

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 新井郷子
指導教官名 八村敏志

論文題目 マウスにおける遺伝子操作を用いた血球分化の制御に関する研究

赤血球、顆粒球、マクロファージ、T 細胞、B 細胞など、すべての血球細胞は共通の造血幹細胞に由来する。未成熟な造血幹細胞が各段階の血球前駆細胞を経て、様々な系統の成熟血球細胞へと分化する過程が血球分化・造血 (Hematopoiesis) であり、胎生期では肝臓で、成体では骨髄で行われる。T 細胞だけが前駆細胞の段階で胸腺に移行し、そこでさらに正、負どちらかの選択を受けて、多様な T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を持った成熟 T 細胞に分化する。造血幹細胞から各系統の成熟血球細胞に至るまでの分化の流れは、現時点では図 1 のようであることが判明している。

ひとつの造血幹細胞が各分化段階を経て、各々の系統の血球へと分化していく過程には、転写調節因子などの様々な遺伝子の発現が関与しており、それらが各分化段階・血球系統において特異的に発現することにより、全血球細胞の機能や規模の恒常性が保たれている。

一方、胸腺における T 細胞の分化はそういった遺伝子発現による制御だけでは説明できない。T 細胞における TCR は実に多様であるが、それは、あらかじめ再編成された個々の TCR 遺伝子が個々の胸腺細胞で発現しているなかで、適当な TCR を発現したものだけが、そこからのシグナルによって増殖が可能となり、生き残ることができるという「選択」機構によるものであり、血球分化の末梢に位置する、より高等な分化機構であると言える。

本研究では、様々な遺伝子の発現によって緻密に制御された血球前駆細胞の分化と、T 細胞のように外部からの刺激により生死の選択が行われるという二つの全く異なる血球分化の機構に興味を抱き、それぞれについて、マウスにおける遺伝子操作を用いて解析した。前者

では、血球前駆細胞の様々な成熟段階において分化を特異的に制御する遺伝子を探索し、新しい遺伝子 *MBT-1* を同定した。さらにその遺伝子のノックアウトマウスを用いて解析し、新しい血球分化の機構を示した。後者は、胸腺における T 細胞の選択に関与する $\alpha\beta$ TCR と pre-TCR の機能的類似性の有無を、トランスジェニックマウスの系を用いて証明した。

1. 血球前駆細胞の分化を制御する新しい Polycomb 遺伝子 *MBT-1* に関する研究

血球分化の過程では、血球前駆細胞の「増殖」、そしてある分化段階から次の段階への「分化」の繰り返しにより、最終的に成熟した血球細胞へと分化する。この「分化能」が特異的に障害されると、未成熟な血球前駆細胞がある分化段階で異常に増殖し、急性白血病の原因となる。本研究では、血球分化を制御する遺伝子群の中には、様々な分化段階でその「分化」を特異的に制御する機構が存在するのではないかと考え、新しい遺伝子 *MBT-1* に着目した。*MBT-1* は、白血病細胞株において化学的に分化を誘導した際に一過性に発現が上がる Polycomb 遺伝子として同定した。Polycomb グループ (Polycomb group: PcG) タンパク質とは、その複合体が DNA に結合することでリプレッサーとして遺伝子の発現制御に関与している核タンパク質の一群であり、血球分化の制御にも深く関与しているという報告がなされている。また、*MBT-1* のヒトにおける染色体遺伝子座は、白血病患者で欠損・変異の多く見られる 6q23 (第 6 染色体長腕) に位置していることから、血球前駆細胞の分化の制御に大きく関与する遺伝子であることが予想された。

本研究では *MBT-1* の生理機能を解析するために *MBT-1* ノックアウト (*MBT-1*^{-/-}) マウスを作製した。*MBT-1*^{-/-}マウスの造血系では、ミエロイド系共通前駆細胞 (Common myeloid progenitor: CMP、図 1 参照) の分化能が障害されており、結果として、*MBT-1*^{-/-}マウスの胎子の造血系では未熟な段階の血球前駆細胞が蓄積するが、一方、顆粒球やマクロファージ、赤血球などの成熟した血球が減少し、*MBT-1*^{-/-}マウスは胎生後期に貧血による致死となった。

この分化障害が前駆細胞自身の異常なのか、造血系の外部環境によるものなのかを確かめるために、*MBT-1*^{-/-}マウスと正常マウスの胎生期肝臓細胞からそれぞれ CMP を単離して *in vitro* で培養し、分化にともなう細胞表面分子の発現を観察したところ、*MBT-1*^{-/-}マウスの前駆細胞では、正常細胞と比較して分化の遅れが見られた。しかしながら、細胞周期の DNA 合成期に取り込まれる BrdU の量は両者に違いは見られなかったことから、*MBT-1* の欠損により、血球前駆細胞自身の分化能が特異的に障害されるが、増殖能 (細胞分裂能) は正常のまま保たれることが示された。

さらに、HSC (Hematopoietic stem cell) は自己複製能力を持つ最も未熟な造血細胞であり、ゆっくりと細胞分裂し、長期的な造血幹細胞として存在する LT-HSC (Long-term HSC) と比較的速く細胞分裂して次の段階へと分化する ST-HSC (Short-term HSC) に分類されるが、*MBT-1*^{-/-}マウスでは、LT-HSC から ST-HSC への分化も障害され、結果として下流の前駆細胞の減少、および LT-HSC の蓄積が見られた。このように、*MBT-1* は、幹細胞、前駆細胞の様々な成熟段階でその分化を制御していると考えられる。

それでは、*MBT-1*はどのように血球前駆細胞の分化を制御しているのだろうか。血球前駆細胞がある分化段階で増殖しながら、次の段階へ分化・移行する際には、細胞周期の一時的な停止が必要であると考えられる。*MBT-1*が血球前駆細胞の分化を制御する機構として細胞周期に関連する因子の関与を調べるために、*MBT-1*ノックアウトマウスと正常マウスの胎生期肝臓細胞の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて比較したところ、*MBT-1*ノックアウトマウスの血球前駆細胞において、細胞周期の停止を制御するサイクリン依存キナーゼ阻害因子のひとつである、p57^{KIP2}の発現が減少していた。そこで、*MBT-1*ノックアウトマウスの血球前駆細胞を単離し、アデノウイルスベクターを用いて p57^{KIP2}を過剰発現させ、*in vitro*で培養したところ、CMPの分化の遅れが改善された。

以上のことから、*MBT-1*は、血球前駆細胞の様々な分化段階において一過性に発現することにより、その下流に位置すると考えられる p57^{KIP2}の発現を一時的に上昇させて、細胞周期を一時的に停止させ、ある分化段階から次の段階への分化を誘導する役割をもつことが示唆された。血球分化の過程において、様々な分化段階の前駆細胞で分化を特異的に制御する遺伝子は今までに報告がなく、本研究において新しい血球分化の制御機構が示された。

2. preTCRによるCD8⁺T細胞のポジティブセレクション

胸腺における未熟T細胞（胸腺細胞）の分化の過程は、細胞表面の変化により、CD4⁻CD8⁻ダブルネガティブ（double negative: DN）から immature CD8⁺（ISP: immature single positive）を経て CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ（double positive: DP）へ移行する。この間に二段階のセレクションが行われる。

TCRは α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体からなるが、DNからDPへの移行にともない、まずTCR β 鎖の再編成が行われ、単一のpre-TCR α （pT α ）鎖とともにpre-TCRを形成する。pre-TCRからシグナルが入ると、増殖とさらなるTCR β 鎖の再編成の停止が起こり、CD4、CD8が細胞表面に発現される。これを β -セレクションという。pT α 鎖の発現が上昇するとTCR α 鎖の再編成が起こり、 $\alpha\beta$ TCRが形成される。自己の主要組織適合遺伝子複合体

（Major histocompatibility complex: MHC）に提示された抗原ペプチドと中程度の親和性をもつTCRを有したDP胸腺細胞は成熟してCD4⁺シングルポジティブ（single positive: SP）、もしくはCD8⁺SP細胞へと分化する。この過程をポジティブセレクションという。一方、強すぎる親和性をもつTCRを有したDP胸腺細胞（自己反応性T細胞など）は、アポトーシスによって死滅する。この過程をネガティブセレクションという。残りの大部分のDP胸腺細胞は十分な親和性をもたず、ポジティブセレクションもネガティブセレクションも受け得ず、死滅する。これら二段階のセレクション（ β -セレクション、ポジティブ／ネガティブセレクション）を経て、末梢におけるT細胞のレパートリーは形成される。

pre-TCRと $\alpha\beta$ TCRは構造や用いるシグナル伝達分子が類似していることから、機能的に共有している部分があるかもしれないという推測はなされていたものの、その証明は困難であった。本研究では、TCR α 鎖ノックアウトマウスの胸腺にpT α を過剰発現させたpT α トラ

ンスジェニック/TCR α ノックアウトマウスを作製し、 $\alpha\beta$ TCR 非存在下で、CD4⁺CD8⁺DP 胸腺細胞上に pre-TCR が強く発現する系を構築し、そのマウスで pre-TCR によるポジティブセレクションが起こるかどうかを観察した。その結果、このマウスの末梢には成熟 CD8⁺T 細胞が多数存在し、pre-TCR は CD8⁺T 細胞のポジティブセレクションに関しては極めて効率良く誘導できること、すなわち、pre-TCR と $\alpha\beta$ TCR は部分的に同じ機能を共有していることを証明した。

DP 胸腺細胞がポジティブセレクションされる際に、CD4、CD8 のいずれかの系統に決定される機構 (lineage commitment) には、TCR からの刺激の強さや質を論じた複数の説があるが未だに解明されていない。本研究において、pre-TCR からの刺激によって CD8⁺T 細胞のみがポジティブセレクションされたことは、lineage commitment の機構の解明に大きな手懸かりとなるものと考えられる。

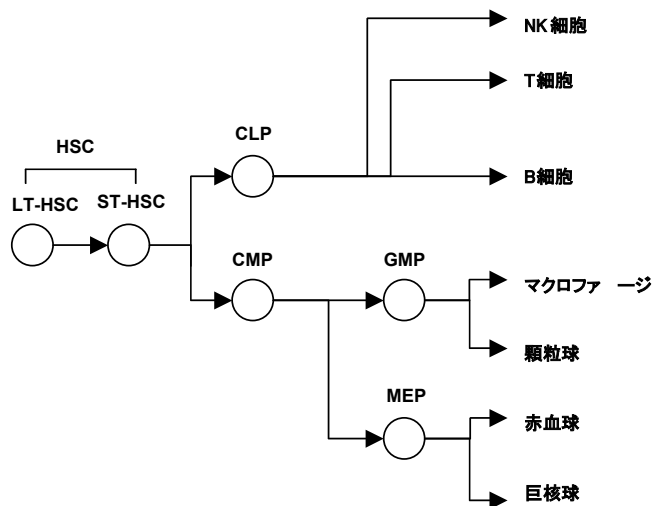


図1 血球分化の流れ

HSC: hematopoietic stem cell, 造血幹細胞

CLP: common lymphoid progenitor, 共通リンパ球系前駆細胞

CMP: common myeloid progenitor, 共通ミエロイド系前駆細胞

GMP: granulocyte/macrophage progenitor, 顆粒球/マクロファージ系前駆細胞

MEP: megakaryocyte/erythrocyte progenitor, 巨核球/赤血球系前駆細胞