

「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

本年度は各研究グループにおいて以下のような研究成果を得た。

1) リンパ球の初期発生に必須なサイトカイン共通受容体 γ c鎖を介する細胞内シグナル伝達に関わると考えられる機能分子 (STAM1、STAM2、AMSH) に関して、それらの各遺伝子の欠損マウスを作出した。その結果、それら単独欠損マウスでは免疫不全はみられなかったが、STAM1/2ダブル欠損マウスは胎仔死となることが分かった。他方、TNFファミリー分子の一つであるOX40リガンド (OX40L) の欠損マウスを作出し、同マウスが抗原提示機能不全を呈し、免疫不全になることを明らかにした。2) 成体型の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、成体の造血組織である骨髄に移行すると考えられている。マウス胎仔の造血組織のin vitro培養系を用いて、造血細胞の発生・増殖・分化・移行のプロセスに関与するサイトカイン、細胞内シグナル伝達分子、転写因子などの機能を解析した。3) 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。また、造血幹細胞遺伝子治療のための選択的増幅遺伝子の開発、ならびに、X連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) やX連鎖慢性肉芽腫症の免疫不全マウスを用いた遺伝子治療モデル実験を行った。4) T細胞分化に不可欠なT細胞抗原レセプター (TCR) の α/β 鎖遺伝子座のエンハンサーは、各鎖特異的でなく分化段階特異的に活性化されること、およびallelic exclusionは β 鎖遺伝子座のエンハンサーに依存しないことを明らかにした。また、T細胞の選択的分化は、c-fos遺伝子の転写レベルでなく翻訳レベルで決定され、そのc-Fos発現にはAML-1が関与することを明らかにした。

2. 研究実施内容

1) X連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) の原因遺伝子であるサイトカイン共通受容体 γ c鎖に会合するJak3キナーゼの基質分子として同定単離したSTAM1、STAM2、Hgs/Hrsについて、in vitroならびにin vivoでの機能解析を行った。その結

果、これらSTAMsは同一ファミリー分子であり、共にSH3領域やITAM領域を含むチロシンクラスター領域、さらにN末側にNPF (Asn-Pro-Phe) モチーフを有していた。ITAM領域を介してJak2やJak3 (チロシンキナーゼ) と会合し、NPFを介してEps15 (clathrin-coated pitsのcomponent) と会合した。STAM1とSTAM2はいずれもJak3やJak2のJH7領域に会合し、それらの会合は競合的であることが分かった。STAM1欠損マウスならびにSTAM2欠損マウスを作出したところ、これらマウスでは γ c鎖や β c鎖を介するシグナル伝達の異常はみられず、且つ、リンパ球の発生にも異常はみられなかった。従って、これらSTAM欠損マウスでは、STAM1とSTAM2が互いに代償作用を行っている可能性が考えられる。尚、STAM1とSTAM2のダブル欠損マウスは胎生致死であることも分かった。

2) TNFファミリー分子の1つであるOX40Lのノックアウトマウスを作出したところ、OX40L-KOマウスは樹状細胞の抗原提示機能が障害され、免疫不全を呈していることが分かった。また、抗OX40L単クローン抗体をマウスに投与することによって、アロ抗原やKLH抗原に対する細胞性免疫および液性免疫のいずれも抑制され、さらに、コラーゲン誘発関節炎やアレルギー性脳炎の発症も抑制された。

3) 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、それらの遺伝子欠損は成体型造血が起こらず胎生致死となる。これら変異マウス胎仔のAGM培養系では血管内皮様細胞が出現するが、血球は産生されないことから、これらの遺伝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。他方、オンコスタチンM (OSM) がヘマンジオブラストに作用する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誘導性遺伝子を分離し、その機能を調べた。こうして得られた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。また、我々はmonoclonal抗体を使ってヘマンジオブラストを分離し、ヘマンジオブラストから長期の血球再構築能をもつ造血幹細胞が出現することを示した。胎生肝細胞の培養系を確立し、OSMが肝細胞の分化を促進することを示した。また、胎生肝細胞が血球産生を支持する結果を得ているが、血球がOSMを産生することにより、肝臓の分化を誘導している可能性を示した。

4) アデノ随伴ウイルス (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。また、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を開発し、その有用性について、サル及びマウスを用いた動物実験での検討を行っている。さらに、X連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) モデルマウスを用いて、遺伝子治療実験を行った。その結果、T細胞・B細胞・NK細胞が著明に増加した。また、X連鎖慢性肉芽腫症 (XCGD)

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。 5) T細胞の初期分化を決定するTCR-ab遺伝子が分化段階特異的に再構成および発現する機構を、各鎖遺伝子座のエンハンサーに焦点をあてて解析した。この目的のために、TCR-b遺伝子座のエンハンサー (E b) をa遺伝子座のEaと置換したマウス (Ea/aマウス) を作製した。その結果、(1)Eaはb遺伝子の再構成発現を誘導できる。しかし、本来活性化ステージであるDP細胞に比べ、DN細胞では弱かった。また、b鎖遺伝子のallelic exclusionはEbに特異的ではなく、Eaでも誘導された。他方、DP胸腺細胞が正の選択分化を受ける前後の細胞について、その潜在能の違いを再凝集同調培養法によって解析した。その結果、(1)選択前でDPではc-fos mRNAの発現とその上流のMAPキナーゼ活性の亢進は認められるが、c-Fosの翻訳は抑制されていた。(2)選択後細胞では、刺激に対するc-Fosタンパク発現能が獲得され、その発現にはAML1が関与していることを、そのdominant negative マウスを利用して明らかにした。(3)選択後細胞では、mRNAのcap構造に結合して翻訳効率を促進する転写開始因子eIF-4Eの発現が増強したが、逆にeIF-4Eに結合して翻訳制御的に機能する4E-BP発現は低下していた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

- 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
- Yaegashi, N., Niinuma, T., Chisaka, H., Uehara, S., Moffatt, S., Tada, K., Iwabuchi, M., Matsunaga, Y., Nakayama, M., Yutani, C., Osamura, Y., Hirayama, E., Okamura, K., Sugamura, K. and Yajima, A.: Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J. Infection*, 39, 68-76 (1999).
- 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 interacellular signal transduction mediated by cytokines. *J. Biol.Chem.*, 274, 19129-19135, 1999.
- Yamada, A., Kubo, K., Takeshita, T., Harashima, T., Kawano, N., Mine, K., Sagawa, K., Sugamura, K. and Itoh, K.: Molecular cloning of a glycosyl phosphatidylinositol-anchored molecule CDw108. *J. Immunol.*, 162, 4094-4100, 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, 1999.
- Mukouyama Ys, Chiba N, Hara T, Okada H, Ito Y, Kanamaru R, Miyajima A, Satake M,

- Watanabe T. (2000) The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev Biol* 220:27-36.
- Kamiya A., T. Kinoshita, Y. Ito, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through gp130. *EMBO J* 18, 2127-2136.
 - Kinoshita T., T. Sekiguchi, M.J Xu, Y. Ito, A. Kamiya, K. Tsuji, T. Nakahata, and A. Miyajima (1999) Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 96; 7265-7270.
 - Hara T., Nakano Y., Tanaka M., Tamura K., Sekiguchi T., Minehata K., Copeland N.G., Jenkins N.A., Okabe M., Kogo H., Mukouyama Y., and Miyajima A. (1999) Identification of podocalyxin-like protein 1 as a novel cell surface marker for hemangioblasts in the murine aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 11, 567-578.
 - Nakayama K., T. Hara, M. Hibi, T. Hirano and A. Miyajima (1999) The novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. *J. Biol.Chem.* 274, 24766-24772.
 - Tanaka M., T. Hara, N.G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and A. Miyajima (1999) Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor b subunit. *Blood*. 93: 804-815.
 - Chida D, O. Miura, A. Yoshimura, and A. Miyajima. (1999) Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells: functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated gene expression. *Blood*. 93:1567-1578.
 - Miyajima A., T. Kinoshita, and T. Hara. (1999) Role of the common b subunit of the IL-3, IL-5 and GM-CSF receptors. *IL-5: From Molecule to Drug Target for Asthma*.(Ed. C. Sanderson)Marcel Dekker, Inc. New York, p225-239.
 - Miyajima A., Y. Itoh, and T. Kinoshita (1999) Cytokine signaling for proliferation, survival, and death in hematopoietic cells. *Int. J. Hematol* 69, 137-146.
 - Kitajima K, M. Kojima, K. Nakajima, S. Kondo, T. Hara, A. Miyajima, and T. Takeuchi. (1999) Definitive but not primitive hematopoiesis is impaired in jumonji. *Blood*. 93: 87-95.
 - Mukouyama Y., N. Chiba, M. Mucenski, M. Satake, A. Miyajima, T. Hara and T. Watanabe. (1999) c-Myb induces the generation of hematopoietic cells during the cultivation of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Current Biol.* 9, 833-836.

- Ogasawara, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Kanegae, Y., Saito, I., Monahan, J., and Ozawa, K.: Highly-regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre-loxP switching system. *J. Gen. Virol.* 80: 2477-2480, 1999.
- Xu, R., Kume, A., Matsuda, K.M., Ueda, Y., Kodaira, H., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kato, I., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. *J. Gene Med.* 1: 236-244, 1999.
- Kume, A., Ito, K., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Mano, H., and Ozawa, K.: A G-CSF receptor-gyrase B fusion gene: a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 9-12, 1999.
- Ogasawara, Y., Hanazono, Y., Kodaira, H., Urabe, M., Mano, H., Kakizuka, A., Kume, A., and Ozawa, K.: Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Ther. Mol. Biol.* 3: 293-300, 1999.
- Matsuda, K.M., Kume, A., Ueda, Y., Urabe, M., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther.* 6: 1038-1044, 1999.
- Ogasawara, Y., Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Colosi, P., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Efficient production of adeno-associated virus vectors using split-type helper plasmids. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 476-483, 1999.
- Urabe, M., Hasumi, Y., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, J., Tobita, K., and Ozawa, K.: Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J. Virol.* 73: 2682-2693, 1999.
- Ozawa, K., Fan, D., Ogawa, M., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., and Nakano, I.: Strategies for gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Biogenic Amines* 15: 21-37, 1999.
- Ise, W., Totsuka, M., Takato, R., Hachimura, S., Sato, T., Ametani, A., Kumagai, Y., Habu, S., Kaminogawa, S.: Primary response of naive CD4⁺ T cells to amino acid-Substite 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
- Hozumi, K., Ohtsuka, R., Suzuki, D., Ando, K., Ito, M., Nishimura, T., Merckenschlager, M. and Habu, S.: Establishment of efficient reaggregation culture sysytem for gene Tranfection into immature T cells by retroviral vectors. *Immunol. Lett.* 71:61-66,2000

- Haneda, K., Sano, K., Tamura, G., Shiota, H., Ohkawara, Y., Sato, T., Habu, S. and Shirato, K.: Transforming growth factor- β secreted from CD4⁺T cells ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation: A novel high-dose tolerance in the trachea. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*21:268-274,1999
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sano, M. and Ohta, A.: Distinct role of antigen-specific T helper type 1(Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J.Exp.Med.*190(5):617-628,1999
- Yahata, T., Abe, N., Yahata, C., Ohmi, Y., Ohta, A., Iwakabe, K., Habu, S., Yagita, H., Kitamura, H., Matsuki, N., Nakui, M., Sato, T. and Nishimura, T.: The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 29(3):727-732,1999
- Sato, T., Numomura, A., Sato, C., Hozumi, K., Kumagai, Y., Nishimura, T., Mak, T. W., Kishimura, K. and Habu, S.: CD45 can act as a negative regulator for the transition from early to late CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Int. Immunol.*,11:89-97,1999