

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 小内伸幸

本研究では、CXCR4 とそのリガンド SDF-1 の成人期造血における役割と、CXCR4 を分子標的とした HIV 治療の可能性を調べるため、SDF-1 遺伝子あるいは、小胞体中に CXCR4 をトラップするように人工的にデザインした intracellular-chemokine (intrakine) 遺伝子をレトロウイルス発現ベクターを用いて血液前駆細胞に遺伝子導入し、導入された GFP<sup>+</sup>細胞を移植して再構築マウスを作製し、その表現型を解析し、以下の結果を得ている。

1. SDF-1 あるいは intrakine と GFP をそれぞれ発現するバイシストロニックレトロウイルス発現ベクターを作製した。マウス骨髄から血液前駆細胞分画として c-kit<sup>+</sup>細胞を精製し、この細胞に GFP、SDF-1、intrakine 発現ウイルスを感染させ、致死量の放射線を放射したマウスに移植した。移植後、各再構築マウスの GFP 発現を Flow cytometry (FCM) で解析した結果、移植から 84 日までは、GFP、SDF-1 導入マウス共に、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺において 90% 近い値を示し、非常に高率のよい再構築マウスを作製することができた。一方、intrakine 導入マウスではこれら 2 種類のマウスに比べて、12~15% ほど GFP 陽性率は低かったこれは、intrakine が持つ造血抑制効果を反映しているものと考えられた。

2. 各マウスの脾臓細胞を用いて、細胞表面上の CXCR4、CCR7、CCR1 発現を FCM によって解析したところ、GFP、SDF-1 導入マウスでは CXCR4 発現に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。また、CCR7 発現は各マウスにおいて大きな発現の差はなかったが、CCR1 発現は intrakine 導入マウスでわずかに低下していた。これは intrakine 導入マウスの脾臓では、B 細胞造血、顆粒球/単球造血が低下した影響と考えられる。実際、intrakine 導入マウス脾臓中の CD11b<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup> 細胞表面上の CCR1 発現が低下していた。

さらに、脾臓細胞、骨髄細胞を用いて SDF-1 に対する遊走実験を行ったところ、GFP、SDF-1 導入マウス由来の細胞では SDF-1 に対する反応性に差はなかったのに対し、intrakine 導入マウスでは著しく低下していた。一方、SLC、MIP-1 $\alpha$  に対する走化性に各マウスで大きな差はなかった。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 に対する反応性が抑制された。

3. FCM 解析の結果、intrakine 導入マウスでは、骨髄中のプロ B 細胞(B220<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>)、プレ B 細胞 (B220<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup>)、未成熟 B 細胞 (B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>)、顆粒球/単球 (Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) が GFP 導入マウスと比較して減少していた。同様な結果は末梢血、脾臓においても認められた。また、intrakine 導入マウスの骨髄において *in vivo* colony assay によっても、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が確認された。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、骨髄球系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。

4. 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、髓質肥厚が認められ、intrakine 導入マウスでは髓質形成不全が認められた。以上の結果から、成人期 T 細胞造血においても、重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、本論文は SDF-1、intrakine 導入マウスを作製し、その表現形の解析から、*in vivo* において初めて intrakine が機能することを示し、ケモカイン研究の新たなアプローチ方法確立し、さらに成人期造血において SDF-1/CXCR4 が B 細胞造血、骨髄球系造血、T 細胞造血において重要な役割を果たしていることを証明した。また CXCR4 は AIDS 治療の分子標的として注目されている分子であるが、本研究の結果から、長期に渡り CXCR4 を抑制した場合、副作用として患者の免疫系、造血系に重篤な障害をもたらす可能性が示唆され、AIDS 治療を考える上で重要な知見を与え、学位の授与に値するものと考えられる。