

## 審査の結果の要旨

氏名 関根理恵子

本研究は正常ヒト造血における Pax5 遺伝子の経時的動向と、骨髄系細胞及びB前駆細胞分化への関与を臍帯血 CD34 陽性細胞と HESS-5 細胞の共培養法を用いて *in vitro* で解析することを試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 細胞表現型と RAG1、E2A、EBF、Pax5 遺伝子の発現量を定量的 PCR 法で解析した結果、臍帯血 CD34 陽性細胞に含まれる B 前駆細胞の大半は早期 B 細胞から前期プロ細胞であり、後期プロ B 細胞に分化が進むのは培養開始後 14 日目頃であることが示された。さらに 28 日以降は過半数がプレ B 細胞に分化し、42 日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. LTR の異なる3種類のレトロウイルスベクター、pMXs (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、いずれを用いた場合も MOI=10 での単回感染で 80%以上の EGFP 導入率が得られ、骨髄系細胞、B 前駆細胞に分化した後も同等の発現率を維持することを示した。さらに pMCs を用いた遺伝子導入では、感染細胞は非感染細胞とはほぼ同レベルのコロニー形成能と分化能を保持し、EGFP 遺伝子発現は 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常に 98%以上と極めて安定しており9週間の長期培養による発現低下は見られず、この実験系に適した遺伝子導入法であることを示した。
3. この培養系で得たヒトプレ B 細胞から、C 末端（転写調節領域）が異なる 3 種のアインフォーム（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。定量的 PCR 法の結果、Pax5 はプロ B 細胞から発現しているのに対し、del9 は培養 2 週目以降、ins8' は 3 週目以降の主にプレ B 細胞以降に発現していることを明らかにした。
4. HeLa 細胞に上記の Pax5 アインフォームと 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' という結果だが、ヒト骨髄前駆細胞に Pax5 アインフォームを構

成的発現させた場合の内因性 CD19 の誘導率は Pax5 > ins8' > del9 と前者と異なることを示し、細胞内環境と転写活性の違いより、Pax5 転写調節部位を介して結合する共役蛋白との関連等を示唆し、考察した。

5. 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形成は Pax5 の転写活性能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を示した。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ことが示唆された。

6. ヒト骨髄前駆細胞に Pax5 を強制発現させると CD19 の発現が誘導され、細胞周期アッセイ及びアポトーシスアッセイにより、CD19/CD33 陽性骨髄系前駆細胞は早期段階で分化が停止すること、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ことが示された。さらに転写活性能が高い Pax5 アイソフォームほど骨髄系細胞の産生及び顆粒球コロニー形成の抑制が高度であることから、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示された。

7. Pax5 の構成的発現により早期の B 細胞分化が抑制されること、またプレ B 細胞分化後は構成的 Pax5 発現細胞の方が CD19+/CD20+細胞の比率が高い傾向が見られることを示し、多能性造血前駆細胞に Pax5 を構成的に発現させた場合、早期 B 前駆細胞への分化が阻害され、結果として下流の B 前駆細胞の総産生数は減少するが、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ものと推測された。

以上、本論文はヒト臍帯血 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。さらに未知の Pax5 アイソフォームである ins8' を検出し、これがプレ B 細胞分化以降に発現していることを明らかにした。転写調節部位の異なる Pax5 アイソフォームを CD34 陽性細胞に構成的に発現させることで、骨髄系細胞と早期 B 前駆細胞への分化は Pax5 の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抑制されること明らかにした。ヒト造血前駆細胞、特に骨髄前駆細胞の初期分化における Pax5 遺伝子の関与は統一した見解が得られておらず、未知に等しかったヒト顆粒球造血と Pax5 の関与の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。