

「生体防御のメカニズム」
平成8年度採択研究代表者

菅村 和夫

(東北大学大学院医学研究科 教授)

「サイトカイン機能不全の分子機構と遺伝子治療」

1. 研究実施の概要

サイトカイン共通受容体 γc 鎖を介する細胞内シグナル伝達はT細胞を始めとするリンパ球の発生、分化、増殖に必須であり、 γc 鎖変異によって重症複合免疫不全症が発症する。 γc 鎖を介するシグナル伝達経路には重症複合免疫不全症の新たな原因遺伝子が存在する可能性が考えられ、これら原因遺伝子の単離同定が本研究の大きな目的である。本研究では、これまでに γc 鎖に会合する Jak3 チロシンキナーゼの基質分子 (STAM、STAM2、Hrs) を単離同定してきた。本年度は、それら基質分子に会合する新規シグナル伝達分子の同定と、遺伝子欠損マウスを用いて、基質分子の *in vivo* での機能的役割の解明を行った。その結果、これら単離分子が γc 鎖/Jak3 を介するシグナル伝達機構において重要な役割を担っていることが解明されたと同時に、 γc 鎖以外のサイトカイン受容体を介するシグナル伝達機構、特に、マウス初期発生やT細胞受容体を介するシグナル伝達機構においても重要な機能分子であることが明らかにされた。今後、リンパ球初期発生制御におけるこれら機能分子の役割も明らかにできるものと期待される。他方、共同研究者は、血球血管内皮に共通の前駆細胞 hemangioblast に作用するオンコスタチンM (OSM) の同定や胸腺内T細胞分化に関わる因子の同定も行った。さらに、免疫不全症に対して有効な遺伝子治療を実現させるために、造血幹細胞への遺伝子導入効率を高めるテクノロジー開発の基礎研究も実施した。

2. 研究実施内容

(1) γc 鎖/Jak3 下流のシグナル伝達機能分子として単離した以下の3分子について、それらの機能的役割を明らかにした。

AMSH : Jak3 ならびに Jak2 に会合する STAM の SH3 領域欠損変異体は IL-2 や GM-CSF による細胞増殖を抑制することから、STAM の SH3 領域には下流のシグナル伝達に必要な分子が会合することが示唆された。そこで、STAM · SH3 領域に会合する新規分子を farwestern 法で単離し、AMSH と名付けた。AMSH は SH3 結合領域、核移行シグナル、JAB1 類似配列を有し、STAM なら

びに STAM2 と会合した。AMSH の C 末側約半分を欠損した変異体が IL-2 や GM-CSF による DNA 合成や c-myc 誘導を抑制することから、AMSH がこれら サイトカインによるシグナル伝達に関わっている可能性が示唆された。

● Grf40 : さらに AMSH に会合する新規分子を yeast two-hybrid 法を用いて単離し、Grf40 と名付けた。Grf40 はすでに知られている Grb2 や Grap に類似し、新たな Grb2 ファミリー分子であった。Grf40 は SLP-76 や LAT と会合し、T 細胞受容体からのシグナル伝達に関わることが明らかになった。サイトカインシグナル伝達における Grf40 の役割はまだ不明である。

● Hgs/Hrs : STAM や STAM2 に会合し、IL-2 や GM-CSF による細胞増殖を抑制する作用を示す。Hgs (旧名称 : Hrs) の遺伝子欠損マウスは胎児期 10.5 日以内に死亡する。この機構の解析から、Hgs が Smad2/Smad3 と会合し、アクチビンによる Smad2/Smad3 の活性化に関わっていることが証明された。すなわち、Hgs 欠損胎児ではアクチビン受容体を介する Smad2/Smad3 の活性化が抑制されているために、初期胎児発生が障害されていることが示唆された。

(1) マウス OSM 受容体遺伝子のクローニングによりその分子構造を明かにした。

● AGM(aorta/gonad/mesonephros)細胞の初代培養系において、OSM は血球と血管内皮細胞の産生を促進すること、血球は内皮様細胞から生じることなどから、OSM は血液/血管に共通の前駆細胞 (hemangioblasts) に作用する可能性を示した。また、c-myb, AML-1 のノックアウトマウス由来 AGM の in vitro 培養系を用いて、これらの転写因子が血球産生に必須であることを示した。さらに、血球より産生される OSM が胎生期の肝細胞のパラクリン分化誘導因子として作用することも見い出した。

(3) 小澤らは、遺伝子導入造血幹細胞を体内で増やすための選択的増幅遺伝子の開発を進めた。G-CSF 受容体 (G-CSFR) の増殖シグナルを利用し、その働きを制御する方法としてはエストロゲンとその受容体 (ホルモン結合部位) による分子スイッチの応用を試みた。即ち、選択的増幅遺伝子としてこれまで開発を進めてきている G-CSF 受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子 (GCRER) をベースに、平成 10 年度は実用化に向けた研究として、体内のエストロゲンに反応しないように、変異エストロゲン受容体 (エストロゲン不応性でタモキシフェンに反応するもの) を利用した選択的増幅遺伝子の開発を行った。尚、選択的増幅遺伝子のシステムが実際に体内で機能するかどうか調べる動物実験は現在も継続中である。さらに、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターシステムの開発のために、精製 AAV ベクターの作製法について条件検討を行った。その結果、遺伝子導入法への応用に適している可能性を持つ Rep 変異体の候補 (H18A, RD61AA, R122A, E201A, および E226A) を選び出した。尚、この TVI 法は、分裂能を

持った造血系細胞を標的とした場合にその本来の意義が発揮されると考えられるため、造血系の細胞株を用いて検討した。その結果、造血系細胞でも部位特異的遺伝子組込み現象がみられることが判明した。

- (4) TCR-a 鎖 Ja 49 cis ノックアウトマウスを作製し、TCR-b 鎖とは異なった特定分化段階で TCR-a 遺伝子の再構成と転写を制御するイントロン領域を、enhancer(Ea)の他に見出した。その結果、TCR-a 遺伝子が b 鎖におくれた分化段階で再構成する機構が存在することが明らかになった。また、レトロウイルス感染系を用いて未熟 T 細胞に dominant negative 型の遺伝子導入を行った解析から、Sek1-JNK 経路が T 細胞の選択的分化誘導に重要であることが示唆された。

3. 研究成果の発表 (論文発表)

- Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., and Sugamura, K.: Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J. Biol. Chem.*, 274, 19129-19135, 1999.
- Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T. and Sugamura, K.: Grf40, a Novel Grb2 Family Member, Is Involved in T-Cell Signaling through Interaction with SLP-76 and LAT. *J. Exp. Med.*, 189, 1383-1390.
- Abe, H., Takeshita, T., Nagata, K., Arita, T., Endo, Y., Fujita, T., Takayama, H., Kubo, M. and Sugamura, K.: Molecular Cloning, Chromosome mapping and characterization of the mouse CRTH2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant Receptor Family. *Gene*, 227, 71-77, 1999.
- Kumaki, S., Ishii, N., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Cosman, D., Sugamura, K. and Konno, T.: Functional role of IL-4 and IL-7 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*, 193, 607-612, 1999.
- Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K. and Takano, S.: Selective expression of a novel surface molecule by human T helper 2 cells in vivo. *J. Immunol.*, 162, 1278-1286, 1999.
- Ohtani, K., Tsujimoto, A., Tsukahara, T., Numata, N., Miura, S., Sugamura, K. and Nakamura, M.: Molecular mechanisms of promoter regulation of the gp34 gene that is trans-activated by an oncoprotein Tax of human T cell leukemia virus type I. *J. Biol. Chem.*, 273, 14119-14129, 1998.
- Sasaki, Y., Endo, K., Arita, T., Asao, H., Takeshita, T. and Sugamura, K.:

Signal transducing molecule, STAMs and Hrs, involved in cytokine-mediated signal transduction immediately downstream of Jak3 and Jak2. The 17th Int. Cancer Cong. Moraes, M. et al. ed., Monduzzi Editore, p119-125, 1998.

○Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N. and Sugamura, K.: Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.*, 72, 3018-3028, 1998.

○Takahashi, Y., Murai, C., Shibata, S., Munakata, Y., Ishii, T., Ishii, K., Saitoh, T., Sawai, T., Sugamura, K. and Sasaki, T.: Human parvovirus b19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8227-8232, 1998.

○Yasuda, K., Nemoto, T., Ohashi, Y., Satomi, S., Murata, K., Ishii, N., Takeshita, T. and Sugamura, K.: Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of IL-2 receptor. *Inter. Immunol.*, 10, 561-567, 1998.

○Sekizawa, T., Openshaw, H., Ohbo, K., Sugamura, K., Itoyama, Y. and Niland, J. C.: Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J. Neurol. Sci.* 154, 194-199, 1998.

他 25 件