した Rac1 および ERK5 の機能解明と免疫治療への利用」

出願番号：特願 2005-001953

出願：2005 年 1 月 06 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成17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¹、酒井幸平¹、北村俊雄²、小安重夫³、Meinrad Busslinger⁴、
Jonathan Kaye⁵、相澤慎一⁶、鈴木春巳¹

1. 山口大学医学部医学科 生殖・発達・感染医科学講座
2. 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
3. 慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室
4. ウィーンバイオセンター 分子病理学研究所
5. スクリップス研究所 (米国、ラホヤ)
6. 理化学研究所

研究要旨

Pax5遺伝子欠損マウス由来**ProB**細胞は多分化能を保持した造血幹細胞株として特定の遺伝子導入により分化制御遺伝子探索に利用可能であった(特許出願)。**Pax5**遺伝子欠損マウス由来**ProB**細胞は長期*in vitro*培養後多分化能、T細胞分化能を失うが、培養液中LIF添加時のみ長期培養後にT細胞分化能が高く維持された。この効果はLIFによる**ProB**細胞での**GATA3**遺伝子発現上昇に依存する。LIF処理した**ProB**細胞は*in vitro*培養後NK細胞にも分化できるが、マクロファージへは分化しなかった。**Pax5**欠損**ProB**細胞に各種遺伝子ライブラリーや探索分化制御遺伝子候補を導入・発現させ、*in vitro*培養後造血・免疫系の分化制御を解析して、**Erk5**、**Rac1**、**RhoH**などのT細胞の正負の選択などへの関与を見つけた。これら遺伝子導入**Pax5**欠損**ProB**細胞を、**RAG2**欠損マウスに移植、解析し、*in vivo*造血・免疫系多分化能維持と組織再構築技術を開発した。解析成果をもとに造血・免疫系分化制御候補遺伝子改変マウス；**RhoH**コンディショナルノックアウトマウス、**RhoH**トランスジェニック (**Tg**) マウス、ドミナント・ネガティブ**Rac1 Tg**マウス作製に着手し、うち後者2種について完成し、**Rac1**、**RhoH**のT細胞分化への関与が解明でき、さらに解析中である

本成果は今後、生体から容易に得られる造血幹細胞を希望の系列の血球へと優先的に分化させて患者に供給する医療の実現を可能にするものであり、膨大な社会的効果を生み出す可能性を秘めている。

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。pMXs-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、1-2.5µg/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 200µl 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、通常の方法で培養した。16-24 時間後にピューロマイシンを 2.5µg/ml となるよう加え、薬剤選択を行った。選

扱後の細胞 1×10^7 個に対して、FACS Vantage(Becton Dickenson)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。

【CD4、CD8 ダブルポジティブ細胞
DPK 分化試験】

DPK 分化試験 (DPK differentiation assay) は、既報に従って、6 ウェルプレートの各ウェル内に 9×10^5 の放射線照射した DC-1 (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-トウルールレッド (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に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。

【遺伝子改変マウスの作製】

理研との共同研究で常法にしたがって下

記の研究結果に記述した各種遺伝子改変マウスの作製した。方法の詳細は正書等に記載が多く有るので省略する。

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 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、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 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）、さらで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（投稿後 RIVISE 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ー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 dnRac1-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 1b 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。dnRac1-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、dnRac1-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。dnRac1 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 dnRac1-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、dnRac1 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、ファロイジン (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 abrogated 廃止 破棄であった(図 5 c)。ファロイジ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、during 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参与していることが示唆された。(図 6)

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 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計画を進めており、理研神戸研究所相澤研究室との共同研究として造血・免疫系分化制御候補遺伝子改変マウス；RhoH コンディショナルノックアウトマウス、RhoH トランスジェニック (Tg) マウス、ドミナント・ネガティブ型 Rac1 Tg マウス作製に着手し、うち後者 2 種について完成し、Rac1, RhoH の T 細胞分化への関与を解析中である。

すなわち、免疫系のなかでも T 細胞は感染体の特異的排除やワクチンの効果を得る上で最も重要な要素であるが、胸腺特異的な発現因子の中に幹細胞の自己複製や T 細胞への分化を制御する因子が存在するとの作業仮説に基づいて、胸腺特異的発現遺伝子データベースを情報解析技術により処理して、85,047 個の unigene クラスターから胸腺特異的発現遺伝子 21 個を絞り込んだ (図 7)。その中で発現量や特異性から最も有望と考えられたのが RhoH (ISC-1) で、Rho ファミリーに属する低分子 G タンパクで Rac の活性化を抑制することが知られている。RhoH は胸腺細胞のなかで CD4⁺CD8⁺細胞 (DP) や CD4⁺ (CD4-SP) に高度に発現しているが、分化した末梢血中の脾臓 CD4⁺ (CD4-SP) では発現は著しく低下していた (図 8)。

この RhoH を前述の Pax5 欠損プロ B 細胞に導入して“再構築”胸腺細胞において RhoH を過剰発現させると胸腺のなかで CD4⁺ (CD4-SP) の割合は有意に低下していた (図 9)。さらに、前述の DPK 細胞 (CD4 CD8 ダブルポジティブの株化細胞で、刺激により CD4⁺T 細胞に分化する) に siRNA 発現ベクターを用いて RhoH をノックダウンすると対照に比して刺激開始から day2, day3 と CD4⁺ (CD4-SP) への分化が促進された結果 CD4⁺の割合が顕著に増加した (図 10)。RhoH トランスジェニックマウス (hCD2-LCR) の胸腺でも胸腺

内で CD4⁺ (CD4-SP) に有意に低下していた (図 1 1)

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 (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、今回見つかった遺伝子も、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関与していることが示唆された。

胸腺特異的発現遺伝子データベースから情報解析的に探索した T 細胞分化に深く関与する可能性がある RhoH について解析を加えた。RhoH は胸腺細胞、T 細胞および骨髄細胞に特異的に発現しており、特に DP 細胞に高い発現が見られた。RhoH を強制発現させると、胸腺内での正の選択が抑制された。特に CD4-SP の分化がより強く抑えられていた。胸腺内での β -セレクションには影響がなかった。末梢の CD4-SP T 細胞の数も減少した。RhoH

は T 細胞、特に CD 4 の正の選択を抑制して分化を制御して、DP 段階で TCR シグナルを抑え、レパトア選択の際の閾値の設定に重要と推察された。RhoH をノックダウンすると CD4-SP への分化が促進された。

今後、『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 ProB 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・免疫系の分化制御候補遺伝子改変マウス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。

本成果は今後、生体から容易に得られる造血幹細胞を希望の系列の血球へと優先的に分化させて患者に供給する医療の実現を可能にするものであり、膨大な社会的効果を生み出す可能性を秘めている。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。

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、ERK5 および RhoH 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

特にない

G. 研究発表

1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

・ Suzuki H, Oda H, Sakai K, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M. Rac1-mediated actin polymerization and Bcl-2 induction are critical for differentiation of CD4 single-positive T cells. **Journal of Leukocyte Biology** 投稿後 REVISE 中

・ Sakai K, Suzuki H, Oda H, Akaike T, Azuma Y, Murakami T, Sugi K, Ito T, Ichinose H, Koyasu S, Shirai M. Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthesis in macrophage critical dimerization of inducible nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** 投稿後 REVISE 中

・ 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, 10;279:38701-9.

参考関係業績

・ Shirai M 他 15 名最終著者

Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydomphila felis*.

DNA Research 2006 in press

・ Shirai M 他 8 名最終著者

Serotonin and melatonin, neurohormones for homeostasis, as novel inhibitors of

infections by the intracellular parasite chlamydia.

J. Antimicrob. Chemother. 2005;56:861-8.

・Shirai M, 他 16 名 13 番目

Clinical implication of acute hyperglycemia as an independent predictor for mortality after acute myocardial infarction in the coronary intervention era

Am Heart J. 2005 ;150:814-20.

・Shirai M, 他 16 名 13 番目

Beneficial effect of preinfarction angina on in-hospital outcome is preserved in elderly patients undergoing coronary intervention for anterior acute myocardial infarction.

Circulation Journal. 2005 ;69:630-5.

・Shirai M, 他 17 名 14 番目

Effects of glucose abnormalities on in-hospital outcome after coronary intervention for acute myocardial infarction.

Circulation Journal. 2005 ;69:375-9.

・Shirai M, 他 14 名 14 番目

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.

・Shirai M, 他 13 名 13 番目

Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.

Br J Haematol. 2004 Jan; 124(1): 91-6.

・Shirai M, 他 9 名 7 番目

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 ;52:6326-9.

1. 学会発表

第 35 回日本免疫学会総会 2005.12 横浜

・鈴木春巳、小田浩代、酒井幸平、北原誠司、白井睦訓

胸腺細胞の分化における RhoH の機能

・小田浩代、鈴木春巳、酒井幸平、北原誠司、白井睦訓

LIF は Pax5 欠損プロ B 細胞および造血幹細胞の T 細胞への分化能を ex vivo で維持することができる

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】

1. 特許出願

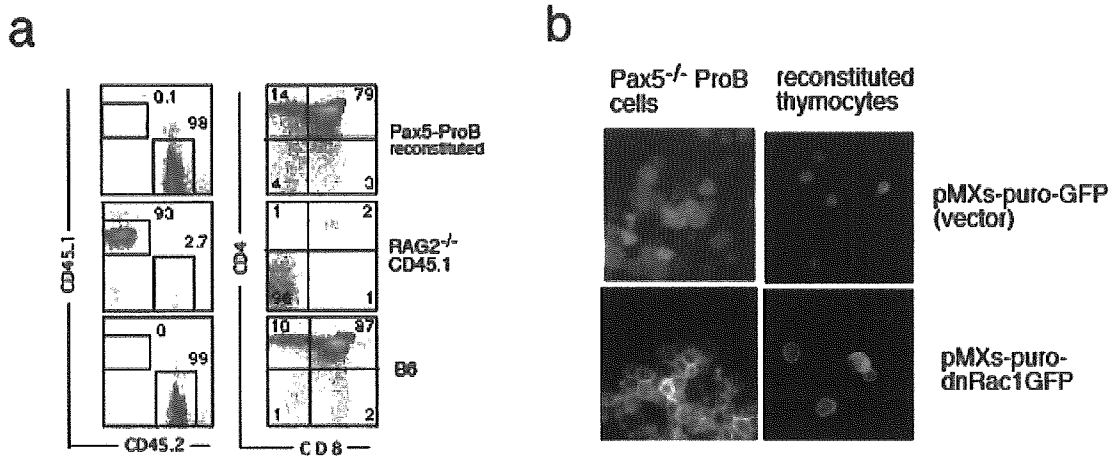
発明者 白井睦訓、鈴木春巳

権利者 山口大学

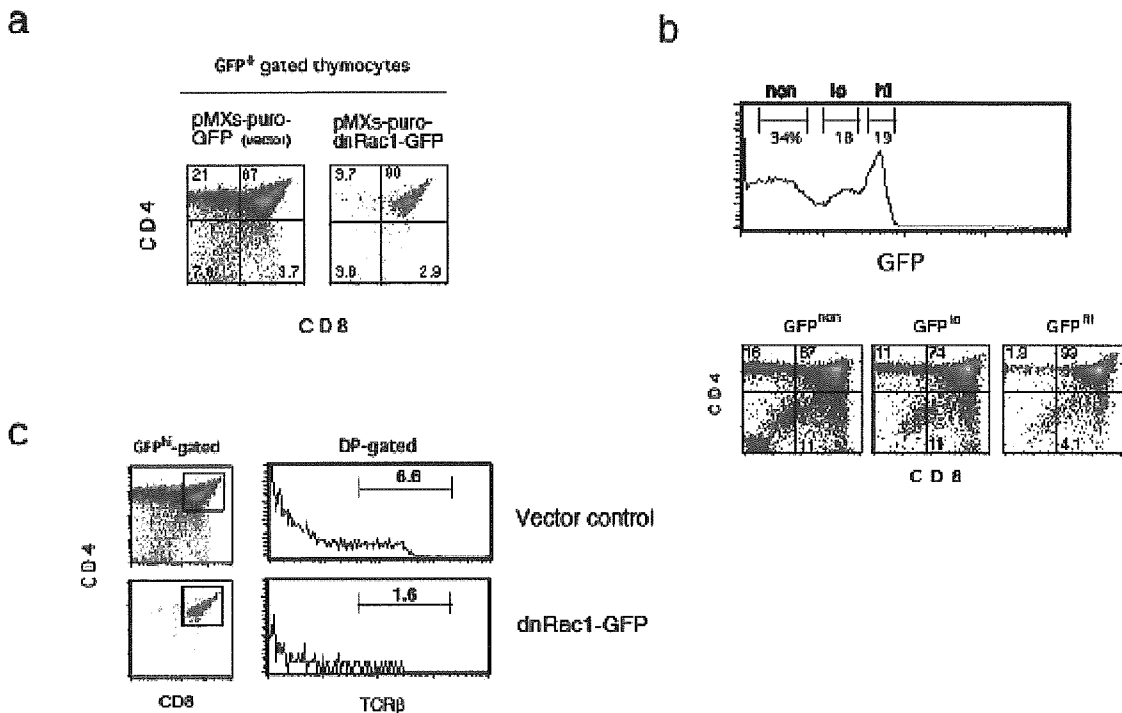
「Pax5 欠損プロ B 細胞への遺伝子導入
を利用した新規免疫細胞制御・分化因子
遺伝子探索法と、それを利用した Rac1
および ERK5 の機能解明と免疫治療への
利用」

出願番号：特願 2005-001953

出願：2005 年 1 月 06 日



【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)。