

論文の内容の要旨

論文題目 ストローマ細胞上におけるヒト顆粒球/B細胞造血の動態と
構成的 Pax5 発現によるその抑制

氏名 関根理恵子

【研究目的】

ヒト Pax5 遺伝子は染色体 9p13 領域に位置し、Bリンパ細胞の分化に重要な転写因子である。マウスではBリンパ細胞の正常分化への関与が詳細に解析されているのに対し、ヒトでは Pax5 変異とB細胞性造血器腫瘍との関連を中心に研究がなされてきた。ヒト造血幹細胞の骨髄再構築に関する研究では NOD/SCID マウスを用いた系が確立されているが、この系では B 前駆細胞の分化初期の詳細な検討は困難であり、ヒト正常造血過程での Pax5 の経時的動向を検討した報告はない。またヒト造血前駆細胞中での Pax5 の構成的発現が骨髄前駆細胞分化に与える影響に関して統一した結論は未だ得られていない。さらに Pax5 遺伝子はオルタナティブスプライシングにより種々のアイソフォームを生じるが、これらの正常造血への関与は不明であり、近年では Pax5 変異と B 細胞腫瘍化の機序との関係が注目されている。本研究はヒトプレ B 細胞より分離した Pax5 アイソフォーム遺伝子を造血前駆細胞に導入し、骨髄系細胞及びB前駆細胞分化への関与を *in vitro* で解析することを目的とした。

【研究方法】

1 *in vitro* でのヒト B 前駆細胞の分化の検討

マウス骨髄ストローマ細胞 (HESS-5) はヒト造血細胞の支持能力を持つことが知られている。CD34 陽性細胞をサイトカイン存在下 (SCF 20ng/ml、G-CSF 10ng/ml) で HESS-5 と共培養を行うと、骨髄系細

胞と B 前駆細胞の 2 系統への分化が誘導される。この過程で細胞表現型と定量的 PCR 法による B 前駆細胞分化に関与する遺伝子 (RAG1、E2A、EBF、Pax5) の発現量の推移を経時的に解析した。細胞表面マーカーとして CD34、CD19、CD20、免疫グロブリン軽鎖 (κ 、 λ) を使用し、CD34+/CD19-細胞を早期 B 細胞、CD34+/CD19+/CD20-細胞をプロ B 細胞、CD34-/CD19+/CD20+細胞をプレ B 細胞とした。

2 レトロウイルスベクターを用いた造血前駆細胞への遺伝子導入法の検討

レトロウイルスベクターによる導入遺伝子の発現は LTR 配列に依存する。LTR の異なる 3 種類のベクター、pMXs (moloney murine leukemia virus: MoMLV)、pMYs (myeloproliferative sarcoma virus: MPSV)、pMCs (murine stem cell virus: MSCV) を用いてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞に EGFP 遺伝子を導入し、(1) 導入効率と発現強度、(2) *in vitro* で顆粒球及びプレ B 細胞へ分化した後の発現持続率と発現強度、を検討した。

3 Pax5 が骨髄系細胞及び B 前駆細胞の分化に及ぼす影響の検討

この系で得たプレ B 細胞から、C 末端 (転写調節領域) が異なる 3 種のアイソフォーム (完全長型: Pax5、エクソン 9 欠失型: del9、エクソン 8' 挿入型: ins8') を検出した。このアイソフォームの B 前駆細胞分化過程での発現量を定量的 PCR 法で解析し、次いで Pax5 標的塩基配列を用いたレポーターアッセイ法と、前述の共培養法とレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、Pax5 アイソフォームの転写活性の差異と、Pax5 アイソフォームの構成的発現がヒト骨髄系細胞及び B 前駆細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

【結果及び考察】

1. 実験に使用した臍帯血 CD34 陽性細胞の 95% は CD33 陽性で、CD19 陽性率は極めて低く、B 前駆細胞は少数の CD34+/CD33-/CD19- 分画中に含まれる。共培養開始後に HESS-5 細胞と強く接着している B 前駆細胞を解析した結果、培養 1 日目の細胞では、E2A、RAG1 に比べ EBF、Pax5 の発現量が極めて低く、この時期の B 前駆細胞の大半は早期 B 細胞か前期プロ細胞であると推測された。EBF、Pax5 の発現が増加するのは 14 日以降で、これは細胞表面型の解析で CD34+/19+/20-細胞が出現する時期とほぼ一致しており、CD34 陽性細胞から後期プロ B 細胞に分化が進むのは 14 日目頃であると推測された。28 日以降は過半数が CD34-/CD19+/CD20+細胞(プレ B 細胞)に分化し、42 日目頃には一部の細胞は未熟 B 細胞へと分化することを確認した。本研究は臍帯血から分離した CD34 陽性細胞から B 前駆細胞への分化の過程で、経時的に遺伝子発現を解析した初めての報告である。

2. pMXs, pMYs, pMCs のいずれのベクターを用いた場合もMOI=10 での単回感染で 80%以上の EGFP 導入率が確認できた。骨髄系細胞、B 前駆細胞に分化した後も EGFP 発現率は 80%以上を維持していたが、pMXs は B 前駆細胞、骨髄系細胞とも EGFP の発現強度が pMYs, pMCs より低かった。pMYs は骨髄系細胞で特異的に高い発現を示し、pMCs は CD34 陽性細胞から骨髄系細胞、プレ B 細胞への分化過程を通じて最も安定した EGFP の発現を示した。pMCs の CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を更に改善するために、感染時間を 48 時間に延長し4回の反復感染を行った結果、感染終了時の全細胞の EGFP 陽性率は $80.4 \pm 6\%$ に上昇したが、CD34 陽性率は $75.8 \pm 2.7\%$ に低下した。但し、感染終了後も CD34 陽性の細胞では EGFP 陽性率は $86.3 \pm 4.6\%$ と高い傾向が見られた。感染細胞は、非感染細胞とほぼ同レベルのコロニー形成能と分化能を保持し、9 週間の共培養期間を通して EGFP 陽性率は常に 98%以上の高い水準を維持しており、長期培養による発現低下は見られなかった。

3. del9 は転写調節部位の一部を欠失している。ins8' は転写調節部位が新規アミノ酸配列に置換された未知のアイソフォームでありその転写活性や意義は知られていない。定量的 PCR 法の結果、del9 は 2 週目以降、ins8' は3週目以降に検出可能となり、主にプレ B 細胞分化以降に発現していることが明らかになった。Hela 細胞に上記の Pax5 アイソフォームと Pax5 標的塩基配列を用いたレポータープラスミドを一過性発現させた場合の転写活性は Pax5 > del9 > ins8' という結果を得たが、ヒト骨髄前駆細胞に構成的に発現させた場合の内在性 CD19 の誘導率は Pax5 > ins8' > del9 、と前者と異なった。1990 年代に行われた Pax5 の転写調節機能に関する報告は今回使用した標的塩基配列を用いたレポータープラスミドを用いている。細胞内環境の異なる培養細胞に一過性に発現させた場合と、造血細胞で恒常的に発現させた場合では結果が異なる場合があり、今後、Pax5 転写調節部位を介して結合する共役蛋白との関連を検討している。

コロニー形成試験の結果、顆粒球マクロファージコロニーは、コントロール細胞に対して Pax5 細胞で有意に抑制された ($p < 0.05$)。del9 細胞と ins8' 細胞は、コントロール細胞との比較でコロニー数では有意差はないが、形態的には明らかに小さかった。共培養でも骨髄系細胞の産生は Pax5 で強く、del9 と ins8' で中等度に抑制された。一方、赤芽球・混合コロニーはいずれの Pax5 アイソフォームでもコントロール細胞と比較して有意に抑制された ($p < 0.05$)。顆粒球マクロファージコロニー形成は Pax5 の転写活性に応じて抑制されるのに対し、赤芽球・混合コロニー形成は転写調節部位の違いに依存せず高度に抑制されることが明らかになった。この結果より、Pax5 による多能性前駆細胞か

ら赤芽球系細胞への分化の抑制は、転写調節以外の機序によると推測された。

Pax5 の構成的発現により骨髄前駆細胞で一過性に CD19 の発現が誘導されることが分かった。CD19/CD33 陽性細胞の比率は、コントロール細胞では 5%未満であるのに対し Pax5 細胞では 15%以上と有意に高値であり、del9 細胞、ins8' 細胞でも少数の2重陽性細胞が出現した。Pax5 細胞は形態的には顆粒の目立つ骨髄芽球様細胞で一部に異型性の強い好中球様細胞と小型のリンパ球様細胞を認めた。しかしこの CD33/CD19 細胞は 2 週間以上培養することは不可能であった。Pax5 を骨髄系前駆細胞に強制発現させると、顆粒球分化の早期段階（形態的特徴からは骨髄芽球から前骨髄球段階）で分化が停止すると考えられる。さらに細胞周期アッセイ及びアポトーシスアッセイの結果から、この芽球様 Pax5 細胞はコントロール細胞と同程度の分裂能を有するが 2 週間以内に死滅すると推測された。転写活性能が高いほど骨髄系細胞の産生数やコロニー形成の抑制が高度であること、CD33/CD19 細胞の比率が高いことから、Pax5 による正常顆粒球分化の阻害には転写調節部位が関与することが推測できるが、その機序の解明は今後の課題である。

B 前駆細胞分化についても、共培養 1 週の時点で Pax5 細胞はコントロール細胞に比較して細胞数が少なかった。但し4週目以降に生存している Pax5 細胞（プレ B 細胞）はコントロール細胞に比べ CD20 と細胞表面免疫グロブリン鎖を表出している割合が高く、プレ B 細胞の分化は抑制されていなかった。さらに Pax5 細胞内では発現強度が低い分画の方が CD19+/CD20+細胞の比率が高い傾向が見られ、del9 細胞と ins8' 細胞でも同様の傾向が見られた。以上より多能性造血前駆細胞に Pax5 を構成的に発現させると早期 B 前駆細胞への分化が阻害され、その結果として下流の B 前駆細胞の産生数が減少するが、内因性 Pax5 を発現する後期プロ B リンパ細胞以降の分化は Pax5 の過剰発現による干渉は少ないと推測される。

【結論】

Pax5 の構成的発現により、骨髄系細胞と早期 B 前駆細胞への分化は転写活性能に応じて、赤芽球系細胞への分化は転写活性能に依存せずに抑制されること確認した。この系を用いてヒト B 前駆細胞の初期分化における外来遺伝子の影響を評価し得る可能性が期待された。近年、B リンパ性腫瘍で様々な変異型 Pax5（欠失型、置換型、転座型）が相次いで報告され、その機序の解析が待たれている。この系を用いて Pax5 アイソフォームの B 細胞腫瘍化への関与の解析を検討している。