

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 「Generation and functional analysis of SDF-1 Intrakine expressing mice」

和訳 SDF-1 Intrakine発現マウスの作製と解析

指導教官

松島綱治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月 転入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 小内伸幸

序

生体の造血系においては、造血幹細胞が自己増殖、分化を繰り返し、そこから多くの種類の血球細胞が再生、補充されている。血球細胞は胎生 7.5 日の胚体外中胚葉から発生し、その後、卵黄嚢 (yolk sac) に分布する血管中に移行し、続いてパラ大動脈臓側中胚葉 (paraaortic splanchnopleura mesoderm; PAS)、AGM (aorta-gonad-mesonephros、大動脈-生殖隆起-中腎)、肝臓、骨髄へと血球形成の場は移行していく。このような細胞の成熟に伴って環境を変え細胞が移行していくプロセスはたいへん重要である。しかしながら、この分化課程における血球細胞の細胞移動、定着の分子メカニズムは明らかになってはいない。

最近このような細胞移動を制御する分子としてケモカインが注目されている。ケモカインは白血球走化性・活性化作用を有し、塩基性でヘパリン結合性の強い蛋白分子群であり、非常に保存された部位に存在する最初の2つのシステイン残基の存在形式により CXC、CC、C、CX3C サブファミリーに分類される。CXC サブファミリーに属する SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)は田代らにより、シグナル配列トラップ法を用いてストローマ細胞が産生する分泌タンパクとしてクローニングされた。また、長澤らによりプレ B 細胞株 DW34 の増殖を指標とした発現クローニング法により、プレ B 細胞増殖刺激因子 (pre B-cell stimulating factor; PBSF)としてクローニングされた。SDF-1 は血液前駆細胞、B 細胞、T 細胞、単球に対し遊走活性を示し、その受容体である CXCR4 は様々な組織、細胞で発現している。さらに、T-tropic HIV の宿主

細胞への侵入に必要な CD4 のコレセプターとして機能していることが明らかとなり、臨床応用面からも注目を集めている分子である。SDF-1 あるいは CXCR4 遺伝子欠損マウスは胎生 16.5~18.5 日で半数が死亡し、出生 1 時間以内に残りが死亡する。さらに、胎生 18.5 日の肝では B 細胞前駆細胞数が著しく低下し、骨髄では B 細胞前駆細胞数ならびに骨髄系前駆細胞数も低下したと報告されている。また、心形成異常、胃腸管の血管形成異常、小脳の顆粒細胞層の異常も認められ、SDF-1/CXCR4 は胎生期造血、器官形成を制御していると考えられている。

Intracellular chemokine "intrakine"は、その C 末端側にリジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシンから成る小胞体における停留シグナルを持つため、分泌されず、細胞内の小胞体に留まり、新たに合成されたレセプターに結合し、細胞膜への輸送をブロックする。*in vitro* の実験において、ヒト SDF-1-intrakine を遺伝子導入したリンパ球は T-tropic HIV 感染に対し、耐性となったことが知られている。しかし、*in vivo* において SDF-1-intrakine が CXCR4 発現を抑制するのか、また、成人期において CXCR4 発現を抑制することでどのような作用を示すかは明らかではない。

そこで、本研究では、SDF-1 あるいは SDF-1-intrakine 遺伝子を retrovirus vector により血液前駆細胞に遺伝子導入し、致死量の放射線を照射したマウスに移植し、再構築マウスを作製し、その表現型を解析した。

## 方法

### 1. 再構築マウスの作成

green fluorescent protein (GFP)のみを発現するもの、また SDF-1 あるいは Intrakine と GFP をそれぞれ発現する bicistronic expression vector を作製した。各 expression vector を retrovirus packaging 細胞 BOSC23 に遺伝子導入し、ウィルス上清を調製し、c-kit<sup>+</sup>細胞に感染させた。感染後、GFP 陽性細胞をソーティングし、致死量の放射線を照射したマウスに移植し、再構築マウスを得た。

### 2. 再構築マウスの表現型の解析

再構築率を確認するため、移植後、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺における GFP 発現の時間経過をフローサイトメトリー (Flow cytometry; FCM)にて解析した。intrakine が *in vivo* において、CXCR4 発現を抑制するかどうかを検討するため、各マウス由来の脾臓細胞表面上の CXCR4 発現をウサギ抗マウス CXCR4 ポリクローナル抗体、また他のケモカイン受容体に対する抗体にて染色し、FCM による解析、及び recombinant SDF-1、MIP-1 $\alpha$ 、SLC を用いた遊走実験を行い、その効果を確認した。

### 3. 再構築マウスの造血の解析

移植後の各マウス由来の末梢血、骨髄、脾臓、胸腺から single cell suspension を調製し、各 lineage 特異的細胞表面マーカーで染色し、FCM にて解析した。また、骨髄における各血液前駆細胞数を *in vitro* colony assay によって測定した。末梢血中のイムノグロブリン量を ELISA 法にて測定した。

### 4. 胸腺の組織学的検討

各マウス由来の胸腺をホルマリンにて固定し、HE 染色し、組織学的検討を行った。また、同時に凍結切片を作成し、抗マウス SDF-1 抗体、抗マウス CXCR4 抗体を用いて免疫染色を行い、胸腺における SDF-1/CXCR4 発現を検討した。

## 結果

1. 移植後の GFP 陽性率を FCM にて解析したところ、移植後 56 日目、GFP、SDF-1 導入マウスでは、それぞれ  $90.3\% \pm 7.8\%$ 、 $95.5\% \pm 8.4\%$  と高い値を示し、高率のよい再構築マウスを得た。一方、intrakine 導入マウスではこれら 2 種類マウスに比べて平均で 12~15% ほど、GFP 陽性率が低い値を示した。

2. intrakine が *in vivo* において、CXCR4 発現を抑制するかどうかを検討するため、各マウス由来の脾臓細胞表面上の CXCR4 発現をウサギ抗マウス CXCR4 ポリクローナル抗体にて染色し、FCM によって解析したところ、GFP、SDF-1 導入マウス由来の脾臓細胞表面上の CXCR4 発現には差はなかったのに対し、intrakine 導入マウスでは CXCR4 発現が著しく低下していた。同様な結果は末梢血、骨髄、胸腺でも認められた。

また、CC ケモカインである SLC/6Ckine、ELC/MIP-3 $\beta$ /CK $\beta$ 11 の受容体である CCR7 発現は各マウスにおいて発現の差はなかったが、MIP-1 $\alpha$ 、RANTES の受容体である CCR1 発現は、顕著ではないが intrakine 導入マウスにおいて発現が低下していた。

次に、脾臓、骨髄細胞を用いて SDF-1 に対する遊走実験を行った。intrakine 導入マウスでは SDF-1 に対する走化能が、ほぼバックグラウンドレベルまで著しく低下していた。一方、SLC/6Ckine、MIP-1 $\alpha$  に対する反応性に各マウス間において顕著な差はなかった。以上の結果から、intrakine 導入マウスでは、細胞表面上の CXCR4 発現が低下したために、SDF-1 に対する走化能が選択的に抑制されたことが証明された。

3. intrakine 導入マウスでは、骨髄中のプロ B 細胞(B220+CD43+)、プレ B 細胞 (B220+CD43-)、未成熟 B 細胞 (B220+ IgM+) が GFP 導入マウスと比較して ( $3.7\% \pm 0.7\%$  対  $8.8\% \pm 1.1\%$ 、 $12.3\% \pm 1.7\%$  対  $25.3\% \pm 2.2\%$ 、 $1.2\% \pm 0.4\%$  対  $6.6\% \pm 0.9\%$ ) 減少していた。また、顆粒球/単球 (Gr-1+ CD11b+) も減少していた ( $6.7\% \pm 1.4\%$  対  $31.5\% \pm 2.4\%$ )。末

梢血、脾臓においても同様な未成熟 B 細胞、顆粒球/単球の減少が認められた。

intrakine 導入マウスの骨髄では *in vivo* colony assay によって、B 細胞前駆細胞数、顆粒球単球前駆細胞数、混合コロニー形成細胞数の減少も確認された。一方、SDF-1 導入マウスでは、これらプロ B 細胞、プレ B 細胞、未成熟 B 細胞、顆粒球/単球が GFP 導入マウスと比較して末梢血、骨髄、脾臓で増加していた。以上の結果から、SDF-1/CXCR4 は成人期においても B 細胞、顆粒球/単球造血において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5. SDF-1 導入マウスの胸腺では、CD4<sup>+</sup> dull CD8<sup>+</sup> dull 細胞が増加し、このため CD4<sup>+</sup> high、CD8<sup>+</sup> high 細胞が減っていた。一方、intrakine 導入マウスでは CD4<sup>+</sup>/dull CD8<sup>+</sup>/-細胞が認められた。また各胸腺の組織学的検討を行ったところ、SDF-1 導入マウスの胸腺では皮質、髄質肥厚が認められ、intrakine 導入マウスでは髄質形成不全が認められた。

## 考察

本研究では、初めて intrakine が *in vivo* においてそのレセプターである CXCR4 の発現を抑制し、SDF-1 に対する反応性をブロックすることを明らかにし、intrakine を用いたアプローチがケモカイン・ケモカインレセプター研究の新たなツールとして非常に有用であることが示された。この intrakine あるいは SDF-1 を遺伝子導入した血液前駆細胞を用いた再構築マウスを作製し、その表現型の解析結果から、胎生期ばかりでなく、成人期の B 細胞、顆粒球/単球造血においても SDF-1/CXCR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、新たな知見として、intrakine あるいは SDF-1 導入マウスにおいて、SDF-1/CXCR4 遺伝子欠損マウスでは認められなかった T 細胞造血に異常が認められた結果から、成人期 T 細胞造血においても SDF-1/CXCR4 が何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。

ケモカインレセプター CCR5、CXCR4 が HIV の細胞侵入における主なコレセプターとして機能することが明らかになり、ケモカイン・ケモカインレセプターが AIDS 治療の分子標的となる可能性が大いに期待される。とりわけ CXCR4 は CD4<sup>+</sup> T 細胞減少を伴う AIDS 進行後期から出現してくる T-tropic HIV のコレセプターとして機能しているがため、AIDS 病態に重要な役割を果たしている。しかし、今回の我々の結果から CXCR4 を標的とした治療を患者へ行った場合、AIDS 進行を阻止するかもしれないが、同時にその患者の造血への影響の危険性もありうるということが示唆された。