

「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系研究科 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

- 1) サイトカイン共通受容体 $\gamma$ c鎖のシグナル伝達分子であるJak3と会合するSTAM1とSTAM2のダブル欠損マウスを作出し、これらSTAMsがT細胞分化増殖に必須に関わることを明らかにした。
- 2) 新たなGrb2ファミリー分子Grf40/GadsがpreT細胞の分化増殖にも関わることを明らかにした。
- 3) 抗原提示細胞の機能発現に重要なOX40/OX40リガンド(OX40L)系が実験的アレルギー性脳炎(EAE)やレーシュマニア(L. major)感染症の発症制御において、重要な役割を担うことを示した。
- 4) リンパ球を含む全ての血液細胞を産生する成体型造血幹細胞は胎生期のAGM(aorta/gonad/mesonephros)領域で発生し、胎生肝臓で増殖・分化を行った後に造血の場は胸腺、脾臓、骨髄に移行する。マウス胎仔の造血組織のin vitro培養系を用いて、造血幹細胞の発生・増殖・分化・移行のプロセスに関するサイトカイン、細胞内シグナル伝達分子、転写因子の機能解析を行った。
- 5) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの実用化を推進するため、その作製法(パッケージング細胞株開発など)と応用に関する基礎研究を行った。
- 6) 造血幹細胞遺伝子治療のために開発した選択的増幅遺伝子の有用性を動物実験(マウス及びサル)で確認した。また、X連鎖重症複合型免疫不全症やX連鎖慢性肉芽腫症の免疫不全マウスを用いて遺伝子治療モデル実験を行い、それぞれの特徴を明らかにした。
- 7) T細胞の初期分化において、i) DNからDPステージへの分化に不可欠なT細胞抗原受容体(TCR) $\beta$ 鎖の発現は、 $\beta$ 鎖遺伝子のヒストンアセチル化と再構成という一連のクロマチン構造変化に依存するが、両現象はTCR enhancerの質的に異なる制御下にある、ii) DPからSPステージへの選択的分化過程では、TCRシグナルにより転写因子c-fos遺伝子の翻訳能の獲得と翻訳開始因子であるeIF-4Eの発現亢進という機能的分化がおこる。なお、その過程にはAML-1転写因子の関与が示唆された。

## 2. 研究実施内容

- 1) STAM1とSTAM2のダブル欠損マウスが胎生致死であることから、Cre-loxP系を用いて、T細胞でのSTAM1/2ダブル欠損マウスを作出した。同マウスは末梢T細胞の著減を示し、胸腺におけるCD4SP細胞とCD8SP細胞が共に減少し、DN細胞の増加がみられた。また、同マウスの胸腺細胞は、anti-CD3+IL-2やanti-CD3+IL-7刺激に対して低応答性を示すと共に、アポトーシスに高感受性を示した。これらの結果から、STAM1/2が*in vivo*においても、T細胞の生存・分化・増殖に重要な役割を担っていることが明らかになった。
- 2) T細胞に優位に発現する新たなGrb2ファミリー分子Grf40/Gadsを単離した。Grf40/Gadsの*in vivo*機能を調べるために、Grf40/GadsのSH2ドメイン欠損変異体のトランスジェニック(Tg)マウスを作出した。Grf40/Gads-Tgマウスの胸腺では、preT細胞の分化増殖が障害され、Grf40/GadsがTCRだけではなく、preTCRを介するシグナル伝達にも関わっていることが明らかにされた。また、このTgマウスが免疫不全マウスであることが分かった。
- 3) OX40L欠損マウスではEAEの発症が強く抑えられ、抗原提示細胞にOX40Lを過剰に発現したTgマウスでは、EAEが野生型マウスに比し重症化した。これらの結果から、OX40Lが自己免疫発症に直接的に関与することが明らかになった。また、*L. major*はマウスの免疫反応解析に用いられる代表的な寄生虫であるが、*L. major*感染マウスの遺伝背景の違い(C57BL/6とBALB/c)により、免疫反応が大きく異なることが知られている。*L. major*耐性マウスであるC57BL/6にOX40Lを過剰発現すると*L. major*に感受性となり、一方*L. major*感受性マウスであるBALB/cでOX40Lを欠損させると*L. major*感染に耐性となった。これらの事実は、寄生虫感染アレルギー反応において、OX40Lが特定の遺伝的素因と機能的に関連しつつ疾患発症に重要な機能を有している可能性が示唆された。
- 4) 我々が確立した胎生期のマウスAGM領域の*in vitro*培養系を用いて、成体型造血幹細胞が発生するメカニズムの解析を行なった。AML-1およびc-Mybは成体型造血に必須の転写因子であり、これらの変異マウスのAGM培養系では血管内皮様細胞が出現するが、血球は産生されなかった。従って、これらの転写因子は血液血管内皮細胞の共通前駆細胞であるヘマンジオブラストから血球への分化に必須であることが示された。さらに、AGM培養系で、オンコスタチンM(OSM)はヘマンジオブラストに作用して、造血と血管内皮細胞の産生を促進することが示唆された。そのメカニズムを解析するために、ヘマンジオブラスト様細胞株からOSM誘導性の新規遺伝子を複数分離した。GADD45ファミリーの新規遺伝子OIG37には増殖抑制機能があることが示された。その他の遺伝子機能については解析中である。また、ヘマンジオブラスト抗原の検索を行い、AGMに存在する

PCLP1( podocalyxin-like protein 1 )陽性CD45陰性の細胞集団から造血幹細胞が産生されることから、この集団にヘマンジオブラストが存在することが考えられた。他方、胎生肝臓の培養系を確立し、OSMが肝細胞の分化を促進することを示した。この肝細胞培養系はAGM由来の造血幹細胞を増幅するとともに幹細胞の骨髄への生着を促進することができた。

5 ) アデノ随伴ウイルス ( AAV ) ベクターシステムの開発 : AAVベクター作製用パッケージング細胞株樹立に向けた基礎検討として、変異loxPを用いたCre-loxP法により複数のAAV蛋白質の発現を制御する系を確立し、ベクター作製効率を検討した。また、少量のAAVベクターをシードとして用い、それを増幅させる系の条件検討を行った。AAVベクターの遺伝子治療への応用に関しては、パーキンソン病や癌などを対象とした基礎実験を行った。

6 ) 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 ( SAG ) の開発 :

SAG [ G-CSF受容体のシグナル伝達部位とエストロゲンE $\alpha$ あるいはタモキシフェンT $m$  ) 受容体のホルモン結合部位の融合蛋白質をコードする ] は、E $\alpha$  ( T $m$  ) 刺激によってSAG導入細胞の増殖反応を誘導する技術である。in vitroでの基礎データに基づき、このシステムの有用性を動物実験で検討した。マーカー遺伝子と共にSAGを導入した骨髄細胞で造血系を再構築したマウスにT $m$ を投与すると、末梢血でマーカー遺伝子を持った白血球が増加し、SAGが機能することを確認した。さらに、大型のカニクイザルの系でも同様の結果が得られ、少なくとも造血前駆細胞レベルでの増幅効果が得られることが判明した。他方、免疫不全マウスの遺伝子治療実験を行った。 $\gamma$ c鎖遺伝子ノックアウトマウス ( X-SCIDマウス ) の系で、正常骨髄細胞移植実験により正常リンパ球の選択的増殖優位性を明らかにした。次に、 $\gamma$ c鎖遺伝子治療実験を行い、ほとんど欠損していたT細胞・B細胞・NK細胞の著明な増加を確認した。X連鎖慢性肉芽腫症 ( X-CGD ) のモデルマウスの遺伝子治療実験では、活性酸素産生能の回復を確認した。尚、X-CGDではX-SCIDの場合のような選択的増殖優位性が見られないため、SAGを応用した造血幹細胞遺伝子治療が有用と思われる。

7 ) T細胞の初期分化をDNからDPステージ ( DN-to-DP ) およびDPからSPステージ ( 選択分化 ) の2段階にわけ、その誘導に関わる分子機構を解析した。(1)TCR $\beta$ 遺伝子座のenhancer ( E $b$  ) を $\alpha$ 遺伝子座のE $a$ と置換したマウスを作製し、DN-to-DPの初期分化に必要なTCR $\beta$ 遺伝子の発現機構を、遺伝子の解放状態、転写および再構成に関わるenhancer機能に焦点を当てて解析した。その結果、 $\beta$ 鎖遺伝子の発現と再構成は極めて低いDNステージに比し、E $a$ が活性化されるDPステージでは転写および遺伝子の解放状態を示すヒストンアセチル化は亢進した。しかし、D-J $\beta$ の再構成は抑制されていた。以上、TCR $\beta$ 鎖の発現に必要な $\beta$ 鎖遺伝子の

ヒストンアセチル化と再構成というクロマチン構造変化は、TCR enhancerの質的に異なる機能に由来することが示唆された（論文投稿中）。(2)TCRシグナルにより正の選択分化を受けたDP細胞の機能的分化に関わる分子を、TCR-TgのDP胸腺細胞の再凝集同調培養法を開発して解析した。その結果、(a)選択前後でc-fos mRNA発現に変化はないが、その翻訳能は選択後に獲得された。その過程にはAML1が関与していた。(b)正の選択シグナルにより、mRNAの翻訳効率を促す転写開始因子eIF-4Eの発現亢進とeIF-4Eに結合して翻訳制御的に機能する4E-BP発現の低下がみられた（J. Immunol. 164 : 5590, 2000）。又、再凝集同調法を応用したレトロウイルス感染系を開発し（Immunol. Letter 71 : 61, 2000）eIF-4E遺伝子を導入すると選択前DP細胞にc-fos遺伝子翻訳とIL-2産生が誘導された。以上、正の選択シグナルにより増殖関連分子の発現能が翻訳因子の亢進に伴って誘導されることを明らかにした。

### 3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S., Murata, K., Kitamura, Y., Ishii, N., Nose, M., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Sasaki, H. and Sugamura, K. : Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. Mol. Cell. Boil., 276, 29943-29952, 2001.

Kikuchi, K., Kawasaki, Y., Ishii, N., Sasaki, Y., Asao, H., Takeshita, T., Miyoshi, I., Kasai, N. and Sugamura, K. : Suppression of thymic development by the dominant-negative form of Gads. Int. Immunol., 13, 777-783, 2001.

Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S. and Nagata, K. : Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. J Exp. Med. 193, 255-261, 2001.

Kumaki, S., Ishii, N., Minegishi, M., Ohashi, Y., Hakozaiki, I., Nonoyama, S., Imai, K., Morio, T., Tsuge, I., Sakiyama, Y., Miyanoshita, A., Miura, J., Mayumi, M., Heike, T., Katamura, K., Tanaka, H., Izui, I., Hibi, S., Sasaki, H., Kimura, M., Kikuta, A., Date, Y., Sako, M., Tanaka, H., Sano, K., Sugamura, K. and Tsuchiya, S. : Characterization of the  $\gamma$ c chain among 27 unrelated Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) Hum. Genet. 107, 406-408, 2000.

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J. L., Miyazono, K. and Sugamura, K. : Hgs/Hrs, a FYVE domain protein is involved in Smad signaling through cooperation with

SARA. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 9346-9355, 2000.

Otsu, M., Sugamura, K. and Candotti, F. : In vivo competitive studies between normal and common gamma chain-defective bone marrow cells : implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, 11, 2051-2056, 2000.

Onodera, J., Nagata, T., Fujihara, K., Ohuchi, M., Ishii, N., Sugamura, K. and Itoyama, Y. : Expression of OX40 and OX40 ligand (gp34) in the normal and myasthenic thymus. *Acta Neurol. Scand.* 102, 236-243, 2000.

Ishiai, M., Kurosaki, M., Inabe, K., Chan, A. C., Sugamura, K. And Kurosaki, T. : Involvement of LAT, Gads, and Grb2 in compartmentation of SLP-76 to the plasma membrane. *J. Exp. Med.*, 192, 847-856, 2000.

Kondo, M., Scherer, D. C., Miyamoto, T., King, A. G., Akashi, K., Sugamura, K. and Weissman, I. L. : Cell fate conversion of lymphoid committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature*, 407, 383-386, 2000.

Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H., Sasaki, Y., Tanaka, N., Asao, H., Kikuchi, K., Yamada, M., Chen, M., O'Shea, J. J. and Sugamura, K. : STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS Lett.*, 477, 55-61, 2000.

Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M. and Takano, S., Nagata, K. : Differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J. Immunol.*, 164, 2277-2280, 2000.

Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L. C., Nose, M., Noda, T. and Sugamura, K. : Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J. Exp. Med.*, 191, 365-374, 2000.

Miyajima, A., T. Kinoshita, M. Tanaka, A. Kamiya, Y. Mukoyama And T. Hara. : Roles of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11 : 177-183, 2000.

Mukoyama Ys, Chiba N, hara T, Okada H, Ito Y, Kanamaru R, Miyajima A, Satake M, Watanabe T. : The AML1 Transcription Factor Functions to Develop and Maintain Hematogenic Precursor Cells in the Embryonic Aorta-Gonad-Mesonephros Region. *Dev Biol* 220 : 27-36, 2000.

Ito Y., T. Matsui, A. Kamiya, T. Kinoshita, and A. Miyajima : Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and Ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32, 1370-1376, 2000.

Kojima N., Kinoshita T., Kamiya A., Nakamura K. and Miyajima A. : Cell-density-dependent regulation of hepatic development by a gp130-independent pathway

AB Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 152-158, 2000.

Yamada K, Ariyoshi K, Onishi M, Miyajima A, Hayakawa F, Towatari M, Saito H, Oka Y, Asano S, Nosaka T, and Kitamura T. : Constitutively active STAT5A and STAT5B in vitro and in vivo : mutation of STAT5 is not a frequent cause of leukemogenesis. Int. J. Hematol. 71, 46-54, 2000.

Wang Y., Robledo O., Kinzie E., Blanchard F., Richards C., Miyajima A., and Baumann H. : Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. J. Biol. Chem. 275, 25273-25285, 2000.

Ariyoshi K., Nosaka T., Yamada K., Onishi M., Oka Y., Miyajima A., and Kitamura T. : Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain. J. Biol. Chem. 275, 24407-24413, 2000.

Oda A., Wakao H., Fujihara M., Ozaki K., Komatsu K., Tanaka S., Ikeda H., Miyajima A. and Ikebuchi K. : Thrombopoietin and interleukin 2 induce association of Crk with STAT5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 299-305, 2000.

Shinjo T., Kurihara R., Inukai T., Hosoi H., Kinoshita T., Miyajima A., Houghton P. J., Look A. T., Ozawa K., and Inaba T. : Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors.

Mol. Cell. Biol. 21, 854-864, 2000.

Kamiya A., Kinoshita T., and Miyajima A. : Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. FEBS Letters, 492, 90-94, 2001.

Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K. : Gamma rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV HSVtk/ganciclovir on cancer cells. Cancer Gene Ther. 8, 99-106, 2001.

Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K. : Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 : 559-563, 2000.

Ozawa, K., Xu, R., Matsuda, K. M., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Hanazono, Y., and Kume, A. : Development of selective amplifier genes for hematopoietic stem cell gene therapy. Proceeding of the International Workshop "Stem Cell Biology and Cellular and Molecular Treatment", pp. 135

140, 2000.

Matsuda, K. M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K., and Matsuda, M. : A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy : Generation of angiostatin endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 7 : 589-596, 2000.

Shen, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, I., Fujimoto, K., Fan, D., Ogawa, O., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, I., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., and Ozawa, K. : Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic l-amino acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11 : 1509-1519, 2000.

Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Ueno, S., Ikeda, M., Minota, S., Takizawa, T., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K. : Gene transfer into rat renal cells using adeno-associated virus vectors. *Am. J. Nephrol.* 20 : 242-247, 2000.

Kume, A., Xu, R., Ueda, Y., Urabe, M., and Ozawa, K. : Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther.* 7 : 1193-1199, 2000.

Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, H., and Habu, S. : Transcriptional dysregulation of the p73L/p63/p51/p40/KET gene in human squamous cell carcinomas-expression of Np73L, a novel dominant negative isoform, and loss of expression of the Potential tumor suppressor p51. *British J. Cancer.* 84, 1235-1241, 2001

Atsushi Kumanogoh, Xiaosong Wang, Ihnsook Lee, Chie Watanabe, Masahito Kamanaka, Wei Shi, Kanji Yoshida, Takehito Sato, Sonoko Habu, Misako Itoh, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi and Hitoshi Kikutani : Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions : A role of CD40 in regulatory T cell development *J. Immunol.* 166 : 353-360, 2001.

Keitaro Hayashi, Waka Natsume, Toshio Watanabe, Natsumi Abe, Naomi Iwai, Hitoshi Okada, Yoshiaki Ito, Masahide Asano, Yoichiro Iwakura, Sonoko Habu, Yousuke Takahama and Masanobu Satake : Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single-positive T cells *J. Immunol.*, 164 : 5590-5595. 2000.

Satoshi Nunomura, Takehito Sato, Sonoko Habu : Molecular Basis for Functional Maturation of Thymocytes : Increase in c-fos Translation with Positive

Selection. *J. Immunol.*, 164 : 5590-5595. 2000.

Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Rumi Takato, Satoshi Hachimura, Takehito Sato, Akio Ametani, Ypshihiro Kumagai, Sonoko Habu, Shuichi Kaminogawa Primary response of naitive CD4+T cells to amino acid-substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns : Th1 and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. *FEBS Letters* 465 : 28-33, 2000.

Katsuto Hozumi, Ryo Ohtsuka, Daisuke Suzuki, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito, Takashi Nishimura, Matthias Merckenschlager and Sonoko Habu : Establishment of efficient teaggregation culture system for gene taransfection into imamtire t cells by retroviral vectors. *Immunol. Lett.* 71 : 61-66, 2000.