

博士論文

RCAS/TVA システムの造血研究への応用

田島 陽子

RCAS/TVA システムの造血研究への応用

東京大学大学院 医学系研究科

病因・病理専攻

指導教員 中内 啓光

申請者 田島 陽子

目次

略語一覧	... 3
要旨	... 5
序論	... 6
方法と材料	... 21
結果	
1. TVA モノクローナル抗体の作製	... 54
2. ウイルスの作製	... 58
3. 造血幹細胞特異的遺伝子の選択	... 65
4. TVA ノックイン ES 細胞の作製	... 73
5. TVA ノックインマウスの作製	... 78
6. TVA+Neo ^r ノックインマウスの作製と生体内遺伝子導入	... 85
考察	... 92
引用文献	... 107
図	... 120
謝辞	... 158

略語一覽

HSCs	hematopoietic stem cells
ESCs	embryonic stem cells
iPSCs	induced pluripotent stem cells
HPPL	hepatic progenitor cells proliferating on laminin
EBs	embryo bodies
RCAS	Replication-Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor.
ASLV	avian sarcoma leukosis virus
TVA	tumor virus A
envA	envelope A
LTR	long terminal repeat
K7	Cytokeratin 7
K18	Cytokeratin 18
BM	bone marrow
PB	peripheral blood

SCF	stem cell factor
TPO	thrombopoietin
GFP	green fluorescent protein
IRES	internal ribosomal entry site
FACS	fluorescence-activated cell sorter
AGM	aorta-gonad-mesonephros
IVF	in vitro fertilization
B6	C57BL/6
Lin	lineage
IRES	internal ribosomal entry site
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole
PE	phycoerythrin

要旨

造血幹細胞は個体の生涯にわたり全血液細胞系譜を供給する細胞であるが、定常状態での動態はほとんど明らかになっていない。本研究では RCAS/TVA システムを応用し、造血幹細胞における新規生体内遺伝子導入法を確立することを目的とした。RCAS/TVA システムはトリレトロウイルス(RCAS) 特異的な受容体(TVA) を特定の組織に発現させることで、組織特異的な生体内遺伝子導入を行う方法である。本論文ではシステムの構築に必要なツールの作製と、それらを用いた生体内遺伝子導入実験の結果を記述する。本システムの完成により、定常状態にある造血幹細胞の動態の解明、および血液供給システムの解明に繋がると考えられる。

序論

0. 幹細胞とは

幹細胞とは、自己と同じ能力を持った細胞を生み出す能力（自己複製能）と、自身とは別の能力を持った細胞を生み出す能力（多分化能）を持った細胞として定義される。幹細胞の概念が初めて提唱されたのは、1961年、Till と McCulloch が放射線照射したマウスに骨髄細胞を移植することによって、造血幹細胞の存在が示唆されたことに始まる(Till and Mc, 1961)。近年、幹細胞に関する研究は急速に広まり、これまでに造血幹細胞以外にも様々な臓器で幹細胞の存在が証明されてきた(Barker et al., 2007; Brinster and Zimmermann, 1994)。

幹細胞は大きく分けて胚性幹細胞と体性幹細胞の2種類に分けることができる。胚性幹細胞とは、ES細胞に代表されるように、発生初期の胚から分離し、培養によって得られた細胞であり、身体を構成するすべての細胞に分化する能力を持つ(Martin, 1981)。また、複数の転写因子を人為的に活性化させることによって誘導される人工多能性幹細胞（iPS細胞）もその能力は胚性幹細胞と同等と

捉えられる(Takahashi and Yamanaka, 2006)。これら胚性幹細胞の特徴としては、いずれも生体外の培養系で得られる細胞であり、幹細胞の能力を維持することで半永久的に増殖させることが可能である点にある。その為、胚性幹細胞は細胞療法や臓器再生などの臨床的なソースとして非常に有用であると考えられ、胚性幹細胞から培養皿上で目的の細胞や組織へ分化誘導するといった研究が精力的に進められている(Hayashi et al., 2012; Hayashi et al., 2011; Hubner et al., 2003; Nishimura et al., 2013)。

一方で体性幹細胞は、成体の組織に備わっている幹細胞であり、造血幹細胞をはじめ、精子幹細胞、小腸幹細胞、神経幹細胞などがある。体性幹細胞の特性としては、自己複製性能を持ちつつも、分化能力が胚性幹細胞に比べて特定の系譜に限られていることである。例えば造血幹細胞は血液細胞、神経幹細胞は神経細胞へ分化する能力に限局されている。これらの体性幹細胞の存在によって、私たちの身体の多くの臓器は長期にわたって恒常性を維持し、正常な生命活動が可能になると考えられる。これら体性幹細胞の性状や動態を明らかにすることは、生物の個体の成り立ちを理解する上で非常に重要な課題である。また体性幹細胞研究における知見は、胚性幹細胞を用いた体細胞分化誘導系にお

いても有用である。これらの知見によって、より発生過程に近い経路を通過する誘導系の確立に繋がり、医学的にも重要な意義を持つと考えられる。

本論文では、体性幹細胞の代表例である造血幹細胞を対象に、この研究分野が抱える解析手法の問題点に取り組み、新たな解析手法を構築した。この新規手法を用いることで、造血幹細胞分野をはじめとした幹細胞研究分野のさらなる進展が望まれる。

1. 造血幹細胞

造血幹細胞は体性幹細胞の中でも代表的な細胞である。幹細胞研究の歴史は最も古く、他の幹細胞に共通する基本概念を多く提唱してきた(Cheshier et al., 1999; Ema et al., 2006; Sudo et al., 2000; Yamazaki et al., 2006)。造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持ち、末梢血中の全血液細胞を個体の生涯にわたって供給し続ける能力を持つ細胞として定義される。造血幹細胞のこのような能力や医療への有用性は、古くから臨床で行われている骨髄移植によって実証されてきた。実験的にも、造血幹細胞の能力を評価するには、骨髄移植法を用いた

クローナルな解析が最も強力な解析手法である。

骨髄移植法では、致死量の放射線を照射したマウスに細胞を移植し、そのマウスの個体内で生存に必要な全血液細胞系譜を長期的に供給する能力（長期骨髄再構築能）を指標に造血幹細胞の自己複製能と多分化能が評価される(Ema et al., 2006)。この際、評価される造血幹細胞の長期骨髄再構築能は、移植した細胞の骨髄へのホーミング能力、続いて骨髄内での自己複製能力、そして血液分化細胞を生み出し、末梢血中に供給する能力の統合的な表現型であると考えられる。この長期骨髄再構築能を指標に、多数の細胞表面抗原に対する抗体を用いて、造血幹細胞が濃縮される分画が検討されてきた(Forsberg et al., 2006; Kiel et al., 2005; Osawa et al., 1996)。現在でも、様々な細胞表面抗原の組み合わせによって造血幹細胞分画を濃縮する試みはつづいているが、現在、長期骨髄再構築能をもつ造血幹細胞を濃縮する細胞分画法の一つとして CD34 陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性、Lineage marker 陰性 (CD34^{-mid}KSL) の組み合わせがよく用いられている。

造血幹細胞の能力は生体内の骨髄微小環境（ニッチ）における外的因子と、造血幹細胞内に発現する遺伝子によって制御されている(Morrison and Scadden,

2014; Zhang and Lodish, 2008)。これら外的、および内的因子の機能を解析する際にも骨髄移植法は利用される。例えば、Stem Cell Factor (SCF)や Thrombopoietin (TPO)は骨髄微小環境中で造血幹細胞の自己複製を制御する極めて重要な液性因子である(Alexander et al., 1996; Qian et al., 2007; Sharma et al., 2007)。生体外に取り出した造血幹細胞を培養する際、これらのサイトカインの存在は、長期的骨髄再構築能を持った細胞を維持するのに必要であることが、骨髄移植法を用いて証明されている(Ema et al., 2000)。このように、生体外培養系に外的要因を組み合わせ、それらが造血幹細胞に与える影響を骨髄移植によって評価することができる。造血幹細胞の自己複製能や多分化能に関与する遺伝子(内的因子)の機能を評価する際にも同様で、生体外に取り出した造血幹細胞分画に、ウイルス等を用いて目的遺伝子を過剰発現させたのちに、この細胞集団を比較対象とする野生型マウスの造血幹細胞と合わせて骨髄移植する(競合的骨髄再構築能アッセイ)ことによって、目的遺伝子の造血幹細胞の長期的骨髄再構築能への影響を評価することが可能である(Ema et al., 2006)。また、目的遺伝子に対する遺伝子改変マウスから造血幹細胞を分取し、同様の方法で骨髄移植することによって、目的遺伝子の機能損失、あるいは変異遺伝子について評価すること

もできる。

このように、これまでの造血幹細胞の同定とその制御機構に関しての多くの知見は骨髄移植法を通して得られてきたものであるといえる。

一方で、その他多くの臓器の幹細胞は、幹細胞の標識と細胞系譜追跡実験によって証明されてきた。すなわち、固形臓器中に存在する体性幹細胞を遺伝学的手法によりクローナルに標識すると、時間経過とともにその幹細胞を始点として標識を持った子孫細胞（分化細胞）が広がっていく様子が観察できる (Furuyama et al., 2011; Takeo et al., 2013)。例えば、小腸においては、腸陰窩（クリプト）の底部に *Lgr5* 陽性の細胞が存在する。*Cre/loxP* システムを用いた遺伝学的細胞系譜追跡実験によって、成体マウスにおいて任意の時期に薬剤によってクローナルに *Lgr5* 陽性細胞を *LacZ* で標識した際、時間経過とともに *Lgr5* 陽性細胞を起点にクリプト底部から絨毛上部の分化細胞へと標識を持つ細胞が広がっていき（分化能）、これが標識後からマウスの生涯にわたって維持される（自己複製能）様子が観察されたことから、陰窩に存在する *Lgr5* 陽性細胞が小腸上皮における幹細胞であることが証明された (Barker et al., 2007)。

造血幹細胞とその他固形臓器の幹細胞を比較すると、その機能・能力の評価方法には大きな違いがある。固形臓器の幹細胞が個体内で標識され、その後の挙動が観察されるのに対し、造血幹細胞における骨髄移植法では、一度細胞を生体外に取り出し、前処置を施した個体に移植する必要がある。すなわち、生体外分取による細胞の性質変化、前処置による骨髄微小環境（ニッチ）への障害、移植後の骨髄内における強い造血ストレスなどにさらされると考えられ、その為、骨髄移植法による幹細胞評価は、細胞にとって極めて特殊な、非生理的条件下での解析であるとも捉えられる(Wilke et al., 2015)。実際、骨髄移植後の幹細胞は移植後1ヶ月で個体の生存に必要な全血液細胞系譜を供給するようになるが、正常個体においては、幹細胞が細胞周期に入るのは数ヶ月に一度であることがわかっている(Cheshier et al., 1999; Sudo et al., 2000; Takano et al., 2004)。また近年、小腸では放射線照射などの障害を与えた時に、正常状態とは異なる細胞が幹細胞性を獲得し、組織再構築に寄与することも報告されている(Metcalf et al., 2014; van Es et al., 2012)。その他の幹細胞においても、障害時と正常状態における幹細胞性の相違は否定できず、特に骨髄移植法という強力な解析手法の上で確立されてきた造血幹細胞分野においては、正常状態における幹細胞の動

態はほとんど明らかになっていない。

この様な課題を解決するためには、正常個体内で造血幹細胞を標識し、その動態を評価する新たな解析手法が必要であると考えられる。

2. 生体内細胞標識法

近年、生体内における細胞系譜追跡には Cre-loxP システムを用いた、遺伝学的細胞標識法が多く使われている(Nagy, 2000)。この系は、Cre リコンビナーゼによって認識される二つの loxP サイトの間に、転写を止めるストップ配列 (polyA 付加配列など) があり、loxP 配列の下流に GFP や LacZ などレポーター遺伝子を搭載したカセットを用いる。代表例としては Rosa-lsl-LacZ システムで、Cre リコンビナーゼの活性化とともに二つの loxP 配列の間のストップ配列が除去されることで LacZ 遺伝子が活性化するというものである(Soriano, 1999)。これまでに作製されている様々な Cre あるいは Cre-ER ドライバーマウスと掛け合わせることで、任意の組織あるいは任意の時期に目的の細胞とその娘細胞を遺伝

学的にラベルする手法として使用されている。このシステムを使用することで多くの固形臓器の幹細胞システムが証明されてきた(Barker et al., 2007; Fafilek et al., 2013; Furuyama et al., 2011)。また、レポーター遺伝子以外にも、デザイン次第で様々な遺伝子を発現することができる。このように Cre-loxP システムは特定の遺伝子に着目した場合、非常に有用な系であるが、一方で、発現させたい遺伝子を変える際には新たなマウスの作製を伴い、多くの労力と時間を要する。この点が、Cre-loxP システムのスクリーニング系としての汎用性における問題点として挙げられる。

こうした問題点を解決しうるシステムとして、RCAS/TVA システムが新たに注目されてきている(von Werder et al., 2012)。RCAS (replication-competent avian sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with splice acceptor)とはトリ白血病レトロウイルス由来のウイルスベクターであり、ここから産生された RCAS ウイルスは、トリ細胞が発現する TVA (tumor virus A) 膜タンパク質受容体を特異的に認識し、感染する。哺乳類細胞は *Tva* 遺伝子を持たないために、通常であれば RCAS ウイルスが感染することはないが、人為的に *Tva* 遺伝子を導入した哺乳類細胞においては、TVA タンパク質を介して RCAS ウイルスが感染するようにな

る(Bates et al., 1993; Young et al., 1993) (図 1)。特定の細胞あるいは臓器特異的プロモーター下で *Tva* 遺伝子を発現するマウスを作製したのちに、任意の遺伝子を搭載した RCAS ウイルスをマウスに投与すれば、RCAS ウイルスはマウス個体内で TVA を発現している細胞のみに感染し、搭載した遺伝子が導入される(Orsulic, 2002)。これまでに、皮膚、膵臓、肝臓や脳神経といった様々な臓器でこの RCAS/TVA システムが導入され、生体内における遺伝子導入をおこなった例が報告されてきている(Bu et al., 2011; Holland et al., 1998; Lewis et al., 2005; Seidler et al., 2008)。

RCAS/TVA システムの大きな特性としては、ウイルスベクターに搭載さえできれば、原理的にいかなる遺伝子(および miRNA や shRNA)も導入が可能であることである。上述のように、現在、生理的な条件下での遺伝学的な細胞系譜追跡手法としては Cre/loxP システムが広く利用されているが、RCAS/TVA システムの特性を利用すれば、1 ラインの TVA マウスに対して、生理的条件下での標的細胞の標識や細胞系譜追跡、生体内での分子機能評価などの解析を容易に行うことができ、より応用の幅が広い、柔軟な解析手法であると考えられる(Bromberg-White et al., 2004; Petropoulos et al., 1992; Seidler et al., 2008)。この系を

造血幹細胞に応用することができれば、放射線や薬剤等の処置無しに、より正常に近い条件下で生体内の造血幹細胞に遺伝子導入ができ、解析の幅が広がるとともに、これまでの骨髄移植による動態解析では得られなかった知見が得られる可能性が考えられる。このような特性に着目し、本研究では、造血幹細胞研究における RCAS/TVA システムの導入を試みた (図 2)。

3. 造血幹細胞における RCAS/TVA システムのデザイン

造血幹細胞研究において一連の RCAS/TVA システムを確立するにあたり、①造血幹細胞特異的 TVA 発現マウス、②TVA 発現細胞を認識する TVA 抗体、さらに、③幹細胞に特異的に感染可能なウイルスが必要であると考えられた。この3つのツールの作製を開始するにあたり、重要であると考えられた点は以下の事柄である。

① 造血幹細胞特異的 TVA マウスの作製

骨髄移植法などにおいては、複数の細胞表面抗原の組み合わせによって造血幹細胞を分取する方法が一般的であるが、RCAS/TVA システムにおいては、TVA 遺伝子を発現させる為に単一の遺伝子のプロモーターを用いる必要がある。その為、造血幹細胞特異的 TVA マウスを作製するにあたって、造血幹細胞に特異的に高く発現する遺伝子を選択する必要がある。

これまで、骨髄中から造血幹細胞のみを識別・分離可能な分子マーカを探る試みは数多く行われてきたが(Forsberg et al., 2006; Kiel et al., 2005; Osawa et al., 1996)、有用な単一の分子マーカを同定することは非常に困難を伴った。これは、造血幹細胞が骨髄中の 0.004% という極めて低頻度の細胞であることや、固定臓器のように明確な存在位置がなく、流動的であること、さらに、細胞の分子生物学的な解析と幹細胞としての機能評価（骨髄移植による長期的骨髄再構築能評価）を同時に行うことができなかつたことなどが理由として挙げられる。

しかし近年、造血幹細胞の機能を制御する分子として転写因子である Evi-1 が報告され、Evi-1 遺伝子座に蛍光タンパク質 EGFP を挿入したノックインマウス

が作製された(Kataoka et al., 2011)。この Evi-1-EGFP ノックインマウスの骨髄中 EGFP 陽性細胞は造血幹細胞分画に高度に濃縮されることが報告された。このことから、骨髄中の造血幹細胞を識別するのに Evi-1 は一つの有用な候補分子であると考えられる。一方で、Evi-1 レポーターにおいても造血幹細胞と前駆細胞を明確に切り分けることはできないことや、Evi-1 の機能消失や過剰発現によって造血幹細胞の能力が変化することなどから、レポーターとして用いる分子としては若干の不安要素が残る。そこで本研究では、より造血幹細胞のレポーターとして適した分子の探索も行い、同定した遺伝子および Evi-1 遺伝子を造血幹細胞特異的遺伝子として、それぞれの TVA ノックインマウスの作製を行った。

②TVA 発現細胞を認識する TVA 抗体の作製

TVA は膜タンパク質であるため、造血幹細胞特異的に TVA を発現するマウスが作製できれば、フローサイトメーターを用いて TVA 抗体を用いて容易に造血幹細胞を分取することや、免疫染色法を用いて生体内における造血幹細胞の存在位置（ニッチ）の解析も可能になると考えられる。これらの汎用性から、抗

TVA 抗体は本研究を展開するにあたり非常に有用であると考えられたが、現在市販されている TVA 抗体は存在しない。反応性及び特異性に優れた TVA モノクローナル抗体を作製することができれば、解析手法の応用性も大きく広がると考え、本研究では抗 TVA モノクローナル抗体の作製も行うこととした。

③幹細胞に感染可能な RCAS ウイルスの作製

RCAS はレトロウイルスベクターであるが、レトロウイルスは核膜が消失する細胞分裂期にのみ遺伝子が導入可能であるということが知られている。その一方で、正常状態の成体骨髄に存在する造血幹細胞は大部分が静止期に存在することが知られている(Yamazaki et al., 2006)。その為、これら静止期に存在する造血幹細胞に効率的に遺伝子導入を行う為には、細胞周期に依存せず遺伝子導入可能なウイルスを用いることが有用であると考えられた。本研究では、核膜の状態に依存せず遺伝子を核内に導入できるレンチウイルスに着目し、RCAS ウイルスの感染特異性を担っているエンベロープ(envA)を用いて、シュードタイプ型レンチウイルスを作製することを試みた。

本稿では、以上のような課題に取り組み、造血細胞を標的とした新規生体内
遺伝子導入システムを構築した。造血幹細胞研究における本システムの有用性
および展望について論ずる。

材料と方法

細胞の培養

BW5147, BW-TVA, BW-TVA-Flag, 293T, 293gp, SP2/0 Myeloma 細胞はいずれも

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) /10% Fetal

Bovine Serum (FBS) /1% Penicillin, streptomycin, Glutamin (PSG), 37°C 10% CO₂

incubator で培養した。293gp 細胞に関しては 2µg/ml puromycin (Sigma), 0.3mg/ml

G418 (GIBCO) 1µg/ml Tetracycline を添加して培養し、ウイルス産生誘導時にこれ

ら薬剤を抜いた培地に置き換えて培養した。DF-1 細胞株は

DMEM/10%FBS/1%PSG, 39°C 5% CO₂ incubator で培養した。Hybridoma 株は

Serum Free Medium に FBS を必要に応じて 0-10%の組成で添加して培養した。

本研究で用いた ES 細胞 (129Sv×C57BL/6 系細胞株 (K3 株), C57BL/6 系細胞株

(mB1.2 株))に関しては、ゼラチンコートした dish あるいは E12.5 のマウス胎児

から調整したマウス胚性線維芽細胞(MEF)をフィーダー細胞として撒いた dish

を用いて、E14tg2a +2i medium : Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)

(SIGMA) / 15% FBS/ 1% Non-essential amino acid (Invitrogen) / 100mM Sodium Pyruvate (Invitrogen) / 110uM 2-mercaptoethanol (Invitrogen) / 1%PSG / 500U/ml ESGRO (LIF) (CHEMICON) / 3 μ M CHIR99021 (Wako) / 1 μ M PD0325901 (Wako)、37°C 5%CO₂ incubator で培養した。

TVA のクローニング

TVA は pCMPP TVA800 vector からクローニングした。Flag の付加に関しては、PCR mutagenesis 法を用いた。すなわち、一度 TVA800 を pBSSK にクローニングし、Flag 配列を持つ互いに相補なプライマーで pBSSK-TVA を PCR 後、DpnI 処理によって鋳型プラスミドを切断し、産物を精製して大腸菌にトランスフォームした。シーケンスで配列を確認後、pGCDNsam ベクターに載せ替え、ウイルス作製に用いた。

レトロウイルス(GPG)の作製 (TVA, K7, K18)

本研究では pGCDNsam ベクターを強制発現用のレトロウイルスベクターとして使用した。マルチクローニングサイトに目的遺伝子(TVA, Krt7, Krt18)の ORF をクローニングし、その後のトランスフェクションへ使用した。ウイルス産生においては 293 gpg システムを使用した。具体的には、293gp パッケージング細胞に上述の pGCDNsam ベクターと VSVG プラスミドをコトランスフェクションすることで得られた培養上清中のウイルスを、293gpg 細胞へ感染させた後、フローサイトメーターを用いて陽性細胞をソートすることでウイルス産生能をもつ 293gpg 細胞を取得した。その後、G418, Puromycin, Tetracyclin を培養上清から除くことでウイルスを産生させた。ウイルスを含んだ培養上清は使用前に濃縮し、タイターを計測した後に実験へ使用した。

TVA 安定発現マウス血液細胞株の樹立

TVA 抗体作製時の免疫原、および抗体のスクリーニングを行う為に、マウス T 細胞リンパ腫由来細胞株 BW5147 を用いて、TVA 安定発現細胞株を樹立した。TVA あるいは TVA-Flag をクローニングした pGCDNsam IRES/EGFP ベクター由

来レトロウイルスを感染させ、ベクターに搭載した EGFP の蛍光を発する細胞をフローサイトメトリーによって単一細胞ごとに分離し、BW-TVA IRES/EGFP, BW-TVA-Flag IRES/EGFP 細胞株を樹立した。TVA の発現は、後に作製した TVA 抗体とフローサイトメトリーによって、均一に膜上に発現していることを用いて確認した。また、RCAS ウイルスのタイターを計測する為に、同様の方法で GFP 遺伝子を抜いた pGCDN_{Sam} ベクターを用いて BW-TVA, BW-TVA-Flag 細胞株を樹立した。

ハイブリドーマ株の樹立とスクリーニング

BW-TVA 細胞株 5×10^7 細胞を PBS250 μ l に懸濁し、同量の Titer Max Gold (Funakoshi) と混和したものを Balb/c マウスの両足 footpad に投与した。翌日 CpG-A DNA (HCB) (0.4mM) 100 μ l を腹腔内投与し、10 日後に末梢血を採取し、血清中に TVA 抗体が存在するかを BW-TVA 細胞株を用いて計測した。翌日 BW-TVA 細胞株 1×10^6 細胞を再び免疫した。二度目の免疫から三日後にリンパ節および脾臓を採取し、スライドグラスですりつぶした後 1×10^8 細胞を SP2/O

myeloma細胞 2×10^7 細胞と合わせ、血清を除いた後に Polyethylenglycol (PEG1500) (SIGMA) を混ぜて融合反応を行った。Medium E (Stem Cell Technology) に懸濁し一晩 37°C で培養した後、細胞を Medium D (Stem Cell Technology) に懸濁し 37°C で 20 日間培養した。Medium D は Hypoxanthine、aminopterin、thymidine を含む半固形培地であり、この培養液で培養することによってリンパ球とミエローマ細胞の融合細胞のみを選択した (HAT selection)。コロニーを形成したハイブリドーマを 96 well plate に単離し、Medium E で 3 日間培養した後、培養上清を回収した。この培養上清を BW-TVA 細胞株と混ぜて 4°C 30 分 incubate し、続いて Anti-Mouse IgG Alexa647 を二次抗体として 4°C 30 分反応させ、フローサイトメトリーによって TVA モノクローナル抗体をスクリーニングした。

抗体のアイソタイプチェック

また、ハイブリドーマ上清中の抗体を一次抗体として BW-TVA 細胞を 4°C 30 分染色し、その後、蛍光色素付きの各 isotype (IgG1a, 2a, 2b, 3, IgM) に対する抗体を 2 次抗体として反応させたのち、フローサイトメトリーによって解析し、TVA

抗体の isotype を検定した。

抗体の精製、ビオチン化

抗体の精製には無血清で培養したハイブリドーマの培養上清を用いた。IgG 抗体に関しては Protein G を用いたプロトコールによって精製し、IgM 抗体に関しては硫酸沈殿法によって精製した。精製した抗体はいずれも SDS-PAGE 分析によって精製の純度を確認した。

TVA 抗体 (4A11: IgM) は One-step Antibody Biotinylation Kit (MACS Miltenyi Biotec) を用いてマニュアルに従いビオチン化した。反応後の抗体は BW-TVA 細胞と混ぜて 4°C 30 分 incubate 後、2 次抗体として蛍光標識した Streptavidin と 4°C 30 分反応させ、フローサイトメトリーで解析してビオチン標識を確認した。

RCAS ウイルスの作製

RCAS/GFP ベクターを 10cm dish にまいた DF-1 細胞にリン酸カルシウム法によ

ってトランスフェクションした。トランスフェクションから一週間ですべての細胞が GFP 陽性になったことを確認し、十日目から4週間目まで細胞の培養上清から RCAS ウイルスを回収した。細胞は3日ごとに1:3~1:5の量で継代し、ウイルスの回収に関しては、細胞をコンフルエントにしてから24時間後の培養上清を回収した。40,000xg 2-3時間超遠心を行い、1/250量のa-MEMで再懸濁し-80°Cで保存した。

なお、蛍光レポーターを搭載したウイルスのタイトレーションには、蛍光遺伝子を除いて樹立した BW-TVA および BW-TVA-Flag 細胞株を用いた。これらの樹立は、pGCDNsam-TVA、pGCDNsam-TVA-Flag ベクターからレトロウイルスを作製し、BW5147細胞に感染させた後、フローサイトメーターによってシングルセルを分離してクローン化した。ウイルスのタイターは BW-TVA および BW-TVA-Flag を用いて、フローサイトメトリーでウイルス感染三日後の GFP 陽性率を測定することにより計測した。

RCAS-envA および VSVG 融合 RCAS-envA コンストラクション

envA は RCAS ベクター上で2つに分断されて存在しており、ウイルス産生時にスプライシングをうけて転写産物として完成する。この2つの断片のうち、N末端側の短い配列をプライマー上を含め、C末端側を PCR によって RCAS ベクターから増幅し、強制発現ベクターにクローニングした (pCMV-envA)。

同時に、HIV ウイルス由来 envelope VSVG、および VSVG と envA の融合遺伝子を pCMV 強制発現ベクターにクローニングした。融合遺伝子に関しては、(1)

Vs-envA: VSVG シグナルペプチドと envA 細胞外ドメインおよび細胞内ドメイン、(2) envA-Vtm: envA シグナルペプチドおよび細胞外ドメインと VSVG 細胞内ドメイン、(3) Vs-envA-Vtm: VSVG シグナルペプチドと envA 細胞外ドメイン、VSVG 細胞内ドメインを融合した3種類を設計した。

シュードタイプ型レンチウイルスの作製

poly-L-Lysine コートした 10cm dish に 293T 細胞を播種し、サブコンフルエントの段階で envA あるいは改変型 envA ベクターを CS-CDF-CG-PRE および pMDL-gag/pol ベクターとともに Poly Ethylene Imine 法によって遺伝子導入した。

12-16 時間後に 10uM Forskolin (SIGMA)を添加した培地に交換し、培地交換から 48 時間後に上清を回収した。40,000xg 2-3 時間超遠心を行い、1/250 量のa-MEM で再懸濁し-80°Cで保存した。

濃縮したウイルスは BW-TVA および BW-TVA-Flag の培地中に添加し、三日後の GFP 陽性率をフローサイトメトリーによって解析することでタイターを計測した。

血液細胞系譜の分取

血液分化細胞に関しては、マウス骨髄、脾臓、胸腺を採取し、シングルセルに懸濁した。骨髄細胞は Gr-1 Mac1 Ter119 B220、脾臓細胞は Thy1.2 Nk1.1 B220、胸腺細胞は CD3 CD4 CD8 でそれぞれ染色し、フローサイトメトリーによって各血液細胞系譜を分取した。

造血幹細胞(CD34⁺KSL)および前駆細胞(CD34⁺KSL)、分化マーカー陰性(Lineage⁻)

分画に関しては、骨髄細胞を c-Kit APC 抗体で染色したのち Anti-APC Micro

Beads で反応させ、MACS LS column を用いて c-Kit 陽性細胞を濃縮した。その

細胞濃縮液を分化細胞マーカーおよび CD34、c-Kit、Sca-1 で染色し、フローサイ
トメーターを用いてそれぞれの分画を分取した。本研究では、
CD34-Kit+Sca1+Lineage-(CD34-KSL)細胞を造血幹細胞濃縮画分として用いた。

RNA 抽出

血液細胞系譜の RNA 抽出に関しては RNeasy Micro Kit (QIAGEN Germantown,
MD)を用いて、マニュアルに従い行った。EB 細胞の RNA 抽出に関しては、TRIzol
RNA Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて、マニュアルに従い行っ
た。

RT-PCR、qPCR

各分画から抽出した RNA を High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
(Thermo Fisher Scientific)によって cDNA を合成し、希釈したものを半定量的
RT-PCR および定量的 PCR の鋳型として用いた。定量的 PCR には Taq-Man 試薬

(PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて *Gapdh* 発現量を定量し、各遺伝子の発現量に関しては Universal Probe Library (Roche) を用いて定量した。

競合的骨髄再構築能アッセイ

96 well plate (U-base) (TPP)を Recombinant Human Fibronectin Fragment

(RetroNectin) でコートし、1well につき 200 μ l の a-MEM/ 1%FBS/ 1% PSG/

2-Mercaptoethanol (2-ME) / 50 μ g/ml Stem Cell Factor (SCF)/ 50 μ g/ml

Thrombopoietin (TPO) 培地をまいた。Ly5.1 野生型マウスの骨髄から CD34⁺KSL

細胞をフローサイトメトリーによって 50 細胞/well 分取し、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ で 24

時間培養した後、RetroNectin および Protamin を添加し、MOI 600 の量の各レト

ロウイルスを添加した。ウイルス添加から 12 時間後に培養上清を取り除き、

S-clone / 1%BSA/ 1% PSG/ 2-ME/ 50 μ g/ml SCF/ 50 μ g/ml TPO 培地に交換した。さ

らに 12 時間後に再び培地交換を行い、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ で一週間培養した。培養後

の細胞をプールし、1well あたり 1x10⁶細胞の Ly5.1/Ly5.2 (F1) マウスから分取し

た骨髄細胞と混ぜ、1well 分ずつ致死量の放射線(4.75Gy x2)を照射した Ly5.2 マ

ウスの尾静脈に移植した。移植後 4 週間ごとに末梢血を採取し、CD45.1 CD45.2 Gr-1 Mac1 CD3 B220 を染色し、各分画におけるテスト細胞(Ly5.1)のキメリズムをフローサイトメトリーによって解析した。さらに、移植後 16 週目に骨髄を分取し、骨髄細胞のキメリズムを解析するとともに 2 次移植を行った。骨髄細胞の解析に関しては CD45.1 CD45.2 および CD34 c-Kit Sca-1 Lineage Marker を染色してテスト細胞のキメリズムをフローサイトメトリーによって解析した。2 次移植に関しては 1 次移植のマウスから分取した骨髄細胞を 5×10^6 細胞ずつ致死量の放射線を照射した Ly5.2 マウスの尾静脈に移植した。2 次移植の解析に関しても、1 次移植同様、4 週間ごとに末梢血の解析と 16 週間後に骨髄の解析を行った。

In droplet immunostaining

湿潤箱中で 24 穴 Micro Slide Glass (Matsunami TF2404) を、r/t 1~2 時間 10% poly-L-Lysin コートした後、蒸留水で洗浄し風乾させた。1well あたり 20 μ l の S-clone をのせ、フローサイトメトリーによって細胞を直接ソートした。分取してから 30-60 分後に 4% PFA を 20 μ l/well 添加し、r/t 10min 固定した。上清をピ

ペットマンでゆっくり除去し、PBS で2回洗浄後、Max Block Blocking (Active Motif) によって r/t 30min ブロッキングした。その後上清を除去し、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を添加して 4°C 一晩 incubate した。翌日 PBS で3回洗浄し、希釈した二次抗体を添加して r/t 30-60 分 incubate 後、PBS で6-7回洗浄した。DAPI (1 μ g/ml) を添加して r/t 1-5 分おいた後に PBS で1回洗浄し、Fluorescent Mounting Medium (Dako) でマウントし、スライドグラスを載せたのち周りをマニキュアで固め、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

ノックインベクターの設計

pBI-lx Neo-DTA ベクターをノックインベクターとして使用した。Krt7-EGFP 融合および Krt18-tdTomato 融合用ノックインベクターに関しては、各遺伝子の終止コドン部分に5つのグリシン(GAA)が連続した Flexible linker 配列に蛍光タンパク質遺伝子を繋げ、Krt7 と EGFP、Krt18 と tdTomato が融合タンパク質として発現するように設計した。Krt7-TVA ノックインベクターに関しては、Krt7 遺伝子の終止コドン部分に、T2A ペプチド配列、Flag を付加した tv-a 遺伝子が挿入

されるように設計した。Evi1-TVA ノックインベクターに関しては、2011年に報告された Evi-1-EGFP ノックインマウスのデザインを参考に、Evi-1 遺伝子の exon9 直下に exon10-15 の終止コドン手前までの cDNA、T2A ペプチド配列、Flag を付加した tv-a 遺伝子が挿入されるように設計した。各ノックインベクターにはターゲットとするノックイン箇所から上下合わせて約 10kb の配列を相同配列としてクローニングした。

ターゲティング

ノックインベクターを遺伝子カセットの外側で一箇所のみ切断するような酵素で処理し、リニアにしたものを EtOH 沈殿法によって精製した。20 μ g のベクターを 1×10^6 の ES 細胞と混ぜ、エレクトロポレーション法によって遺伝子導入した。遺伝子導入二日後から培地に 300 μ g/ml の G418 を添加し、薬剤セレクションを行った。5~7 日目に綺麗な球状のコロニーを形成したものをピックアップし、48well plate に継代した。

ゲノム抽出と PCR スクリーニング

ES 細胞の一部を Lif(-)の培地に継代し、48 well plate の 1 well/clone がコンフルエントになった段階で細胞を回収した。ゲノム抽出用の Lysis buffer (1M Tris-HCl/ 5M NaCl/ 0.5MEDTA/ 10% SDS/ H₂O) 750 μ l に懸濁し、Proteinase K () 15 μ l を添加して 55°C 30 分 incubate した。RNaseA (10mg/ml)を 10 μ l 添加して 37°C 30 分 incubate し、フェノール/クロロホルムを 750 μ l 加えてよく混和し、15.000xg r/t 30 分遠心した。上精を回収し、再び同量のフェノール/クロロホルムを添加してよく混和し、15.000xg r/t 30 分遠心した。上精を回収し、EtOH 法によってゲノムを精製した。ペレットは 50~100 μ l の H₂O に溶解し、1 μ l を PCR の鋳型として用いた。PCR スクリーニングは HS Ex-Taq (Takara) を用いて、98°C 10 秒 68°C 1 分の 2step プロトコールを 30cycles 行った。

Embryoid body (EB) formation

ES 細胞を Trypsin/EDTA (0.25%) (Thermo Fisher Scientific)によって回収し、EB 分

化用培地(組成) に懸濁後、Hanging drop 法によって EB を形成させた。誘導後 6 日目の EB を Trypsin/EDTA (0.25%)によって崩し、フローサイトメトリーによって解析、あるいはゼラチンコートした dish に播種してウイルス感染実験および免疫染色に用いた。

免疫染色 (CK7, CK18, GFP, Tomato)

EB および HPPL の免疫染色に関しては dish に貼り付けた細胞を -30°C の 100% MeOH で 10 分固定後、PBS で 2 回洗浄し、0.1% Tween20/PBS で r/t 20 分おいた。その後 PBS で 5 分 3 回洗浄し、1%BSA/ 0.1% Tween20/ PBS で r/t 30 分ブロッキングした。ブロッキング剤で希釈した一次抗体を r/t 30 分あるいは 4°C 一晚反応させ、PBS で 5 分 3 回洗浄し、希釈した二次抗体を r/t 1 時間遮光して反応させた。PBS で 5 分 3 回洗浄し、DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1-5 分染色し、PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

キメラマウスの各組織の免疫染色に関しては、摘出した臓器を

4%Palaformaldehyde で 2 晩固定後、10%Glucose 溶液に 2 晩、30%Glucose 溶液に

数日浸透させたものをパラフィン包埋し、切片を作製した。パラフィン切片はキシレンに5分3回浸して脱パラフィンしたのち、100%、90%、80%、70%のEtOHに5分ずつ浸した。PBSで洗浄後、pH9.0 Tris-HClに浸してボイルすることで抗原の賦活化処理を行い、その後の免疫染色に用いた。

マウス作製

MEFフィーダー細胞上を用いてE14tg2a+2i培地で培養した遺伝子組み換えES細胞をTrypsin-EDTA(0.25%)処理によって回収し、同様のmediumに懸濁してゼラチンコートしたdishに播種して37°C 5%CO₂ 30分incubateすることでadhesion selectionを行った。回収したES細胞をICRマウス胚盤胞胚内に注入したのち、偽妊娠したICRメスマウスの子宮に移植した。得られた産仔のうち、mB1.2(C57BL/6系細胞株)マウス由来の黒い毛色あるいはK3(129Sv×C57BL/6系細胞株)マウス由来の茶色い毛色を多く持つ毛色キメラマウス(雄)をB6野生型マウスと掛け合わせた。産まれた産仔が離乳後、尻尾の先端3mmからゲノムを抽出し、Genotyping PCRを行ってノックインマウスの有無を確認した。

薬剤耐性遺伝子カセットの除去

K7-TVA ノックインマウスおよびEvi-1-TVA ノックインマウスと Rosa-Cre^{ER} マウスを交配し、ジェノタイピング PCR によって TVA 陽性 Cre 陽性の産仔を選別し、離乳後にタモキシフェン入りの餌を 5 日間与えて Cre の発現を誘導した。その後、野生型マウスと掛け合わせ、ジェノタイピング PCR によって薬剤耐性遺伝子カセットが除去された TVA ノックインマウスの有無を確認した。

Genotyping PCR

マウス尻尾 3mm 程を 1.5ml tube 中で 50mM NaOH 180 μ l に浸し、95 $^{\circ}$ C 15 分ボイルした。Vortex によって混和後、1M Tris-HCl (pH7.5) 20 μ l を添加して中和したのち 12,000xg 10 分遠心を行い、上清 0.5-1 μ l を PCR の鋳型として用いた。PCR スクリーニングは HS Ex-Taq (Takara) を用いて、98 $^{\circ}$ C 10 秒 68 $^{\circ}$ C 24 秒の 2step プロトコールを 35 cycles 行った。

ノックインマウスの蛍光観察

Krt7-EGFP および Krt18-tdTomato キメラマウス、また GFP ウイルスを感染させた Krt7-TVA および Evi-1-TVA ノックインマウスの骨髄解析に関しては、マウスの両足骨髄・骨盤を採取し、注射針とシリンジを用いてシングルセルにした後、CD34 c-Kit Sca-1 Lineage marker を染色し、フローサイトメトリーによって各分画における蛍光タンパク質の発現を解析した。

その他臓器の解析に関しては、マウスから脳・眼球・心臓・胸腺・肺・肝臓・胃・膵臓・脾臓・腎臓・小腸・大腸・筋肉・骨髄・皮膚・卵巣または精巣を摘出し、PBS 中で蛍光顕微鏡によって各臓器の蛍光を観察した。

TVA 抗体による染色

フローサイトメトリーによる解析に際して、BW-TVA および BW-TVA-Flag 細胞株の染色に関しては TVA 抗体で 4℃30 分 incubation 後、PBS で洗浄し 2 次抗体

として蛍光標識した Streptavidin あるいは Anti-Mouse IgG 抗体で 4°C 30 分 incubation した。骨髄細胞に関しては、シングルセルにした細胞を Fc Block (-) で r/t 20 分 incubate 後、TVA 抗体を添加し 4°C 30 分 incubation した。その後、PBS で洗浄し蛍光標識した Streptavidin を CD34 c-Kit Sca-1 Lineage Marker 抗体とともに 4°C 90 分 incubation した。

胆管系細胞の分取、Hepatic progenitor cells proliferating on laminin (HPPL) の培養

Krt7-TVA ノックインマウスから肝臓を摘出し、酵素処理によってシングルセルにした細胞を EpCAM で染色し、フローサイトメトリーによって EpCAM 陽性の胆管系細胞を分取した。laminin コートした dish 上で長期間培養し、Hepatic progenitor cells proliferating on laminin (HPPL) を樹立した。

in vitro ウイルス感染 (EB, HSC, 胆管)

誘導 6 日目の EB をゼラチンコートした dish に貼り付けて 24 時間培養後、RCAS-GFP レトロウイルスを添加した。2-3 日後に PBS で洗浄後、免疫染色あるいは Trypsin-EDTA (0.25%) によって回収し、シングルセルにした後フローサイトメトリーによって GFP 陽性細胞を解析した。HPPL 細胞に関しては、培養上清中に RCAS-GFP レトロウイルスを添加し、2-3 日後に PBS で洗浄後、免疫染色を行った。

造血幹細胞に関しては、Krt7-TVA あるいは Evi1-TVA ノックインマウスから分取した CD34-KSL を、RetroNectin (Takara Cloneteck) コートした 96 well plate (U-base) (TPP) 50 細胞/well フローサイトメトリーによって分取し、200 μ l の a-MEM/ 1%FBS/ 1% PSG/ 2-Mercaptoethanol (2-ME) / 50 μ g/ml Stem Cell Factor (SCF)/ 50 μ g/ml Thrombopoietin (TPO) 培地で 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 24 時間培養した。翌日 RetroNectin および Protamin を添加し、MOI 10-1000 の量の RCAS-GFP レトロウイルスあるいは envA-GFP レンチウイルスを添加した。ウイルス添加から 12 時間後に培養上清を取り除き、S-clone / 1%BSA/ 1% PSG/ 2-ME/ 50 μ g/ml SCF/ 50 μ g/ml TPO 培地に交換した。さらに 12 時間後に再び培地交換を行い、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ で一週間培養した。培養後の細胞を 1well ずつ回収し、GFP 陽性細胞をフロ

ーサイトメトリーによって解析した。なお、当研究室でウイルスによる遺伝子導入を行う際、造血幹細胞に対しては通常 MOI 600 を基準としてウイルスを添加するため、これを指標に本実験では MOI 10~1000 のウイルスを添加した。

in vivo ウイルス感染（新生児、成体）

新生児期におけるウイルス感染に関しては、生後 1-3 日目の Krt7-TVA および Evi-1-TVA ノックインマウス新生児の腹腔内に、 5×10^7 の RCAS-GFP 産生 DF-1 細胞、あるいは 60~200 μ l の RCAS-GFP レトロウイルス(約 4×10^7 virus/ml)、Vs-envA レンチウイルス(約 4×10^7 virus/ml)を 1~2 回投与した。離乳後に尻尾からゲノムを抽出して Genotyping を行うとともに末梢血中を採取し、CD45 Gr-1 Mac1 CD3 B220 を染色し、各分画の GFP 陽性細胞を解析した。その後、継時的に末梢血を採取して各分画の GFP 陽性細胞頻度の推移を観測した。

成体期におけるウイルス感染に関しては、8 週齢以降の Krt7-TVA および Evi-1-TVA ノックインマウス尾静脈に 60-200 μ l の RCAS-GFP レトロウイルス(約 4×10^7 virus/ml)あるいは Vs-envA レンチウイルス(約 4×10^7 virus/ml)を 1 回あるいは

24時間ごとに3回投与した。投与後3日目の骨髄を採取し、CD34 c-Kit Sca-1

Lineage marker で染色し、フローサイトメトリーによって GFP 陽性細胞を解析し

た。また、ウイルス投与後、継時的に末梢血を採取して CD45 Gr-1 Mac1 CD3 B220

を染色し、各分画の GFP 陽性細胞を解析した。

Primer

RT-PCR

Gene name		Sequence (5' - 3')	Tm	Product size (bp)
Krt1	Fwd	catgaccaaagttgagcttc	56	349
	Rvs	ttcagatcgaagtctctgga	56	
Krt2	Fwd	gatcaaaaccctcaacaaca	56	309
	Rvs	tggtcacaaaatcattctcc	56	
Krt4	Fwd	cgctacagtcagagctaaa	56	343
	Rvs	tcttctagcaatgtcctca	56	
Krt5	Fwd	ctgacacatctgtggctctt	56	347
	Rvs	ctctgtcagcttgtttctgg	56	

krt6a	Fwd	gatcaagaccctcaacaaca	56	308
	Rvs	tcacgaattcattctctgct	56	
krt7	Fwd	gatcaagaccctcaacaaca	56	317
	Rvs	ccttctcagcaacacaac	56	
krt8	Fwd	tcatcaagaaggatgtggac	56	342
	Rvs	cggagatctctgtctttgtg	56	
krt9	Fwd	agtccaagatgaccagatt	56	330
	Rvs	cccggtaagtctcaattct	56	
krt10	Fwd	agctggagggtaaaatcaag	56	312
	Rvs	tcagactttcgatctgcatt	56	
krt12	Fwd	gtactgtgccaaactgtctc	56	299
	Rvs	tcactatctctgcacgact	56	
krt13	Fwd	cgaagaggagatgaaggaat	56	330
	Rvs	tctgtctctgccaaactgact	56	
krt14	Fwd	aagcatccctggagaataac	56	292
	Rvs	gaggtcacatctctggatga	56	

krt15	Fwd	gattgagttgcagtctcagc	56	347
	Rvs	cctccacactgatatggaaa	56	
krt16	Fwd	agaagaacctgaggaggag	56	330
	Rvs	ctaggctgttctccaaggat	56	
krt17	Fwd	agtggttatggaggcaact	56	332
	Rvs	tgctctgtctcaaacttgg	56	
krt18	Fwd	aagaggaagtccaaggtctg	56	288
	Rvs	tcatggagtccaagtcaatc	56	
krt19	Fwd	agattgagagcctgaaggag	56	328
	Rvs	gactgcagctcaatctcaag	56	
krt20	Fwd	ctgcagaggacttcagattg	56	332
	Rvs	gaactgttctttggcctctt	56	
krt23	Fwd	tgaggcaggaatacagatta	56	291
	Rvs	tcagctcttcttcgtagtgg	56	
krt42	Fwd	gaagatccgtgagtgtgaca	56	340
	Rvs	attcattcctcctcatggt	56	

Primer set (2)

krt7	Fwd	atcaaggatgctcatgctaa	56	324
	Rvs	tgtggtcttgatggaatagg	56	
krt8	Fwd	gacatcgagatcaccaccta	56	305
	Rvs	attcacttggacacgacatc	56	
krt18	Fwd	tgagaacaggagactggaga	56	367
	Rvs	cagaccttggacttcctctt	56	

Primer set (3)

krt7	Fwd	aagaaccagcgtgccaagtt	62	404
	Rvs	ccctgcgggtagtagatgt	61	
krt8	Fwd	ctcaaaggccagagggcat	62	456
	Rvs	ggacaccagcttcccatctc	62	
krt18	Fwd	actccgcaaggtggtagatg	60	342
	Rvs	tccgtgagtgtggtctcagc	62	

Primer set (4)

krt7	Fwd	ctttgaggctcagattgctg	58.75	821
------	-----	----------------------	-------	-----

	Rvs	agatattcacaggtcccatc	55.51	
krt8	Fwd	ctcaaaggccagagggcat	62	619
	Rvs	cctaaggttgccagaggat	60.46	
krt18	Fwd	tggggccactacttcaagat	59.55	426
	Rvs	cagttcctcgcggttcttct	61.84	
Gapdh	Fwd	ctcaccaccatggagaaggc	64	238
	Rvs	ggcatggactgtggatcatgag		
Bra1	Fwd	cctctgcactgaaaataccc	54.9	242
	Rvs	agtctcctcagtaattgcgt	55.2	
c-Jun	Fwd	gaagatgggtgtggtgttct	54.9	260
	Rvs	aaatatgcacaagcaaaggt	55	
Irs-1	Fwd	gaggatcgtcaatagcgtaa	53.4	645
	Rvs	aacaaggatcatcccctagt	54.4	
eNos	Fwd	aactggaccatctctaccg	55	238
	Rvs	agaattctctgcacggttt	54.9	

Darpp-32

	Fwd	aggaggacgaagaagaagac	55.1	315
	Rvs	ggtgaaagacaggtacaaa	55.1	
c-Abl	Fwd	ctggcctacaacaagtctc	55	276
	Rvs	gatactggattcctggaacat	55	

Estrogen Receptor a

	Fwd	tggagattctgatgattggt	54	261
	Rvs	ctccagagacttcaagtg	55	

Tyrosine Hydroxylase

	Fwd	tgaagccaaaatccaccact	57	319
	Rvs	ttggaaggcaatctctgcaa	57	

P44/p42 MAP Kinase (valiant1&2)

	Fwd	cccaggaaagcattaccttg	55.2	266
	Rvs	aatactgctccaggtatggg	55.4	

Amyloid beta A4

	Fwd	aagatggatgcagaattcgg	54.7	308
--	-----	----------------------	------	-----

	Rvs	gcttagttctgcatttgctc	53.9	
GluR2 (valiant1&2)				
	Fwd	cagtgcatttcgggtaggga	58.7	284
	Rvs	gtgctccttgaggtcaggt	58.6	
Msk1	Fwd	ccaagaagcgattgggatgt	57.1	286
	Rvs	ggatctatgacagctgcgtt	56.5	
Src (valiant2)				
	Fwd	ggagtggactttggcaaga	56.4	213
	Rvs	cgggaggtgatgtagaaacc	56.5	
Met	Fwd	tatcctccaagccgcgatg	58.5	478
	Rvs	agtgaggtgtgctgttcgag	58.7	
Creb	Fwd	tgctgtaacagaagctgaaa	54.8	206
	Rvs	ggacttgggagactggata	55	
Vegfr2	Fwd	ctcctccacctcaaagtctc	53.8	281
	Rvs	gatacttcacaggattcgg	54	
Stat5a (valiant1)				

	Fwd	actatgatccaggcaaagc	55.3	279
	Rvs	catacaacacttgcatctgg	55.1	
p53	Fwd	tcatcacactggaagactcc	56	288
	Rvs	actctaaggcctcattcagc	56.2	

Q-PCR

Gene name		Sequence (5' - 3')	Probe#	Product size (bp)
krt7	Fwd	tctttgaggctcagattgctg	74	142
	Rvs	cgtcggttgatctcctcttc		
krt8	Fwd	accagcggctactcagga	12	129
	Rvs	ggtgcggtgaaagtgtt		
krt18	Fwd	gaagaaccgaggaactg	91	73
	Rvs	cttggtggtgacaactgtgg		
Evi-1	Fwd	cacagaaagtccaaatcacagg	58	93
	Rvs	cacgttgaggaactgtgg		

Knock-in ESCs Genotyping PCR

Primer name	Sequence (5' - 3')	Product size (bp)
K7-EGFP knock-in ES		
Krt7-5_P1	gaagcctgctgattcctgac	3034
EGFP P2 R	aagtcgtgctgcttcatgtg	
K18-tdTomato knock-in ES		
Krt18-3_P4 R	atcaacggaacaaaggatcg	2806
Neo pro P3	ggggaacttctgactaggg	
K7-TVA knock-in ES		
K7tva P1F	ggcataggcatagggagtaga	2925
K7tva P1R	caccagctcacagcaaaaga	
K7tva P2F	caggtcctcatgcttgtca3922	
K7tva P2R	gggacagctatgactgggagt	
K7tva P3F	gaagcctgctgattcctgac	3507
K7tva P3R	gggcatatgttgccaaactc	
Evi-1-TVA knock-in ES		
Evi-5arm P1F	aagcacagccacgaagagat	9997

Evi-5arm P1R	tcaccagctcacagcaaaag	
Evi-3arm P2F	ctcgtcctgcagttcattca	4764
Evi-3arm P2R	attcagggattttgctgcac	

Knock-in Mice Genotyping PCR

Primer name	Sequence (5' - 3')	Product size (bp)
K7-EGFP knock-in mouse		
K7-EGFP typ 1	gttcctgggtaggggagt	WT : 372bp KI : 233bp
K7-EGFP typ 2R	cgctctgttcctgtgagta	
K7-EGFP typ 3R	cttgetcaccattccacctc	
K18-tdTomato knock-in mouse		
K18-tomato typ 1F	agggaacccttctccacat	WT : 352bp KI : 223bp
K18-tomato typ 2R	cttgetcaccattccacctc	
K18-tomato typ 3R	ggccagtcgtgtgaaactct	
K7-TVA knock-in mouse		
K7-EGFP typ 1	gttcctgggtaggggagt	WT : 372bp KI : 238bp
K7-EGFP typ 2R	cgctctgttcctgtgagta	

K7-TVA typ 2R	tcaccgcatgtagcagact		
Evi1-TVA knock-in mouse			
Evi1-TVA typ 1	aaggggaaagagcgctacac	WT : 238bp	KI : 373bp
Evi1-TVA typ 2R	cgatgaaattgcggatctct		
Evi1-TVA typ 3R	gttcaatcccagcaaccac		
Cre			
Cre Fwd	ccatctgccaccagccag		
Cre Rvs	tcgccatcttcagcagg		
Neomycine resistant gene			
lp-Neo Fwd	ctccccctgaacctgaaac	Neo(-) 290bp	
lp-Neo Rvs	gatgggtaccgagcgaac		

結果

造血細胞を標的とした新規生体内遺伝子導入システムを構築にあたり、まず、標的細胞を認識するための TVA モノクローナル抗体の作製を行った。続いて標的の細胞に特異的な遺伝子導入が可能なウイルスの作製、さらに、造血幹細胞特異的な TVA 発現マウスの作製を行った。

1. TVA モノクローナル抗体の作製

造血幹細胞における RCAS/TVA システムの構築に当たって、TVA 受容体の特異的に認識する抗体は非常に有用である。TVA は膜タンパク質であるため、造血幹細胞特異的に TVA を発現させたマウスからは、TVA 抗体を用いて容易に生体外へ造血幹細胞を分取することが可能である。また、骨髓切片を TVA 抗体で免疫染色することによって、造血幹細胞の存在する微小環境の解析も可能である。しかし、本研究を開始した時点で、TVA モノクローナル抗体は市販されておらず、報告もなかったため、フローサイトメトリー解析および免疫染色に使

用可能な抗 TVA モノクローナル抗体の作製を行った。

a. TVA 安定発現マウス血液細胞株の樹立

TVA には 2 種類のアイソフォーム : TVA800, TVA950 が報告されている(Bates et al., 1993; Young et al., 1993) (図 3A)。これらは共通の細胞外ドメインを有し、細胞内ドメインにのみ違いがある。TVA800 は GPI アンカータンパク質であるのに対し、TVA950 は膜型貫通ドメインを持つ。これら 2 つの受容体は、RCAS ウイルスの感染様式、感染速度に違いがあることが報告されているが、どちらも RCAS ウイルスの感染特異性に必要十分なドメインをもつ(Gray et al., 2011; Narayan et al., 2003)。これまで他臓器で導入されている RCAS/TVA システムは TVA800 のアイソフォームを利用していることから、本研究においても TVA800 をクローニングした。

TVA は本来トリ細胞が特異的に持つ遺伝子である。そのため、抗体を作製するにあたり、マウス血液細胞株に TVA を発現させた安定発現細胞株を樹立し、それを免疫原としてマウスに投与すれば、マウス体内で TVA のみに対する抗体

が産生されると考えられた。TVA 遺伝子を搭載したレトロウイルスを、293gp 細胞を用いて作製し、マウスリンパ腫由来血液細胞株 BW5147 に感染させ、TVA 安定発現マウス血液細胞株 (BW-TVA) のクローンを樹立した (図 3B)。

また、作製した細胞株で TVA が膜タンパク質として発現していることを確認するために、TVA に Flag を付加したコンストラクトを持つ細胞株 (BW-TVA-Flag) も同様の方法でクローンを樹立した。Flag の挿入部位に関しては、TVA タンパク質の N 末端にシグナルペプチド下流に切断部位が報告されていたため、切断部位から 5 アミノ酸 (切断酵素の足場として) 残した部位に、Flag および切断部位に続く 5 アミノ酸を挿入し、シグナルペプチドが切断されて膜上に出た TVA の N 末端側に Flag が発現するように設計した (図 3A)。

樹立した細胞株における TVA 遺伝子の発現は、Flag 抗体を用いた western blot によってタンパク質の発現を確認し、フローサイトメトリー解析によって細胞の膜上に出ていることを確認した (図 3B, 3C)。

b. ハイブリドーマ株の作製とスクリーニング

抗体作製の免疫原として BW-TVA 細胞を用い、7~10 週齢の Balb/c メスマウスを免疫し、コントロールである BW-I/E 細胞および TVA 発現細胞である BW-I/E TVA 細胞を用いて末梢血中に TVA 抗体が産生されていることを確認した (図 3C)。この免疫マウスのリンパ節および脾臓から調整した細胞をミエローマ細胞と融合させることによってハイブリドーマ株を樹立した。400 個のハイブリドーマコロニーの培養上清中の抗体を、BW-I/E および BW-I/E TVA 細胞を用いてフローサイトメーターによってスクリーニングした (図 4A)。BW-TVA 細胞にのみ反応するものが TVA に対するモノクローナル抗体であると考えられる。その結果、7 ラインのハイブリドーマ株培養上清中に BW-TVA 細胞特異的に反応する抗体が産生されていることが確認された (図 4B)。そのため、これらの 7 ラインを抗 TVA モノクローナル抗体産生株として樹立した。

c. 抗体の品質評価

抗 TVA モノクローナル抗体産生株の培養上清を用いてトリ細胞 DF-1 および QT-6 を染色しフローサイトメトリーで解析すると、ごく一部の細胞が染色され

た。これは、DF-1 および QT-6 が TVA の発現量に関してヘテロな集団であることが考えられる。また、ハイブリドーマ上清を一次抗体として PFA 固定した QT-6 細胞を免疫染色すると、2 ラインのハイブリドーマで染色されることがわかった (図 4C)。これらの TVA モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株のうち、フローサイトメトリーおよび免疫染色でも使用可能であったハイブリドーマ株 4A11 を大量に精製し、その後の解析に用いるためにビオチンによって標識した。また、7 ラインのハイブリドーマ株が産生する抗体のアイソタイプを、各アイソタイプに対する抗体を 2 次抗体として反応させることによって解析した (図 4B)。4A11 は IgM 抗体であったため、より扱いやすい IgG2a, IgG2b 抗体を産生するクローンからも抗体を精製し、その後の解析に用いた (図 4D)。また、BW-TVA 細胞を用いて抗体量のタイトレーションを行い、その後のフローサイトメトリー解析に用いる抗体量を決定した。

2. ウイルスの作製

骨髄移植後の造血幹細胞とは異なり、正常状態の生体内にある造血幹細胞は、そのほとんどが静止期にあることが報告されている。個体中のごく少数の、静止期にある幹細胞に到達し、感染することのできる高いタイターと感染特異性を持ったウイルスの作製が必要である。

RCAS ウイルスはもともとレトロウイルスであるため、感染の成立には細胞分裂に伴う核膜の消失が必要とされる。細胞の分裂が盛んな胎生期あるいは新生児期においてはレトロウイルスによる感染も期待できるが、成体期における幹細胞への感染に関しては困難が予想された。そこで本研究では、TVA 受容体への感染特異性を担う RCAS ウイルスのエンベロープタンパク質 envA に着目した。HIV 由来のレンチウイルスベクターと envA を組み合わせてウイルスを作製させることで、TVA 受容体への感染特異性をもったシュードタイプ型レンチウイルス (envA レンチウイルス) の作製を試みた。

a. RCAS ウイルスの作製

RCAS ウイルスベクターにはウイルスの産生に必要なすべての構成因子 (gag,

pol, env: envA) が含まれている。このベクターをトリ繊維芽細胞 DF-1 にトランスフェクションすると、ベクターが導入された細胞では RCAS ウイルスが産生され、細胞外に放出される。放出されたウイルスは隣の細胞に感染し、これが繰り返され、トランスフェクションから 1 週間後には培養皿中のすべての DF-1 細胞が感染細胞となる (図 5A)。EGFP 蛍光レポーターを搭載した RCAS ウイルスベクターを導入した DF-1 細胞の培養上清からウイルスを濃縮し、ヒト 293T 細胞、マウス NIH3T3 細胞、ニワトリ DF-1 細胞およびウズラ QT-6 細胞それぞれの培養液中に添加した。その結果、DF-1 細胞および QT-6 細胞にのみ GFP 陽性細胞が検出されたことから、トリ細胞に感染特異性を持つ RCAS/ GFP ウイルスの作製に成功したと考えられた (図 5B)。また、RCAS/GFP ウイルスを BW5147、BW-TVA、BW-TVA Flag 細胞株の培養液中に添加すると、BW-TVA、BW-TVA Flag でのみ GFP の蛍光が認められたため、これらのウイルスが TVA を特異的に認識し、感染していることが示唆された (図 5C)。

b. ASLV-envA ウイルスの作製

2001年、Harold Varmus のグループから、トリ白血病ウイルス(ASLV)のエンベロープ envA を用いて、HIV 由来レンチウイルスを作製したという報告がなされた(Lewis et al., 2001)。そのため、本研究においてこのウイルスが使用可能ではないかと考え、Harold Varmus のグループから ASLV-シュードタイプ型レンチウイルスベクターを頂いた。また彼らは、より高い感染効率を持つシュードタイプレンチウイルスを作る目的で、物理的により強固で、超遠心による濃縮が容易な VSVG (Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus)エンベロープの一部を ASLV-envA と融合させた改変型エンベロープ (ASLV-envA VCT) も作製していた (図 6A)。これは、ASLV-envA の transmembrane より下流を、対応する VSVG エンベロープタンパク質のものと置換したものである。報告に従い、これらのベクターを用いてレンチウイルス作製を行った (図 6B)。濃縮したウイルスを BW-TVA 細胞株を用いて感染効率を計測したところ、ASLV-envA ウイルス、ASLV-envA VCT ウイルスどちらにおいても TVA 発現細胞特異的に GFP 陽性細胞が検出された (図 6C)。このことから、TVA 発現細胞特異的に感染性を持つ ASLV-envA レンチウイルスの作製に成功したことが示唆された。しかし、RCAS/GFP ウイルスと比較すると、ASLV-envA および ASLV-envA VCT ウイルスの感

染効率は極めて低いものであった。ASLV-envA の配列は、RCAS ベクターからクローニングされたものではなく、1980年代に ASLV ウイルスからクローニングされたものを用いている。RCAS ベクターはもともと ASLV ウイルスから作製されたものであるが、RCAS ベクター内の envA と ASLV-envA の配列を比較すると、多くの箇所で見られた。このことから、この配列の違いが TVA への親和性の差異を生み、ASLV-envA ウイルスの感染能力の低さに繋がるのではないかと考えられた。

c. RCAS-envA および VSVG 融合型 RCAS-envA ウイルスの作製

本研究で用いた RCAS レトロウイルスは BW-TVA 細胞に対して高い感染効率を示すことから、RCAS ベクターから envA を強制発現ベクターにクローニングし、新たなシュードタイプ型 HIV 由来レンチウイルス (RCAS-envA レンチウイルス) の作製を試みた。クローニングした RCAS-envA を、蛍光レポーターEGFP を搭載した HIV 由来 SIN ベクター、gag/pol を搭載した強制発現ベクターとともに 293T 細胞にトランスフェクションし、培養上清からウイルスを回収した (図

7B)。BW5147 細胞および BW-TVA 細胞を用いて感染能力を調べると、TVA 発現細胞特異的に GFP 陽性細胞が検出された。しかし、予想に反して、RCAS ベクター由来の envA を用いても TVA 発現細胞への感染効率の改善はわずかであった。エンベロープとして VSVG を用いた場合、同様の protocol で高い感染効率のウイルスが産生されたことから、RCAS-envA エンベロープに関しては、ウイルスが産生される過程あるいは TVA 発現細胞への感染の過程で何らかの抑制的な要因があることが考えられた。そこで、RCAS-envA の TVA 認識領域のみをのこして、周囲の領域を VSVG に置換した改変型 RCAS-envA エンベロープを設計した(図 7A)。VSVG および RCAS-envA はどちらも N 末端のシグナル配列、中央部の細胞外ドメイン、C 末端の transmembran ドメインから構成されている。このうち、標的細胞への感染特異性を担うのは中央部分の細胞外ドメインであることが報告されている為、envA の細胞外ドメインをもった 3 種類の VSVG 融合型 RCAS-envA (Vs-envA, envA-Vtm, Vs-envA-Vtm) を作製した。

これらのベクターを用いてレンチウイルスを作製し、BW-TVA 細胞に感染させると、いずれのウイルスにおいても TVA 特異的な感染能力が認められた(図 7C)。3 種類の改変型 RCAS-envA ウイルスの感染効率を比較すると、シグナル

ペプチドのみを VSVG に置き換えた Vs-envA レンチウイルスで最も高い感染効率が認められた。興味深いことに、transmembran ドメインを VSVG に置き換えたものはどちらも BW-TVA 細胞に対する感染効率が低下したことから、transmembran ドメインが TVA 受容体の認識になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。

d. 感染効率の比較

これまでに作製した RCAS ウイルス、ASLV-envA ウイルス (ASLV-envA, ASLV-envA VCT)、RCAS-envA ウイルス (RCAS-envA, RCAS-Vs-envA) の BW-TVA 細胞に対する感染効率を比較すると、レンチウイルスの中では RCAS-Vs-envA ウイルスが最も高く、RCAS レトロウイルスに匹敵する感染効率を示すことがわかった (図 7D)。このことから、これ以降 RCAS レトロウイルスおよび Vs-envA レンチウイルスを作製し、感染実験に使用した。

3. 造血幹細胞特異的遺伝子の選択

造血幹細胞特異的な生体内遺伝子導入システムを確立するためには、TVA 遺伝子を造血幹細胞で高く発現させる必要がある。しかしながら、造血幹細胞を分取、あるいは検出するには複数の細胞表面抗原を組み合わせて染色する方法が一般的であり、本研究に着手した当初、造血幹細胞特異的な単一マーカーの報告はほとんどなかった。そこで本研究では、血液細胞系譜において造血幹細胞特異的に高く発現する遺伝子を新たに探索し、その遺伝子座に TVA 遺伝子をノックインすることで、造血幹細胞特異的 TVA 発現マウスを作製することにした。

a. 血液細胞系譜におけるケラチンファミリーの発現

造血幹細胞特異的遺伝子を探索するにあたり、本研究では、造血幹細胞の自己複製に関わる分子をスクリーニングする目的で行われたタンパク質発現アレイの結果のなかから、候補として抽出されてきた遺伝子それぞれの全血液細胞

系譜における発現解析を行った (図 8A)。その中で、中間径フィラメントを構成するサイトケラチンファミリーのひとつ、*Cytokeratin 18 (Krt18)*が血液細胞系譜の中でも特に未分化な分画に特異的な発現を示すことに着目した。サイトケラチンは 20 種類以上のメンバーからなる巨大ファミリーである。そこで、全血球系細胞においてサイトケラチンファミリーの発現を半定量的 PCR によって解析した。その結果、*Krt18* が造血幹細胞分画 ($CD34^{+mid}KSL$) および前駆細胞分画 ($CD34^{+}KSL$) に、*Cytokeratin 7 (Krt7)*が造血幹細胞分画に高く発現していることが明らかになった (図 8B)。サイトケラチンはファミリー間でいくつかの共通のドメインを有することから、複数の異なるプライマーセットを用いて半定量的 PCR を行い、また同時に定量的 PCR を行ってこの結果を確認した (図 8C)。

b. ケラチン過剰発現による造血幹細胞能力への影響

サイトケラチンファミリーはタイプ I (酸性) とタイプ II (塩基性) の 2 種類のサブファミリーに分類することができ、*Krt7* はタイプ I、*Krt18* はタイプ II に属する。タイプ I とタイプ II は細胞内でヘテロ二量体を形成してケラチンフィ

ラメントを構成して機能する(Herrmann et al., 2009)。タイプ I とタイプ II の組み合わせは細胞腫ごとに異なることが知られており、造血幹細胞において *Krt7* および *Krt18* の特異的な発現が観察されたことは非常に興味深い。ある種のがん細胞や表皮の幹細胞においては特異的な発現を示すサイトケラチンを分子マーカーとして用いている(Karantza, 2011; Michel et al., 1996)。造血幹細胞に高い発現を示す Evi-1 は、幹細胞の維持に重要な役割を持つことが報告されているが、造血幹細胞におけるサイトケラチンの機能に関しては全く明らかになっていない。

すでに *Krt7* および *Krt18* のノックアウトマウスは作製されており、どちらも正常に発生し稔性を示す(Magin et al., 1998; Sandilands et al., 2013)。*Krt7* のノックアウトマウス個体の血球系に関しては赤血球、ヘモグロビン数、ヘマトクリットおよび血小板数などに関しては異常がないことが調べられている。一方で、*Krt7* および *Krt18* のノックアウトマウスの造血幹細胞を用いた移植などは行われておらず、造血幹細胞におけるこれら遺伝子の役割は明らかになっていない。サイトケラチンファミリーのノックアウトあるいはノックダウンに関しては、他のファミリー分子による機能補償の例が知られており、実際、*Krt7* をノックアウトすると *Krt20* の発現が上昇することが報告されている。その為、造血幹細

胞におけるサイトケラチンファミリーの機能解析については、*Krt7* および *Krt18* それぞれの過剰発現による影響をみることにした。

Krt7 cDNA および *Krt18* cDNA 発現カセットを搭載したレトロウイルスを Ly5.1 マウスから分取した CD34^{-mid}KSL 細胞に感染させ、Ly5.1/Ly5.2 マウスの骨髓細胞を競合細胞として混ぜて、放射線照射を施したレシピエント(Ly5.2)マウス尾静脈に移植した。移植したマウスの末梢血中のキメリズムからサイトケラチンを過剰発現させた造血幹細胞の骨髓再構築能を解析した(図 9A. 一次移植)。

その結果、*Krt7* および *Krt18* 強制発現群において若干の末梢キメリズムの低下が認められた(図 9B)。続いてこれらレシピエントマウスから骨髓細胞を分取し、再び放射線照射を施したレシピエント:Ly5.2 マウス尾静脈に移植し(図 9A. 二次移植)、同様に移植後 1 ヶ月ごとに移植マウスの末梢血を分取し、末梢血中のキメリズムの推移を解析した。その結果、*Krt7* および *Krt18* 強制発現群においてキメリズムの大きな低下が認められた(図 9C)。このことから、*Krt7* および *Krt18* は血液細胞系譜の中では造血幹細胞分画に高い発現が認められる一方で、それらの過剰発現は、造血幹細胞の長期的骨髓再構築能に抑制的な効果を及ぼすことが示唆された。

c. CK7-EGFP, CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞の樹立

造血幹細胞を特異的に標識したマウスを作製する試みはこれまでに様々な分子で行われてきた。古くは、造血幹細胞分画において特異的に発現が確認される遺伝子座を蛍光タンパクで置換する手法を採用されてきたが、これらはその際に内在性遺伝子座を破壊してしまうストラテジーとなるため、実質的に造血幹細胞特異的遺伝子を機能的に破壊するようなアレルとなる。場合によっては造血幹細胞の機能そのものに影響を与えることも考えられる為、最近では内在性遺伝子を破壊しないストラテジーを取ることが望ましいとされている。しかしその一方で、mRNA の発現とタンパクの発現が必ずしも一致しない例も存在する。例えば IL-7 mRNA は血液細胞系譜では造血幹細胞分画に特異的に発現が認められるが、IL-7-GFP ノックインマウスの造血幹細胞を解析すると、GFP の蛍光は全く認められない。このような例はいくつか知られており、造血幹細胞において何らかの翻訳抑制による遺伝子発現制御機構があることが示唆される。本研究ではまず、造血幹細胞特異的 TVA ノックインマウスを作製するにあつ

て、タンパク質レベルで特異的な発現を示す分子を選択する必要があった。そこで、まず、in droplet 免疫染色法によって骨髓中の造血幹細胞および前駆細胞、未分化細胞、分化細胞分画を CK7 抗体、CK18 抗体によって染色した。その結果、造血幹細胞分画 (CD34^{low}KSL) の細胞質において、CK7 が特異的に染色された (図 8D)。興味深いことに、この CK7 の形状は、骨髓中で造血幹細胞の増殖や休眠状態を制御するサイトカインシグナル (Stem Cell Factor, Thrombopoietin, TGFb) によって変化することも観察された。CK18 に関しては、どの細胞分画でも染色されなかったことから、抗体による検出の問題、あるいはタンパク質として発現していない可能性が考えられた。

骨髓中の CK7 および CK18 の発現をより正確に解析するために、これらの遺伝子座に蛍光レポーターをノックインしたマウスの作製を試みた。同時に、造血幹細胞における CK7 と CK18 の動態を観察する目的で、これらサイトケラチンと蛍光レポーターを融合型として発現させることにした。まず、当研究室で作製したサイトケラチン系遺伝子を発現しているマウス肝芽細胞株 (HPPL) において、これら融合遺伝子の発現および細胞内分布を観察した。それぞれのサイトケラチン cDNA に蛍光レポーターを N 末端、C 末端に融合したコンストラ

クトを、HPPLに導入し免疫染色を行った。その結果、サイトケラチンタンパクのN末端、C末端どちらに融合した場合でも蛍光タンパク質の発現が認められ、細胞内でフィラメント状に観察された(図10A)。このことから、融合タンパクは内在性のタンパクと少なくとも同様の局在を示すことが確認された。よって、ノックインストラテジーとしてはC末端側に蛍光レポーターを標識するように設計した。具体的には、*Krt7* および *Krt18* 遺伝子の終止コドン部分に5残基のGlycine からなるリンカー配列と、それに続く蛍光レポーターをノックインし、CK7-EGFP 融合タンパク質、CK18-tdTomato 融合タンパク質がそれぞれ発現するようにノックインベクターを設計した(図10B)。それぞれのノックインベクターをB6 ES細胞にエレクトロポレーション法によって導入し、薬剤選択を行った。PCRスクリーニングおよびSouthern blotによって正確にノックインされたクローンを選択した(図10C)。

d. CK7-EGFP,CK18-tdTomato ノックイン ES細胞の品質評価

樹立したCK7-EGFP融合ES細胞およびCK18-tdTomato融合ES細胞において

蛍光レポーターとサイトケラチンの発現が一致するかを確認するために、
embryoid body (EB)形成によってサイトケラチンの発現を誘導した (図 11A)。誘
導 6 日目の EB を観察すると、EB の一部にそれぞれ EGFP および tdTomato の蛍
光が観察され、免疫染色によって CK7、CK18 とそれぞれ共局在することが確認
された (図 11B)。これらの EB における蛍光レポーター陽性分画および陰性分
画をフローサイトメトリーによって分取し、定量的 PCR によってサイトケラチ
ンの発現を解析した。その結果、CK7-EGFP および CK18-tdTomato どちらのノ
ックイン ES 細胞においても蛍光の発現とそれぞれのサイトケラチンの発現が
相関していたことから、導入した遺伝子がこれらノックイン ES 細胞で正しく発
現していることが示唆された (図 11C)。

e. キメラマウスの作製と解析

CK7-EGFP 融合 ES 細胞および CK18-tdTomato 融合 ES 細胞を ICR マウス胚盤
胞胚内に注入し、偽妊娠マウス子宮内に移植することによってキメラマウスを
作製した (図 12A)。得られたキメラマウスを野生型マウスと掛け合わせてノッ

クインマウスの作製を試みたが、どのラインの産仔からもノックインマウスは得ることができなかった。そこで、キメラマウスにおける蛍光レポーターの発現を解析すると、CK7-EGFP キメラおよび CK18-tdTomato キメラの生殖巣、特に精巣上体に強い蛍光を認めた。また、B6 マウス由来の黒い毛色が多いキメラマウスほど生殖巣の縮退が認められたことから、蛍光タンパク質とサイトケラチンの融合タンパク質が生殖巣においてなんらかの影響を及ぼしていること、これによってノックインマウス個体が得られない可能性が考えられた。

そこで、高い毛色キメラ率を示した CK7-EGFP キメラマウスの骨髄をフローサイトメトリーによって解析すると、骨髄中の EGFP 陽性細胞はそのほとんどが造血幹細胞分画 (CD34^{mid}KSL) に存在した (図 12B)。このことは、CK7 が新規造血幹細胞マーカーとして非常に有望な可能性を有しているといえる。また、CK18-tdTomato キメラの骨髄においては、tdTomato 陽性細胞は未分化な細胞集団に多く濃縮されたものの、その発現は幹細胞に限局したものではなく、より広範囲に及んでいた (図 12C)。以上の結果より、造血幹細胞特異的 TVA ノックインマウスにおいては、Krt7 遺伝子を標的として選択した。

4. TVA knock-in ES 細胞の作製

a. Krt7-TVA トランスジェニックマウス(tg)の解析

CK7-TVA ノックインマウスを作製するにあたり、Krt7 のプロモーター解析を行ってきた Francisco X. Real の研究室で、先行して Krt7-TVA トランスジェニックマウスが作製されていた (未発表)。そこで、この K7-TVA tg マウスにおいて造血幹細胞における RCAS/TVA システムが機能するかを検証した。まず、K7-TVA tg マウスの骨髓細胞を分取して半定量的 PCR によって TVA の発現を確認すると、造血幹細胞分画に強い *Tva* mRNA の発現が観察されたものの、前駆細胞分画および分化細胞分画にも弱い発現が検出された (図 13A)。続いて K7-TVA tg マウスの骨髓細胞を TVA モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリーによって解析した (図 13B)。その結果、造血幹細胞分画に TVA 陽性細胞を検出することはできなかった。このことは、造血幹細胞における *Tva* 遺伝子の発現量の低さ、あるいは TVA モノクローナル抗体の検出感度の限界な

どの可能性が考えられた。そこで、抗体での検出の有無にかかわらず、RCAS/GFP ウイルスを用いて、K7-TVA tg マウス造血幹細胞に遺伝子導入が可能であるかを検証した。まず、K7-TVA tg マウスの骨髄から造血幹細胞を分取し、サイトカインを含む培地中で一晩培養して細胞分裂を誘導したのち、RCAS/GFP ウイルスを添加した。7日後にフローサイトメトリーによって解析したところ、GFP 陽性細胞を検出することはできなかった (図 13C)。また、ウイルスを直接生体内に投与することによって、造血幹細胞への遺伝子導入が可能であるかを検証した。細胞周期が盛んに行われている新生児期の K7-TVA tg マウスに RCAS/GFP ウイルスを投与し、生育後に末梢血を分取して GFP 陽性細胞の有無を解析した (図 13D(a))。造血幹細胞に GFP 遺伝子が挿入されれば、そこから供給される子孫細胞はすべて GFP 遺伝子を受け持つ。その為、生育したマウスにおける末梢血中の GFP レポーターの推移を解析することは、造血幹細胞におけるウイルスの感染を間接的に検証することにつながると考えられる。解析の結果、*Tva* 遺伝子の有無に関わらず、どの個体でも末梢血中に GFP 陽性細胞を検出することはできなかった (図 13D (b, c))。このことから、K7-TVA tg マウスにおいては *Tva* mRNA が造血幹細胞画分で確認できるものの、TVA タンパクの

細胞膜上での発現が十分誘導されないことによって RCAS/TVA システムが機能しないのではないかと考えられた。

b. K7-TVA および Evi-1-TVA ノックイン ES 細胞の樹立

K7-EGFP ノックイン ES 細胞由来キメラマウスの骨髄解析の結果、造血幹細胞において EGFP の発現が特異的に観察されていたことから、TVA ノックインマウスにおいても同様のデザインで作製することにした。また、既存の報告にある Evi1-EGFP ノックインマウスも造血幹細胞に GFP の蛍光が観察されることが報告されている為、同様のデザインで Evi1-TVA ノックインマウスを作製することにした (図 14A)。K7 に関しては、終止コドン部分に T2A ペプチドに代り T2A 遺伝子を挿入し、これらがひとつの転写産物として発現後、T2A ペプチド部分で切断されるように設計した。Evi-1 に関しては 2011 年に報告された Evi-1-EGFP ノックインマウスのデザインを参考に、IRES-EGFP 部分を T2A-TVA に置き換えるように設計した。これらのノックインベクターを B6 ES 細胞、あるいはよりマウス作製に適していると言われる K3 (129/B6) ES 細胞に

エレクトロポレーション法によって導入した。薬剤選択後、PCR スクリーニングによって組み換えが起こったクローンを選択した (図 14B)。

c. TVA ノックイン ES 細胞の品質評価

得られた K7-TVA ノックイン ES 細胞および Evi-1-TVA ノックイン ES 細胞において RCAS/TVA システムが機能するかを、TVA 抗体および RCAS ウイルスを用いて検証した。Krt7 および Evi-1 はどちらも ES 細胞の状態では発現が認められないため、EB 形成によってこれらの遺伝子の発現を誘導し、TVA 抗体および RCAS ウイルスを用いてシステムの検証を行った (図 14C)。培養 6 日目の EB を 0.25% EDTA-Tripsin 処理によってシングルセルに崩し、TVA 抗体によって染色してフローサイトメトリーで解析した。その結果、予想に反してどのクローンにおいても TVA 発現細胞を検出することはできなかった (図 14D)。CK7-EGFP ノックイン ES 細胞から同様の方法で誘導した EB においては、高い効率で EGFP の発現が誘導されていたことを考慮すると、Krt7 の発現が誘導されていない可能性は考えにくい。その為、TVA 抗体による検出に十分な TVA の発現が誘導さ

れていない、あるいは細胞調整の間に TVA の発現が低下している可能性が考えられた。EB からシングルセルを調整する際、通常よりも強いトリプシン処理を行う必要があるが、幾つかの膜タンパク質においては、トリプシン処理によって細胞外ドメインが切断されてしまうことが知られている。この可能性を検証するために、BW-TVA 細胞にトリプシン処理を施したのちに TVA 抗体で染色し、TVA の発現にどのような影響を及ぼすかをフローサイトメトリーによって解析した。その結果、0.25% EDTA-Tripsin 処理によって TVA の発現の低下が認められた (図 14E)。溶血処理など、その他の刺激においても容易に TVA の発現低下が認められたことから、TVA は膜タンパク質として非常に'弱い'安定性を持ったタンパク質であることが示唆された。

一方で、誘導した EB の培養液中に RCAS/GFP ウイルスを添加し、3 日後に GFP 陽性細胞の有無をフローサイトメーターによって解析した。その結果、TVA ノックイン ES 細胞特異的に GFP 陽性細胞が検出された (図 14F)。このことから、K7-TVA および Evi1-TVA ノックイン ES 細胞において、RCAS/GFP ウイルスによる遺伝子導入が可能であることが示唆された。

5. TVA ノックインマウスの作製と評価

K7-TVA ノックイン ES 細胞および Evi-1-TVA ノックイン ES 細胞を ICR マウス胚盤胞胚内に注入し、偽妊娠マウス子宮内に移植することによってキメラマウスを作製した。得られたキメラマウスを野生型マウスと掛け合わせ、得られた産仔の尻尾を用いてタイピングを行った。その結果、K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスを得ることに成功した (図 15A)。得られたノックインマウスはどちらも正常に発生し、野生型マウスと同様の稔性を示した。

a. TVA ノックインマウスの骨髄解析

K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスの骨髄細胞を解析すると、細胞数、細胞表面抗原による表現系に大きな差異は認められなかった。骨髄細胞における TVA の発現を確認するために、K7-TVA ノックインマ

ウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスの骨髄細胞から血液細胞系譜を分取し、半定量的 PCR を行った。その結果、K7-TVA ノックインマウスにおいては Krt7 と *Tva* の造血幹細胞特異的な発現が確認され、また Evi1-TVA ノックインマウスにおいても、Evi1 と *Tva* の発現の相関が認められた (図 15B)。

続いてこれらマウスの骨髄細胞を TVA 抗体によって染色を試みた。その結果、予想に反して K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスどちらの骨髄においても TVA 陽性細胞を検出することはできなかった (図 15C)。

同様のデザインの EGFP ノックインマウスに関しては、K7 および Evi1 どちらも造血幹細胞における GFP の発現が認められることを考慮すると、TVA ノックインマウスにおいて TVA の発現が認められない要因としては、造血幹細胞の膜上に発現する TVA タンパク質の発現量が TVA モノクローナル抗体の検出限界以下であること、あるいは、フローサイトメーターによる解析までのサンプル調整中に TVA が切断されてしまうことなどが考えられた。造血幹細胞は正常状態では骨髄微小環境のなかで周囲の細胞に接着して存在していると考えられる。

骨髄中から造血幹細胞を取り出すには、flash out あるいは crush 操作によって細胞をシングルセルに調整する。このような操作によって細胞間接着を剥がす際

に、膜上の TVA タンパク質が切断されてしまう可能性は否定できない。

TVA の検出が細胞調整時の問題である場合、生体内へ投与したウイルスによる TVA 発現細胞への感染は成立する可能性がある。そこで続いて、作製した K7-TVA および Evi1-TVA ノックインマウスにおいて、RCAS/GFP ウイルスによる感染が成立するかを造血幹細胞およびその他臓器に関して検証した。

b. 肝細胞への *in vitro* 遺伝子導入

今回着目した *Krt7* 遺伝子はマウス胆管において強い発現を示す事が知られている。この胆管の細胞は EpCAM 陽性細胞としてフローサイトメーターで分取することができ、特殊な培養条件下で増殖することが知られている。そこで、この培養法を応用して、K7-TVA マウス肝臓から EpCAM 陽性胆管系細胞を分取し、*in vitro* で RCAS ウイルスによる遺伝子導入を試みた (図 16A)。免疫染色によって、EpCAM 陽性胆管系細胞は CK7 を高く発現していることが確認されたため、TVA も同様に高く発現していることが予想された。培養液中に RCAS/GFP ウイルスを添加すると、二日後に GFP の蛍光が観察された (図 16B)。このことから、

TVA ノックインマウス胆管系細胞においては、RCAS ウイルスによる遺伝子導入が可能であることが示された。

c. 生体内遺伝子導入と感染細胞の観察

作製した TVA ノックインマウスにおいて生体内遺伝子導入が可能であるかを検証するために、細胞分裂が盛んな生後 3~10 日の K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウス新生児に、RCAS/GFP ウイルス産生 DF-1 細胞を腹腔内投与した (図 17A)。この際、ウイルスそのものではなく、ウイルス産生細胞を用いたのは、生体内で DF-1 細胞から大量のウイルスが産生されることによって、より高効率の遺伝子導入が可能であると考えられたためである。この方法はその他臓器における RCAS/TVA システムにおいて頻繁に利用される方法であるが、細胞を投与することによるマウス個体への影響はこれまでに報告されていない。継時的に末梢血を採取して感染細胞の有無をフローサイトメーターによって解析したが、K7-TVA および Evi1-TVA ノックインマウスどちらにおいても末梢血中に GFP 陽性細胞が検出されることはなかった (図 17B)。これ

らマウスの骨髄細胞を分取してフローサイトメトリーによって解析しても、GFP陽性細胞は検出されなかった（図 17C）。一方で、これらマウスのその他の臓器を観察すると、Evi-1-TVA ノックインマウスの脾臓、小腸、精巣などで GFP の蛍光を持つ細胞が観察された（図 17D）。同腹の TVA 陰性のマウスではこのような細胞群は観察されなかったことから、新生児期の TVA 発現細胞特異的に生体内遺伝子導入が成立したと考えられる。また、ウイルス投与から 10 週間という長期にわたって GFP の蛍光を持った細胞が生体内に保持されたことを考慮すると、新生児期の各臓器の幹細胞あるいは前駆細胞にウイルスが感染した可能性が示唆された。これらの結果から、TVA ノックインマウスにおいて、一部の臓器に関しては生体内遺伝子導入が成立するが、今回の方法では血液細胞への遺伝子導入は成立しないことが示唆された。

d. TVA ノックインマウス造血細胞への生体内遺伝子導入

造血幹細胞への遺伝子導入が成立しなかった一つの可能性として、新生児期の造血幹細胞においては *Krt7* および *Evi1* の発現が低下している可能性が考えられ

た。その為、続いて成体期のマウスに RCAS/GFP ウイルス産生細胞を投与し、血液細胞への感染を検証した。具体的には、I 型インターフェロン誘導剤である poly I:C の投与によって一過性に造血幹細胞を細胞周期に動員したのち、RCAS/GFP ウイルス産生 DF-1 細胞を投与した (図 18A)。その結果、末梢血中に GFP 陽性細胞が検出されることはなかった (図 18B)。これらマウスの骨髓細胞を解析しても、GFP 陽性細胞は検出されなかった (図 18C)。以上のことから、今回の方法においても TVA ノックインマウス造血細胞への生体内遺伝子導入は成立しないことが示唆された。

e. TVA ノックインマウス造血幹細胞への *in vitro* 遺伝子導入

造血幹細胞における生体内遺伝子導入が成立しないひとつの要因として、投与したウイルスが生体内の極少数の造血幹細胞に到達できていない可能性が考えられた。造血幹細胞は骨髓細胞中の 0.004% という極めて少数の細胞集団である。もしウイルスと造血幹細胞の遭遇確率の問題であれば、ウイルスの投与量あるいは投与方法の検討によって、生体内の造血幹細胞への遺伝子導入が成立する

可能性がある。この可能性を検証する為、生体外へ取り出した造血幹細胞に直接RCAS/GFP ウイルスあるいはRCAS-Vs-envA/GFPを投与する実験を行った(図19A)。フローサイトメトリーによって蛍光を解析した結果、RCAS ウイルス群、envA ウイルス群どちらにおいても GFP の蛍光は検出されなかった(図19B)。このことから、生体内の造血幹細胞へ遺伝子導入が成立しないのは、ウイルスとの遭遇確率の問題というより、造血幹細胞における TVA タンパク質の発現量の低さに要因があるのではないかと考えられた。

また、今回の実験に関しては、培養中における TVA タンパク質の発現低下も一つの可能性として考えられた。そこで、各培養条件における *Evi-1* 遺伝子の発現を定量的 PCR によって解析すると、造血幹細胞に SCF あるいは TPO の刺激を与えることによって、*Evi-1* の発現が細胞分取時に比較して大きく低下することがわかった(図19C)。

6. TVA⁺ Neo⁻ノックインマウスの作製と生体内遺伝子導入

a. TVA ノックインマウスにおける薬剤耐性遺伝子カセットの除去

TVA ノックインマウスにおいて、脾臓や小腸などの臓器では生体内遺伝子導入が成立したものの、いずれの方法でも造血細胞への感染は認められなかった。このことは、造血幹細胞における TVA の発現量の低さに要因があると考えられた。TVA の発現量を上げる方法としては、ノックインする TVA コンストラクトの改良や、Tet 発現誘導システムなどの発現量増幅システムの導入などが候補として考えられた。その中でも最も容易な方法として、TVA ノックインマウスにおける薬剤耐性遺伝子カセットの除去をまず試みた。これまでに用いている K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスは、どちらも TVA 遺伝子の C 末端側に loxP で挟まれた薬剤耐性遺伝子カセットが挿入されたままである。この薬剤耐性遺伝子カセットが、上流の遺伝子発現に抑制的な効果を持つことがある。この可能性を検証するために、薬剤耐性遺伝子カセットを除去したマウスを作製し、造血幹細胞における生体内遺伝子導入を試みることにした。そこで、K7-TVA ノックインマウスおよび Evi-1-TVA ノックインマウスと Rosa-Cre^{ER} マウスを掛け合わせ、タモキシフェン入りの餌を与えることで Cre

の発現を誘導した。その後、野生型マウスと掛け合わせ、薬剤耐性遺伝子カセットが除去された TVA⁺Neo⁻ノックインマウス (TVA⁺Neo⁻ノックインマウス) を確認した (図 19)。

b. TVA⁺Neo⁻ノックインマウス成体期における生体内遺伝子導入

K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウスおよび Evi-1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウスの骨髄細胞を解析すると、細胞数、細胞表面抗原による表現系に大きな差異は認められなかった。薬剤耐性遺伝子カセットを除去したことにより、造血幹細胞への遺伝子導入が可能なレベルまで TVA の発現が上がったかを検証するために、前項と同様に成体期マウスにおける生体内遺伝子導入実験を行った。K7-TVA⁺Neo⁻ノックイン成体マウスに Vs-envA/GFP ウイルスを 3 日間連続投与後、一週間後に骨髄細胞を分取し、CD34KSL を染色してフローサイトメトリーによって解析した (図 20A)。その結果、骨髄中に極低頻度に GFP 陽性細胞が検出され、これらが c-Kit 陽性、Sca-1 陽性の未分化な細胞分画に多く存在することがわかった (図 20B)。このことから、薬剤耐性遺伝子の除去によって、成体期の造血

細胞に生体内遺伝子導入が可能であることが示された。ここで感染が認められた細胞に関しては、その多くが造血幹細胞分画に存在するが、長期的に血液分化細胞を供給する能力があるかどうか、機能的な評価は今後の課題である。

c. K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児期における生体内遺伝子導入

続いて、生後 1~3 日の K7-TVA⁺Neo⁻ ノックインマウス新生児に、RCAS/GFP ウイルスを投与した。離乳後 3 週目以降、継時的にマウス末梢血を分取して GFP 陽性細胞の有無をフローサイトメトリーによって解析した(図 21A)。その結果、TVA 陽性マウスにおいて、4 週目の末梢血中に極少数の GFP 陽性細胞が検出された。これら GFP 陽性細胞は主に B 細胞、および Gr-1 Mac-1 陽性細胞に属し、4 週目の時点で T 細胞はほとんど検出されなかった。GFP 陽性細胞は、ウイルス投与から 17 週の長期にわたって TVA 陽性個体特異的に検出され続けた(図 21B、図 22A)。このことから、K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児期の造血幹細胞に RCAS/GFP ウイルスによる遺伝子導入が成立したことが示唆された。

同腹のマウスのうち、TVA 陽性個体で検出された末梢血中の GFP 陽性細胞の

割合を平均化すると、生後3週目から17週まで約0.02%と一定の値を示した。

また、TVA陽性個体の中でも、末梢血中のGFP陽性細胞がほとんど検出されない個体も観察された。この個体間の差の要因は定かではないが、感染効率の低さを考慮すると、今後、ウイルスの投与量や投与方法、投与技術の改善によって、より安定した結果が得られると考えられる。続いて、末梢血中にGFP陽性細胞が検出された個体中のGFP陽性細胞および陰性細胞中に占める分化細胞の推移をプロットした(図22B)。その結果、GFP陰性分画においては全体を通してB細胞優位であるのに対し、GFP陽性分画に関しては10週目以降Gr-1 Mac1陽性細胞優位になること、またGFP陽性分画に関しては全体を通してT細胞の割合が極めて低いことなど、各分画で分化細胞の動態の差異が認められた。

d. Evi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児期における生体内遺伝子導入

Evi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児期における生体内遺伝子導入実験を行った。生後1~3日のEvi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児に、Vs-envA/GFPウイルス(約 8×10^6 virus)を投与した。離乳後3週目以降、継時的にマウス末梢

血を分取して GFP 陽性細胞の有無をフローサイトメトリーによって解析した (図 23A)。その結果、TVA 陽性マウスにおいて、4 週目の末梢血中に GFP 陽性細胞集団が検出された。これら GFP 陽性細胞は K7-TVA マウス同様、主に B 細胞、および Gr-1 Mac-1 陽性細胞に属し、4 週目の時点で T 細胞はほとんど検出されなかった。GFP 陽性細胞は、ウイルス投与から 14 週の長期にわたって TVA 陽性個体特異的に検出され続けた (図 23B、図 24A)。このことから、Evi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウスにおいて、新生児期の造血幹細胞に Vs-envA ウイルスによる遺伝子導入が成立したことが示唆された。

TVA 陽性個体で検出された末梢血中の GFP 陽性細胞の割合を平均化すると、生後 3 週目から 14 週まで約 0.2~0.4%の範囲であり、K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児における GFP 陽性率と比較するとその値は 10 倍近い値を示した (図 24A)。これは、新生児期の *Krt7* と *Evi1* 遺伝子の発現量の違い、あるいは投与したウイルス (RCAS レトロウイルス、Vs-envA レンチウイルス) の違いなどが反映されたと考えられる。末梢血中に GFP 陽性細胞が検出された個体中の GFP 陽性細胞および陰性細胞中に占める分化細胞の推移をプロットした (図 24B)。その結果、K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児の結果とは異なり、GFP 陽性分

画および陰性分画どちらにおいても全体を通して B 細胞優位であった。また、GFP 陽性分画の中で T 細胞に関しては 4 週目の時点でほとんど検出されなかったが、7 週目以降徐々にその割合が上昇し、10-12 週目で GFP 陰性分画における T 細胞と同様の割合を占めることが観察された。

続いて、Evi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児期において、ウイルスの投与量を変えて同様の生体内遺伝子導入実験を行った。生後 1~3 日の Evi1-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス新生児に、Vs-envA/GFP ウイルスを前回の実験の半量以下の量（約 2.5×10^6 virus）を腹腔内投与あるいは目下静脈内投与した。その結果、TVA 陽性マウスにおいて、やはり 4 週目の末梢血中に GFP 陽性細胞集団が検出されたが、その頻度は約 0.007%程度であった（図 25A）。このことから、投与するウイルス量に応じて感染細胞の割合を調整可能であることが示唆された。その後継時的に末梢血の解析を行うと、非常に興味深いことに GFP 陽性細胞の割合は徐々に上昇し、14 週目前後で約 0.3%と一定の値を示すようになった。分化細胞の割合に関しては、GFP 陽性分画および陰性分画どちらにおいても全体を通して B 細胞優位であった（図 25B）。一方で T 細胞に関しては、全体を通して低い値で推移することが観察された。ウイルスの投与量と GFP 陽性細胞率、および

分化細胞の挙動との関連に関してはさらなる解析が必要であるが、新生児期の造血幹細胞の中でも、Evi1 の発現量に応じて分化細胞の供給能力が異なる可能性が示唆される。

考察

本研究は、造血幹細胞における新規の生体内遺伝子導入法の確立を目的として研究を開始した。生体内遺伝子導入法としては、簡便でかつ、Cre/loxP システムによる遺伝学的マーキング法よりも応用の幅が広い RCAS/TVA システムを利用することにした。この造血幹細胞における RCAS/TVA システムの導入にあたり、TVA 発現細胞の検出・分取に有用であると考えられた TVA モノクローナル抗体の作製、より高効率に感染することが可能な RCAS ウイルスの作製およびウイルスの改良、そして、造血幹細胞特異的 TVA ノックインマウスの作製を行った。

抗体の作製

本研究で TVA モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を 7 株樹立し、TVA 安定発現マウス血液細胞株 (BW-TVA 細胞) においてそれらの反応特異性を確認した。しかしながら、本研究で作製した TVA ノックイン ES 細胞およびノックインマウスにおいては、解析を行ったいずれの細胞、臓器でも TVA モノ

クローナル抗体による TVA 発現細胞の検出はできなかった。この結果は、生細胞を用いたフローサイトメトリー解析や免疫染色でも同様であった。これら ES 細胞およびマウスにおいて RCAS ウイルスによる特異的な感染が成立することを考慮すると、TVA タンパク質は細胞膜上に発現していることが示唆される。その為、TVA モノクローナル抗体によって TVA 陽性細胞が検出されない要因としては、解析した細胞に於ける TVA タンパクの膜上の発現量がひくいことと、作製した抗体の抗原 (TVA タンパク) に対する親和性の低さが考えられる。本実験において、抗体の作製およびスクリーニングに用いた BW-TVA 細胞、トリ細胞 QT-6 では TVA の発現が非常に高いが、K7-TVA および Evi1-TVA ノックインマウスにおける TVA の発現量はノックインした遺伝子座の活性およびその後の転写産物の翻訳効率に依存する。このことから、両ノックインマウスにおける TVA の発現量が、TVA モノクローナル抗体による検出限界に到達していない可能性が考えられる。この可能性を考慮すると、今後、発現量の低い遺伝子座に TVA をノックインした細胞に於いても TVA タンパクを認識する為には、より親和性の高い抗体、すなわち TVA の発現量が弱い細胞でも検出可能な抗体を作製することが重要であると考えられる。例えば、K7-TVA および Evi1-TVA ノ

ックインマウス由来の TVA 発現細胞を用いてスクリーニングすることによって、より親和性の高い TVA モノクローナル抗体を選択することができると考えられる。

本研究で用いたコンストラクトのデザインも考慮しなければならない。

TVA800 のアイソフォームは、トリ細胞において脂質ラフト (lipid raft) に存在し、ウイルスの感染に際して一分子以上の存在が必要であることが報告されている。本実験では、造血幹細胞特異的遺伝子座の終止コドン部分に T2A ペプチドおよび N 末端に Flag を付加した TVA800 アイソフォームを挿入しているが、T2A ペプチドや Flag タグが、トリ細胞と同様の *tva* 遺伝子の発現や、TVA タンパク質のコンフォメーションを変化させている可能性は十分に考えられる。その為、T2A ペプチドではなく IRES (internal ribosome entry sites) によって TVA の発現を誘導する、あるいは Flag タグの除去など、コンストラクトデザインの変更によって、抗 TVA 抗体による検出が可能になるかもしれない。

また、トリプシン処理や細胞に物理的に与えた刺激によって、BW-TVA 細胞における TVA タンパク質の発現が容易に落ちることを考慮すると、TVA タンパク質が膜タンパク質として非常に脆弱な性質を持つことも原因の一つと考えられ

る。造血幹細胞を解析するには、まず flush out あるいは crush 操作によって骨髄中の細胞をシングルセルに調整する必要があるが、この刺激によって TVA 膜タンパク質が切断されている可能性がある。この問題を回避するには、TVA タンパク質の改良が有用な策であると考えられる。RCAS ウイルスによる感染に重要なドメインと TVA モノクローナル抗体による認識部位を残し、その他の領域を物理的により強固な膜タンパク質に置き換えることができれば、RCAS ウイルスによる感染特異性を残しつつ、TVA 陽性細胞の検出がより容易になると考えられる。

Vs-envA レンチウイルスの作製

本研究では、生体内においてその多くが静止期に存在する造血幹細胞への遺伝子導入を目的としていた為、細胞周期に依存せずに感染が可能である TVA タンパク質への感染特異性をもつシュードタイプ型レンチウイルスの作製を行った。RCAS ベクター内のエンベロープ envA をクローニングし、HIV 由来のレンチウイルスベクターとあわせて 293T 細胞へ導入することで、envA を外皮にまとう

レンチウイルスの作製に成功した。この RCAS-envA ウイルスは TVA 発現細胞特異的に感染性を示したが、同様の方法で作製した VSVG を外皮にまとうウイルスと比較すると、その感染効率は非常に低いものであった。この結果から、envA タンパク質内部にウイルスの産生に抑制的に働くなんらかの要因があると考え、envA の TVA 認識ドメインを残し、その他の領域を VSVG エンベロープに置き換えた VSVG-envA キメラタンパク質を数種類作製することにより感染効率を改善することを試みた。作製したキメラタンパク質のうち、シグナルペプチドより上流を VSVG に置換した Vs-envA キメラタンパク質を外皮として作製したウイルスは、TVA 発現細胞に対して非常に高い感染効率を示した。リボソームがエンベロープの翻訳を開始する際、まずシグナルペプチド部分がリボソームトンネルから露出する。そのペプチドをシグナル認識顆粒 (SRP) が認識して結合することによって、エンベロープタンパク質の翻訳は一度中止される。SRP はこの複合体を小胞体へと輸送し、その後、小胞体上でエンベロープタンパク質の翻訳が再開する。この過程を考慮すると、RCAS ベクター由来 envA が本来持つシグナルペプチドは、ヒト 293T 細胞の SRP による認識効率が低いため envA タンパク質が十分に発現せず、結果としてウイルス産生効率が低くなっ

ていた可能性がある。この部分を VSVG シグナルペプチドに置換したことでエンベロープタンパク質の翻訳効率が上昇し、効率的なウイルス粒子の産生が誘導されたと考えられる。

造血幹細胞特異的発現を示す遺伝子

本研究では、血液細胞系譜に於いて造血幹・前駆細胞に特異的な発現を示す遺伝子としてこれまでに同定されている *Evi-1* に加え、造血幹細胞に高く発現する遺伝子として新規に *Krt7* および *Krt18* を同定した。これまで、サイトケラチンの発現や機能解析は、主に上皮細胞を対象として行われてきた。20 種類以上から成るサイトケラチンファミリー分子はフィラメントの形成に重要なドメイン部分が高度に保存されているが、細胞種毎に異なるメンバーが発現することから、表皮系細胞およびある種のがん細胞における分子マーカーとして用いられる。本論文において、上皮系細胞ではない造血幹細胞において *Krt7* と *Krt18* の組み合わせでサイトケラチンの発現が認められたことは非常に興味深く、造血幹細胞に於ける詳細な分子機能と、その発現制御機構の解析は今後の課題である。

る。本論文では、これら分子の過剰発現によって造血幹細胞の長期的骨髄再構築能の低下が観察された。このことから、*Krt7* と *Krt18* は血液細胞の分化状態を表す単なる指標ではなく、造血幹細胞においてなんらかの役割を担っている可能性が示唆される。

また、*Krt7* に関しては、野生型マウスの遺伝子発現解析の結果だけでなく、実際に CK7-EGFP ノックイン ES 由来のキメラマウスの骨髄の解析からも CK7 陽性細胞が造血幹細胞分画 ($CD34^{-/mid}KSL$) に限局した発現を示すことが認められたことから、血液細胞系譜における造血幹細胞の新規レポーターとしても非常に有望視される。CK7 陽性細胞のシングルセルレベルでの幹細胞の証明は今後の課題である。

成体期造血細胞における生体内遺伝子導入

本研究で作製した K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウス尾静脈に Vs-envA レンチウイルスを投与し、投与後 1 週間の骨髄を解析した結果、極少数の GFP 陽性細胞が検出され、それらが造血幹細胞分画に高度に濃縮されることが明らかになっ

た。今後、血液細胞系譜における GFP 陽性細胞の分布を追跡することで、正常状態にある造血幹細胞の動態を解明することが可能であると考えられる。造血幹細胞の自己複製性能および多分化能は、これまで骨髄移植法による解析を基軸として行われてきている。しかしながら、骨髄移植法は造血幹細胞の能力を測定するまでに多段階のステップを要することに加え、造血幹細胞の生体外分取による性質の変化、放射線照射による骨髄微小環境へのダメージ、移植した細胞のホーミング能力の必要性や、定着後の強い造血ストレス等、極めて特殊な条件下での解析手法であると捉えられる (図 27A)。本研究における RCAS/TVA システムは、RCAS ウイルスあるいは envA ウイルスの投与というワンステップで、正常個体内の造血幹細胞に遺伝子導入が可能である。骨髄移植を行ったマウスと RCAS/TVA システムによる遺伝子導入を行ったマウスを見ると、一目で個体へのダメージが異なることが伺える (図 27B)。

これまで、成体期における正常個体内の血液供給システムはほとんど明らかになっていなかったが、2014 年に Fernando D. Camargo のグループからトランスポゾンシステムを利用した細胞標識によって、正常状態にある造血幹細胞の動態を観察したという報告がなされた(Sun et al., 2014)。その報告によると、定常状

態では造血幹細胞はほとんど分化細胞を供給しておらず、末梢血中の分化細胞の供給は、主に分化能力の限定された各前駆細胞が担うことが示唆されている。

この報告を考慮すると、RCAS/TVA システムで標識された細胞集団からは、分化細胞がほとんど供給されない可能性が考えられる。つまり、これまで骨髄移植法によって定義されてきた細胞集団における長期的骨髄再構築能は、特殊な条件下でのみ発揮される能力である可能性がある。実際、小腸の幹細胞においては、正常状態と障害時において分化細胞を供給する細胞が異なることが報告されている(van Es et al., 2012)。以上のようなことを考えると、RCAS/TVA システムによって標識された細胞集団の長期的な観察および性状解析は、正常時と障害時における造血幹細胞の能力を解明するのに非常に有用な解析手法であると考えられる。今後、トランスポゾンシステムや Cre/loxP システムを用いた細胞系譜追跡実験の結果と比較検討することによって、定常状態における血液供給システムのより詳細な動態が解明されることが期待される。

新生仔期造血細胞における生体内遺伝子導入

K7-TVA⁺Neo⁻ノックインマウスおよび Evi-1 TVA⁺Neo⁻ノックインマウスの新生仔期において RCAS ウイルスあるいは Vs-envA ウイルスを用いて生体内遺伝子導入を試みた結果、TVA 陽性マウスでのみ、末梢血中に GFP 陽性血液分化細胞が検出された。GFP 陽性血液分化細胞は Gr-1⁺ Mac-1⁺、B220⁺、CD3⁺の多系統に観察され、その後4ヶ月以上の長期にわたって検出され続けたことから、新生児期の Krt7 陽性および Evi-1 陽性の造血幹細胞あるいは前駆細胞に生体内遺伝子導入が成立したことが示唆された。

マウス新生仔期における造血幹細胞の性状は、ほとんど明らかになっていない。その要因として、新生仔期の造血幹細胞の性状や存在箇所がほとんど解明されていないことが挙げられる。哺乳類の造血発生は、胎生型の1次造血と成体型の2次造血に分けられる。1次造血は胎生期初期に一過性に起こる造血であり、その後 aorta gonado mesonephros (AGM)領域で開始する2次造血に置き換わる。成体型造血を担う造血幹細胞は、胎生10.5日目のAGM領域の血管内皮細胞から発生し、血液循環によって胎仔肝臓に移動して成体型の2次造血を行う。この造血幹細胞は、生体内の全血液細胞系譜を、個体の生涯にわたって供給する

能力を持つと考えられている。胎生中期においては肝臓が主な造血の場であるが、出生期から新生仔期にかけて造血部位の移行が起こり、造血幹細胞は成体期における造血の場である骨髄へと移動して定着する。つまり、新生仔期における造血幹細胞は肝臓から骨髄にかけて大きく移行する時期にあたる。また、胎生期の造血幹細胞が活発に細胞分裂を行うのに対し、成体期の造血幹細胞が数ヶ月に1度しか分裂しないことから、新生仔期に劇的な遺伝子発現の変化が起こっていると考えられる。このように、新生仔期の造血幹細胞は胎生期から成体期にかけて造血の場とその性状を大きく変化させる時期であるが、その移行がどのように行われるか、どのような経路をたどるのかはほとんど解明されておらず、個体の中の造血幹細胞の特定および分取・解析が難しい時期にあるといえる。RCAS ウイルスあるいは envA ウイルスが個体内に点在する造血幹細胞を「見つけて」特異的に遺伝子導入を行ったと考えれば、その有用性は極めて大きく、新生仔期における造血研究において画期的な解析手法となると考えられる。

新生仔期にウイルス投与を行った個体の末梢血中の GFP 陽性細胞の動態を観察すると、K7-TVA ノックインマウスおよび Evi1-TVA ノックインマウス間で分

化細胞の供給様式が異なるように観察される。これは、造血幹細胞分画の中でも、Krt7 陽性集団と Evi1 陽性集団が異なる能力を持った細胞である可能性が示唆される。また、もう一つの要因として、RCAS ウイルスと envA ウイルスの違いも考えられる。どちらも TVA 陽性細胞特異的に感染するが、RCAS ウイルスに関しては標的細胞の細胞周期に応じて感染効率が変化する。このことを考慮すると、RCAS ウイルス投与群で見られた分化細胞の挙動は、新生仔期に活発に細胞分裂を行っていた造血幹細胞の能力に局限して観察されたと考えられる。

また、Evi1-TVA ノックインマウス新生仔期に投与するウイルス量によって、末梢血中に検出される GFP 陽性細胞率が変化する様子が観察された。すなわち、ウイルス量を多く投与した群では、末梢血中の GFP 陽性細胞率は生後 3 週目から 1 4 週目にかけて一定の値で推移したが、少量のウイルスを投与した群では生後 3 週目から 1 4 週目にかけて徐々に GFP 陽性細胞の割合が上昇し、1 4 週目以降、一定の値を示すようになった。成体期における血液細胞系譜の遺伝子発現様式を見ると、Evi1 は造血幹細胞で最も高く発現しているが、前駆細胞分画においても弱い発現が認められる。前駆細胞は造血幹細胞に比較してより細胞分裂が活発で、造血幹細胞と同様に全血液分化細胞系譜を供給する能力を持

つが、造血幹細胞のように長期的に分化細胞を供給し続けることはできないと考えられている(Yamamoto et al., 2013)。一方で造血幹細胞は個体の生涯にわたって血液分化細胞を供給する能力を有するが、その細胞周期は前駆細胞と比較しても極めて長く、末梢血中に分化細胞が供給されるまでには長い時間を要する。新生児期の血液細胞系譜における *Evi-1* の発現は定かではないが、これらのことを考慮すると、ウイルス量を多く投与した群では造血幹細胞だけでなく前駆細胞にも感染がおきた可能性がある。その為、末梢血中で一定の値で推移した GFP 陽性率は、造血幹細胞および前駆細胞の分化能力の複合的な結果を観察していると考えられる。一方で少量のウイルスを投与した群では *Evi1* の発現がより高い造血幹細胞に選択的にウイルスが感染したことによって、造血幹細胞の緩やかな細胞分裂による血液細胞供給の様子が観察された可能性が考えられる。

今後これらの課題の検討に際しては、既に作製されている *Evi1*-EGFP マウスや本研究で作製を手がけた *CK7*-EGFP マウスを用いた、新生仔期の血液細胞系譜に於ける *Evi-1* および *Krt7* 発現細胞の性状解析が重要であると考えられる。更に、本研究で作製した *Evi1*-TVA ノックインマウスおよび *K7*-TVA ノックインマウスにおいてウイルス投与初期に感染が確認される細胞集団の性状解析も今後

の重要な課題であると考えられる。

造血幹細胞における RCAS/TVA システムの応用

造血幹細胞における RCAS/TVA システムが完成すれば、生理的条件下にある造血幹細胞で様々な遺伝子機能解析が容易に行えることに加え、異なる発生段階、あるいは加齢に伴う造血幹細胞の能力変化の観察や、遺伝子の機能評価も可能になるのではと考えられる (図 28A)。すなわち、各発生段階でウイルスを投与し、その後の血液細胞系譜への分布を追跡することで、各段階の造血幹細胞の能力を調べることができる。さらに、正常状態で発生、加齢したマウスに任意の段階で疾患遺伝子を導入することによって、より自然発症に近い疾患モデルを構築することも可能である。これまでの血液疾患モデルは、疾患関連遺伝子を生体外で導入した造血幹細胞の骨髄移植か、全身に疾患関連遺伝子を持ったトランスジェニック、あるいはノックインマウスが主であった。これらの手法では、骨髄移植という特殊な条件での表現系であることや、個体の発生時から疾患関連遺伝子を持っていることなどを考慮しなければならない。

RCAS/TVA システムではウイルス量の調整によって正常個体内の極少数の標的細胞に特異的に疾患関連遺伝子を導入可能であり、通常の血液疾患発症のプロセスにより近いモデルを構築することが可能である。また、搭載する遺伝子を変えることによって、疾患関連遺伝子のスクリーニングも容易に行うことができると考えている（図 28B）。

本研究は、生体内の造血幹細胞への新規遺伝子導入法として、先駆け的な研究であり、これまで解析手法が極限定されていた造血幹細胞分野において大きな意味を持つといえる。その一方、本研究で作製した 2 系統の TVA マウスは、血液細胞系譜に関しては造血幹細胞に高い特異性を示すものの、個体全体で見ると他臓器においても広い発現パターンを示す。そのため、転写因子や疾患関連遺伝子の機能解析に関しては、その他の臓器への感染による影響を考慮しなくてはならない。近年、シーケンス技術の進展により極少数の細胞からでも大規模な遺伝子発現解析が可能になり、造血幹細胞においても、より特異的な発現を示す遺伝子情報が報告され始めている。こういった新しいデータから、他の臓器でも発現せず、体内で造血幹細胞飲みに発現を示すような遺伝子を探索し、その遺伝子を用いて TVA ノックインマウスを作製すれば、より造血幹細胞

胞研究に特化したシステムになると考えられる。

引用文献

- Bates, P., Young, J.A., and Varmus, H.E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74, 1043-1051.
- Gray, E.R., Illingworth, C.J., Coffin, J.M., and Stoye, J.P. (2011). Binding of more than one Tva800 molecule is required for ASLV-A entry. *Retrovirology* 8, 96.
- Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 119, 1772-1783.
- Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30, 127-138.
- Lewis, B.C., Chinnasamy, N., Morgan, R.A., and Varmus, H.E. (2001). Development of an avian leukosis-sarcoma virus subgroup A pseudotyped lentiviral vector. *J Virol* 75, 9339-9344.
- Magin, T.M., Schroder, R., Leitgeb, S., Wanninger, F., Zatloukal, K., Grund, C., and Melton, D.W. (1998). Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel

keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *J Cell Biol* 140, 1441-1451.

Michel, M., Torok, N., Godbout, M.J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., and Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1017-1028.

Narayan, S., Barnard, R.J., and Young, J.A. (2003). Two retroviral entry pathways distinguished by lipid raft association of the viral receptor and differences in viral infectivity. *J Virol* 77, 1977-1983.

Sandilands, A., Smith, F.J., Lunny, D.P., Campbell, L.E., Davidson, K.M., MacCallum, S.F., Corden, L.D., Christie, L., Fleming, S., Lane, E.B., *et al.* (2013). Generation and characterisation of keratin 7 (K7) knockout mice. *PLoS One* 8, e64404.

Young, J.A., Bates, P., and Varmus, H.E. (1993). Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* 67, 1811-1816.

Alexander, W.S., Roberts, A.W., Nicola, N.A., Li, R., and Metcalf, D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 87, 2162-2170.

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.

Bates, P., Young, J.A., and Varmus, H.E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74, 1043-1051.

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11298-11302.

Bromberg-White, J.L., Webb, C.P., Patacsil, V.S., Miranti, C.K., Williams, B.O., and Holmen, S.L. (2004). Delivery of short hairpin RNA sequences by using a replication-competent avian retroviral vector. *J Virol* 78, 4914-4916.

Bu, W., Chen, J., Morrison, G.D., Huang, S., Creighton, C.J., Huang, J.,

Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Roop, D.R., Leavitt, A.D., *et al.* (2011).

Keratin 6a marks mammary bipotential progenitor cells that can give rise to a unique tumor model resembling human normal-like breast cancer.

Oncogene 30, 4399-4409.

Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3120-3125.

Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H., and Nakauchi, H. (2006). Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc* 1, 2979-2987.

Ema, H., Takano, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2000). In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1281-1288.

Fafilek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Sloncova, E., Huranova, M., Stancikova, J., Hlavata, A., Svec, J., *et al.* (2013).

Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with lgr5 to

inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology* *144*, 381-391.

Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegue, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* *126*, 415-426.

Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., *et al.* (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* *43*, 34-41.

Gray, E.R., Illingworth, C.J., Coffin, J.M., and Stoye, J.P. (2011). Binding of more than one Tva800 molecule is required for ASLV-A entry. *Retrovirology* *8*, 96.

Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and Saitou, M. (2012). Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* *338*, 971-975.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by

pluripotent stem cells. *Cell* *146*, 519-532.

Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* *119*, 1772-1783.

Holland, E.C., Hively, W.P., DePinho, R.A., and Varmus, H.E. (1998). A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* *12*, 3675-3685.

Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., 3rd, Boiani, M., and Scholer, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* *300*, 1251-1256.

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* *30*, 127-138.

Kataoka, K., Sato, T., Yoshimi, A., Goyama, S., Tsuruta, T., Kobayashi, H., Shimabe, M., Arai, S., Nakagawa, M., Imai, Y., *et al.* (2011). Evi1 is essential

for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J Exp Med* *208*, 2403-2416.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* *121*, 1109-1121.

Lewis, B.C., Chinnasamy, N., Morgan, R.A., and Varmus, H.E. (2001). Development of an avian leukosis-sarcoma virus subgroup A pseudotyped lentiviral vector. *J Virol* *75*, 9339-9344.

Lewis, B.C., Klimstra, D.S., Socci, N.D., Xu, S., Koutcher, J.A., and Varmus, H.E. (2005). The absence of p53 promotes metastasis in a novel somatic mouse model for hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol* *25*, 1228-1237.

Magin, T.M., Schroder, R., Leitgeb, S., Wanninger, F., Zatloukal, K., Grund, C., and Melton, D.W. (1998). Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and

accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *J Cell Biol* *140*, 1441-1451.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 7634-7638.

Metcalf, C., Kljavin, N.M., Ybarra, R., and de Sauvage, F.J. (2014). Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell* *14*, 149-159.

Michel, M., Torok, N., Godbout, M.J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., and Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* *109 (Pt 5)*, 1017-1028.

Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327-334.

Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring.

Genesis 26, 99-109.

Narayan, S., Barnard, R.J., and Young, J.A. (2003). Two retroviral entry pathways distinguished by lipid raft association of the viral receptor and differences in viral infectivity. *J Virol* 77, 1977-1983.

Nishimura, T., Kaneko, S., Kawana-Tachikawa, A., Tajima, Y., Goto, H., Zhu, D., Nakayama-Hosoya, K., Iriguchi, S., Uemura, Y., Shimizu, T., *et al.* (2013). Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell* 12, 114-126.

Orsulic, S. (2002). An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models. *Mamm Genome* 13, 543-547.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.

Petropoulos, C.J., Payne, W., Salter, D.W., and Hughes, S.H. (1992). Appropriate in vivo expression of a muscle-specific promoter by using avian retroviral vectors for gene transfer [corrected]. *J Virol* 66, 3391-3397.

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Mansson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 671-684.

Sandilands, A., Smith, F.J., Lunny, D.P., Campbell, L.E., Davidson, K.M., MacCallum, S.F., Corden, L.D., Christie, L., Fleming, S., Lane, E.B., *et al.* (2013). Generation and characterisation of keratin 7 (K7) knockout mice. *PLoS One* 8, e64404.

Seidler, B., Schmidt, A., Mayr, U., Nakhai, H., Schmid, R.M., Schneider, G., and Saur, D. (2008). A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10137-10142.

Sharma, Y., Astle, C.M., and Harrison, D.E. (2007). Heterozygous kit mutants with little or no apparent anemia exhibit large defects in overall hematopoietic stem cell function. *Exp Hematol* 35, 214-220.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre

reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.

Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1273-1280.

Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., Johnnidis, J.B., Le, L., Ho, Y.J., Klein, A., Hofmann, O., and Camargo, F.D. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* 514, 322-327.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takano, H., Ema, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2004). Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* 199, 295-302.

Takeo, M., Chou, W.C., Sun, Q., Lee, W., Rabbani, P., Loomis, C., Taketo, M.M., and Ito, M. (2013). Wnt activation in nail epithelium couples nail

growth to digit regeneration. *Nature* 499, 228-232.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., *et al.* (2012). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* 14, 1099-1104.

von Werder, A., Seidler, B., Schmid, R.M., Schneider, G., and Saur, D. (2012). Production of avian retroviruses and tissue-specific somatic retroviral gene transfer in vivo using the RCAS/TVA system. *Nat Protoc* 7, 1167-1183.

Wilke, C., Holtan, S.G., Sharkey, L., DeFor, T., Arora, M., Premakanthan, P., Yohe, S., Vagge, S., Zhou, D., Holter Chakrabarty, J.L., *et al.* (2015). Marrow damage and hematopoietic recovery following allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemias: Effect of radiation dose and conditioning regimen. *Radiother Oncol.*

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph,

K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* *154*, 1112-1126.

Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Morita, Y., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2006). Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* *25*, 3515-3523.

Young, J.A., Bates, P., and Varmus, H.E. (1993). Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* *67*, 1811-1816.

Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2008). Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* *15*, 307-311.



RCAS/TVA システム

RCAS... a retroviral vector derived from avian leukemia virus (ALV).

TVA... tumor virus A (avian retroviral receptor)

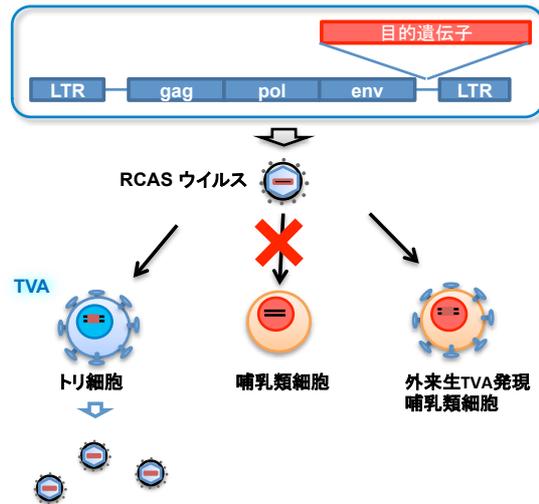


図1 RCAS/TVA システムの概略。

トリレトロ白血病ウイルス由来 RCAS ウイルスは、トリ細胞のもつ膜タンパク質 TVA 特異的に感染性を示す。哺乳類細胞は tv-a 遺伝子を有さないために、RCAS ウイルスが感染することはできない。人為的に TVA を発現するようにした哺乳類細胞においては、RCAS ウイルスの感染が成立する。感染が成立したトリ細胞では RCAS ウイルスが再び産生され放出されるが、TVA 発現哺乳類細胞においては再びウイルスが産生されることはない。

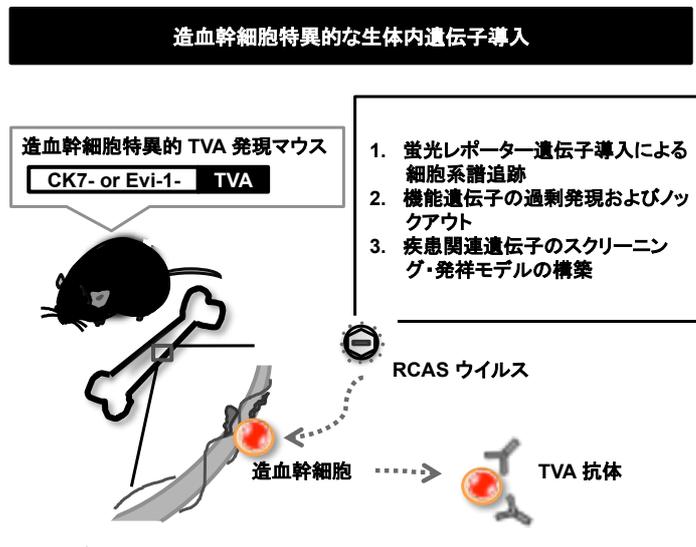


図 2 造血幹細胞研究における RCAS/TVA システムの導入。

造血幹細胞特異的に TVA を発現するマウスの作製によって、目的に応じた時期に任意の遺伝子を特異的に生体内導入することが可能になると考えられる。ウイルスに搭載する遺伝子、あるいはシステムによって、細胞系譜追跡実験、過剰発現および機能損失誘導による遺伝子機能解析、血液疾患関連遺伝子のスクリーニング等に応用可能である。また、TVA 抗体の作製によって、造血幹細胞を容易に生体外へ分取することも可能になる。

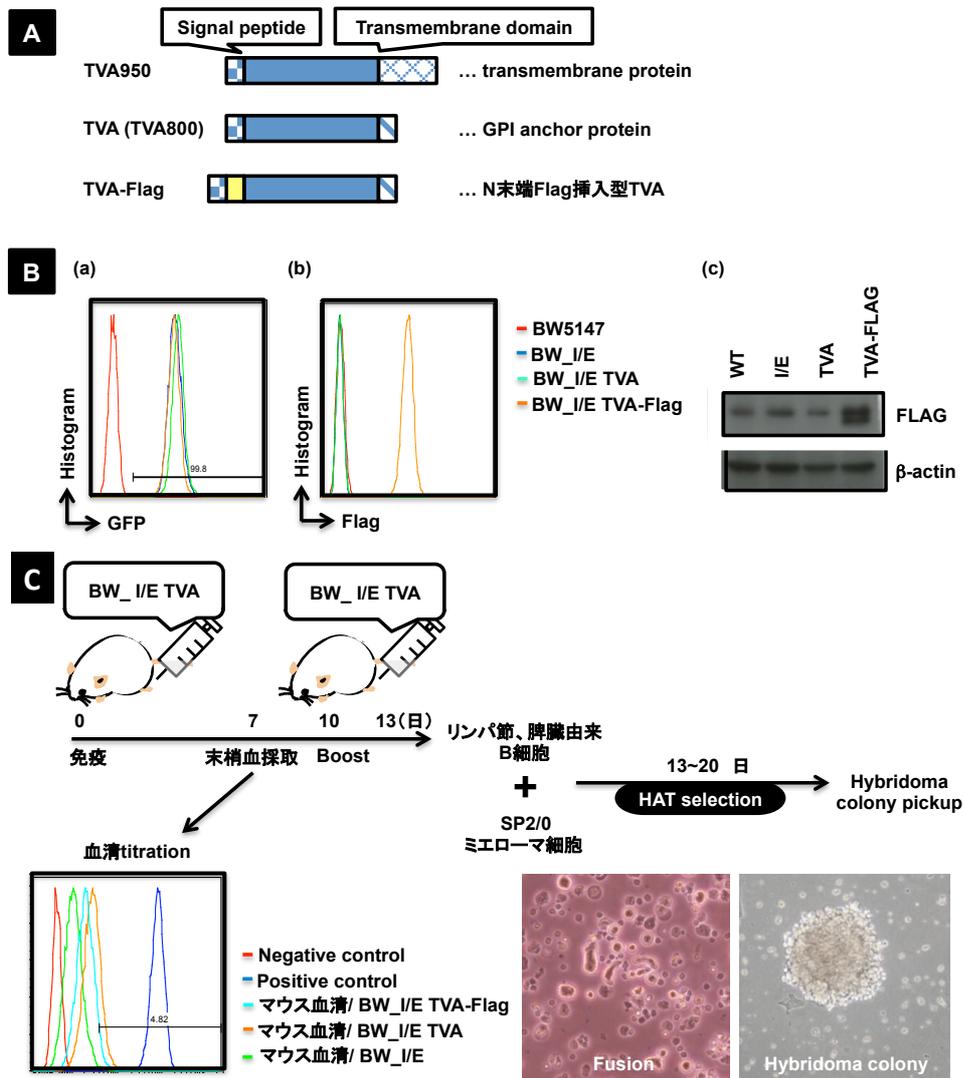


図 3. TVA 安定発現細胞株の樹立と抗体作製

- A. 2 種類の TVA isoform と N 末端 TVA 挿入型 TVA のデザイン。TVA800 isoform を基本として、シグナルペプチドの下流に Flag タグを挿入した TVA-Flag ペプチドを設計した。
- B. 設計したコンストラクトから gp ウイルスを作成し、マウス T-リンフォーマ細胞株 BW5147 細胞に導入した。フローサイトメトリーによって BW-IRES/GFP (IE), BW-IE-TVA, BW-IE-TVA Flag のそれぞれのクローンを樹立した。(a) 各クローンにおける GFP の発現解析。(b) Flag 抗体によるフローサイトメトリー解析。(c) Flag 抗体によるウエスタンブロット。
- C. TVA モノクローナル抗体作製の手順。BW-IE-TVA を免疫原としてマウスに免疫し、一週間後に末梢血中の TVA 抗体の有無をフローサイトメトリーによって解析した。抗体産生が確認されたマウスの B 細胞をミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ株を樹立した。

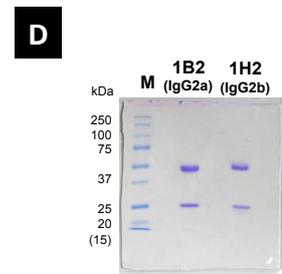
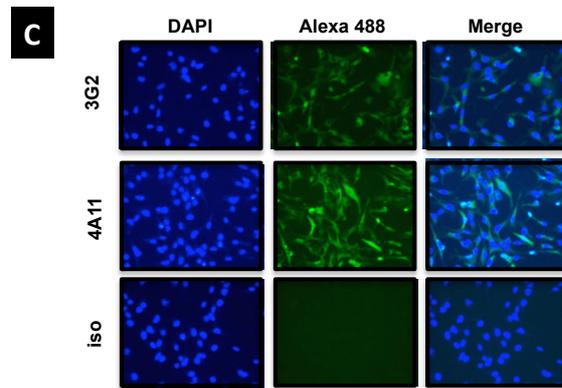
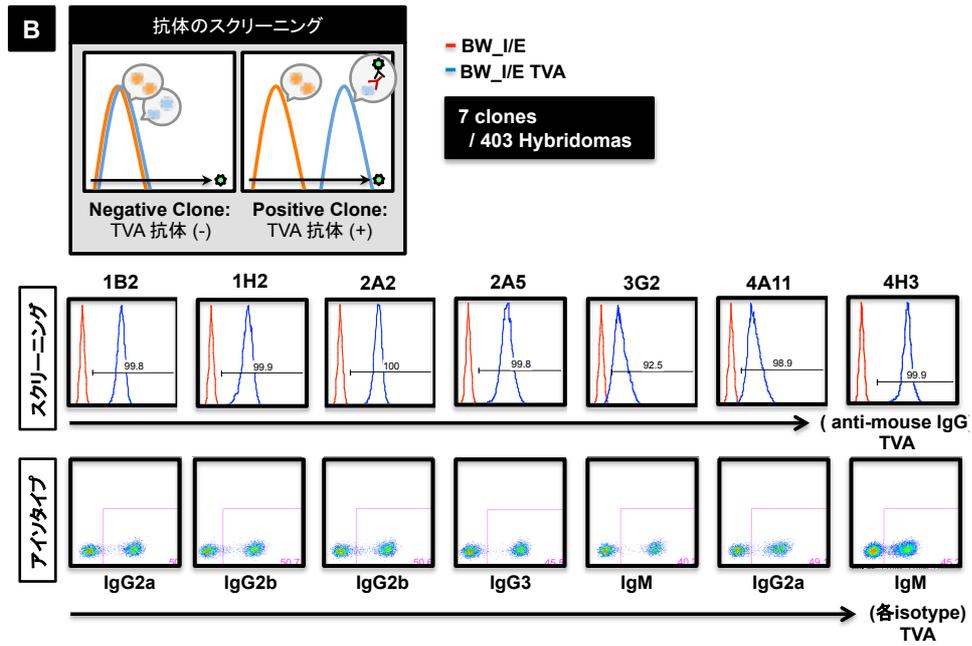
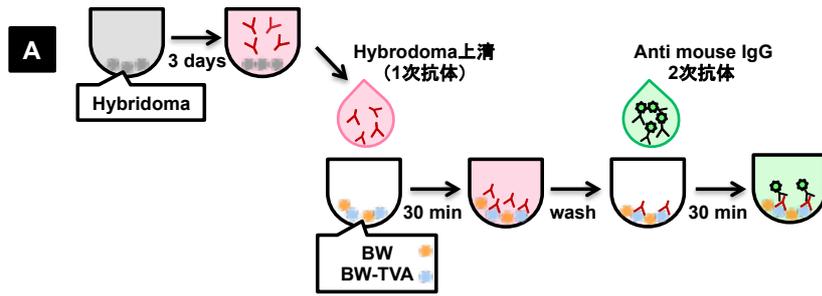


図 4. ハイブリドーマのスクリーニングと抗体の品質評価

- A. TVA 抗体産生 Hybridoma 株のスクリーニング方法。ハイブリドーマの培養上清中に産生された抗体を 1 次抗体として TVA 安定発現細胞株と反応させた。2 次抗体を反応させた後、TVA 陽性細胞のみに反応するハイブリドーマ株をフローサイトメトリーによってスクリーニングした。
- B. TVA 抗体産生 Hybridoma 培養上清による TVA 染色と isotype check。スクリーニングに関しては 2 次抗体として anti mouse IgG 抗体、アイソタイプチェックには IgG2a, 2ba, 2b, 3, IgM のそれぞれの抗体を 2 次抗体として用いた。
- C. TVA 抗体によるトリ細胞 QT-6 の免疫染色。ウズラ由来 QT-6 細胞を PFA によって固定後、ハイブリドーマ培養上清を 1 次抗体として反応させ、蛍光ラベルされた anti mouse-IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。
- D. TVA モノクローナル抗体の精製。ハイブリドーマ培養上清中の抗体は硫酸沈殿あるいは Protein G を用いて精製し、SDS-PAGE によって精度を確認した。

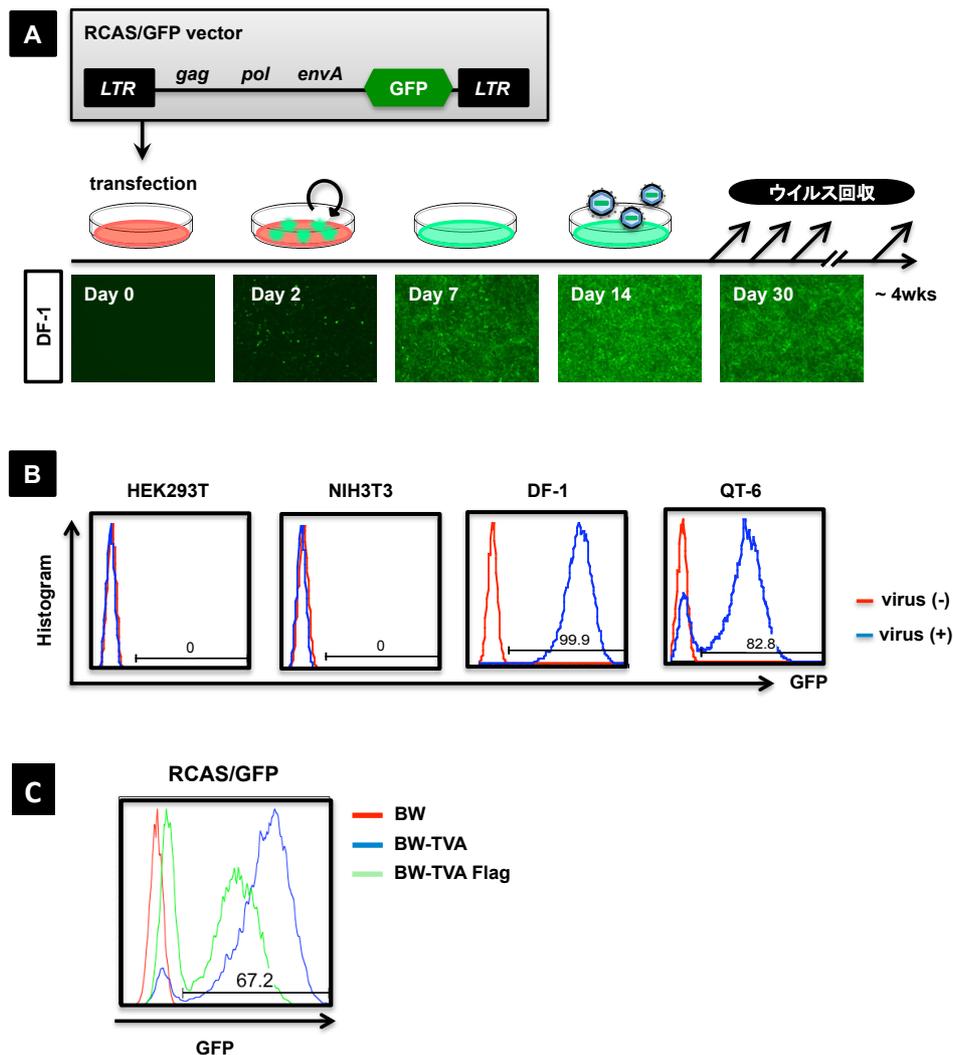


図 5. RCAS/GFP ウイルスの作製

- A. ウイルス作製のプロトコール。RCAS/GFP ベクターをトリ線維芽細胞 DF-1 にトランスフェクションスルすると、細胞内でウイルスが産生、放出されることで、培養皿中で感染細胞が広がり、1 週間ほどですべての細胞が感染細胞となる。10 日後以降 3~4 日ごとに培養上清を回収し、超遠心によって濃縮して感染実験に用いた。あるいは、2 週間目から 4 週間目のウイルス産生 DF-1 細胞を生体内遺伝子導入に用いた。
- B. 超遠心によって濃縮したウイルスを HEK293T (ヒト), NIH3T3 (マウス), DF-1 (ニワトリ), QT-6 (ウズラ) それぞれの培養液中に添加し、3 日後に GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーによって解析した。
- C. 超遠心によって濃縮したウイルスを BW5147, BW-TVA, BW-TVA Flag それぞれの培養液中に添加し、3 日後に GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーによって解析した。なお、GFP を搭載したウイルスの感染実験に用いている BW 細胞系譜は IRES/GFP カセットを除いて新たに樹立したクローンである。

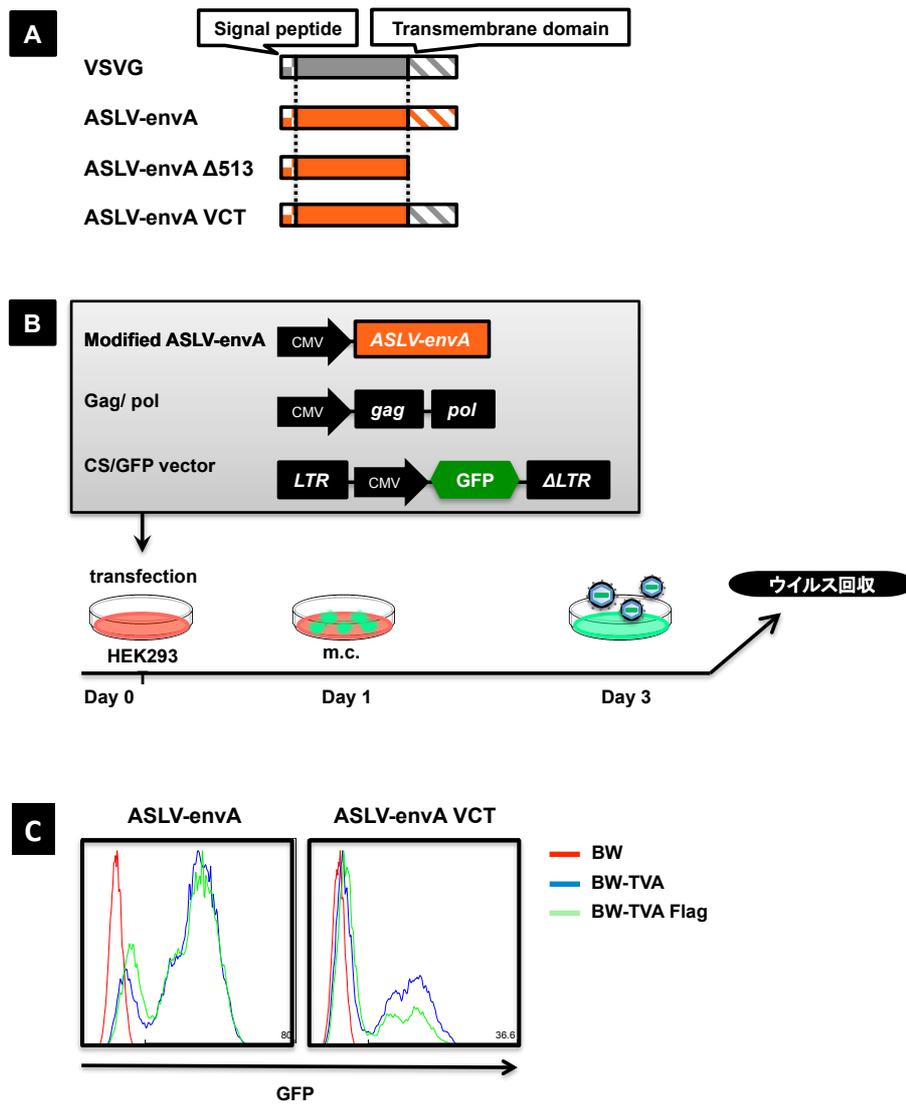
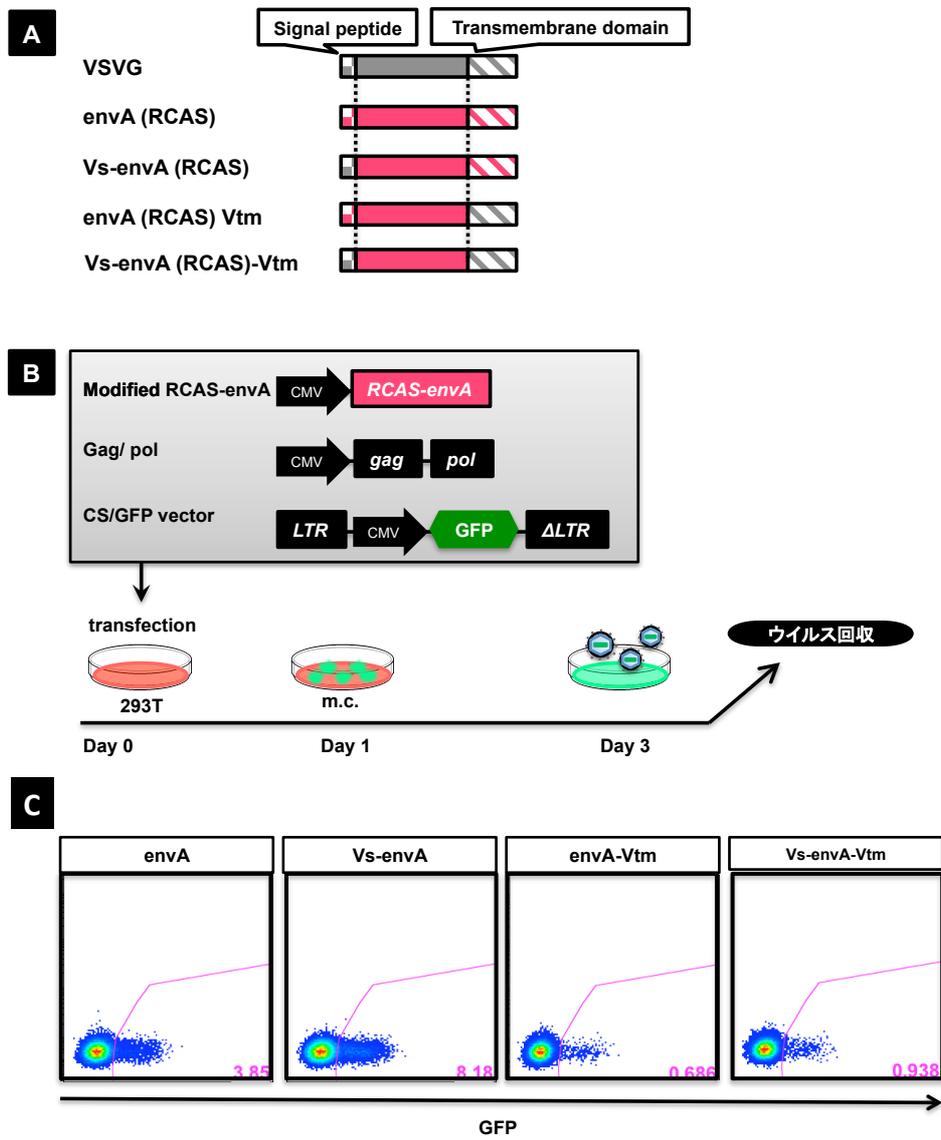


図 6. ASLV-envA レンチウイルスの作製

- ASLV-envelope (ASLV-envA)および改変型 ASLV-envelope (ASLV-envA Δ 513, ASLV-envA VCT) のデザイン。
- ウイルス作製のプロトコル。ASLV-envelope を HIV 由来レンチウイルスベクターおよび gag/pol ベクターとともに HEK293T 細胞へ導入し、導入後三日目の培養上清を回収して超遠心によってウイルスを濃縮した。
- 濃縮したウイルスを BW5147, BW-TVA, BW-TVA Flag それぞれの培養液中に添加し、三日後の GFP 陽性率をフローサイトメトリーによって解析した。

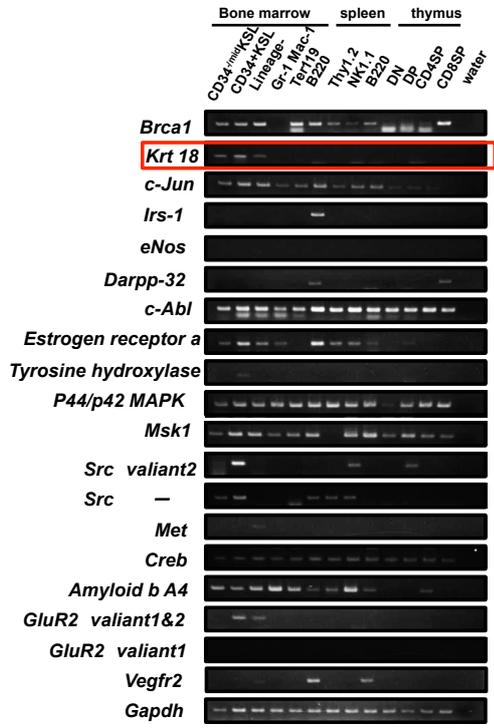
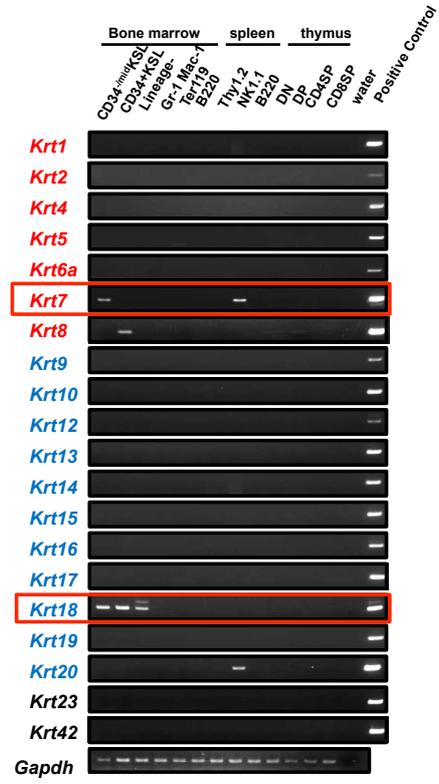


D

	Virus	Virus/ml
Retro	RCAS	$\sim 4.5 \times 10^7$
Lenti (other group)	ASLV-envA	$\sim 3.2 \times 10^6$
	ASLV-VCT	$\sim 1.6 \times 10^6$
Lenti (new)	RCAS-envA	$\sim 3.6 \times 10^6$
	RCAS-Vs-envA	$4.1 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$

図 7. RCAS-envA レンチウイルスの作製

- A. RCAS-envelope (RCAS-envA)および改変型 RCAS-envelope (Vs-envA, envA-Vtm, Vs-envA-Vtm) のデザイン。
- B. ウイルス作製のプロトコール。RCAS-envelope を HIV 由来レンチウイルスベクターおよび gag/pol ベクターとともに HEK293T 細胞へ導入し、導入後三日目の培養上清を回収して超遠心によってウイルスを濃縮した。
- C. 濃縮したウイルスを BW5147, BW-TVA, BW-TVA Flag それぞれの培養液中に添加し、三日後の GFP 陽性率をフローサイトメトリーによって解析した。
- D. RCAS ウイルスおよび改変型レンチウイルス (ASLV-envA, ASLV-VCT, RCAS-envA, RCAS-Vs-envA) の BW-TVA 細胞に対するタイターの比較。濃縮したウイルスを BW-TVA 細胞の培養液中に添加し、フローサイトメトリーによって 3 日後の GFP 陽性細胞からウイルスのタイターを算出した。

A**B**

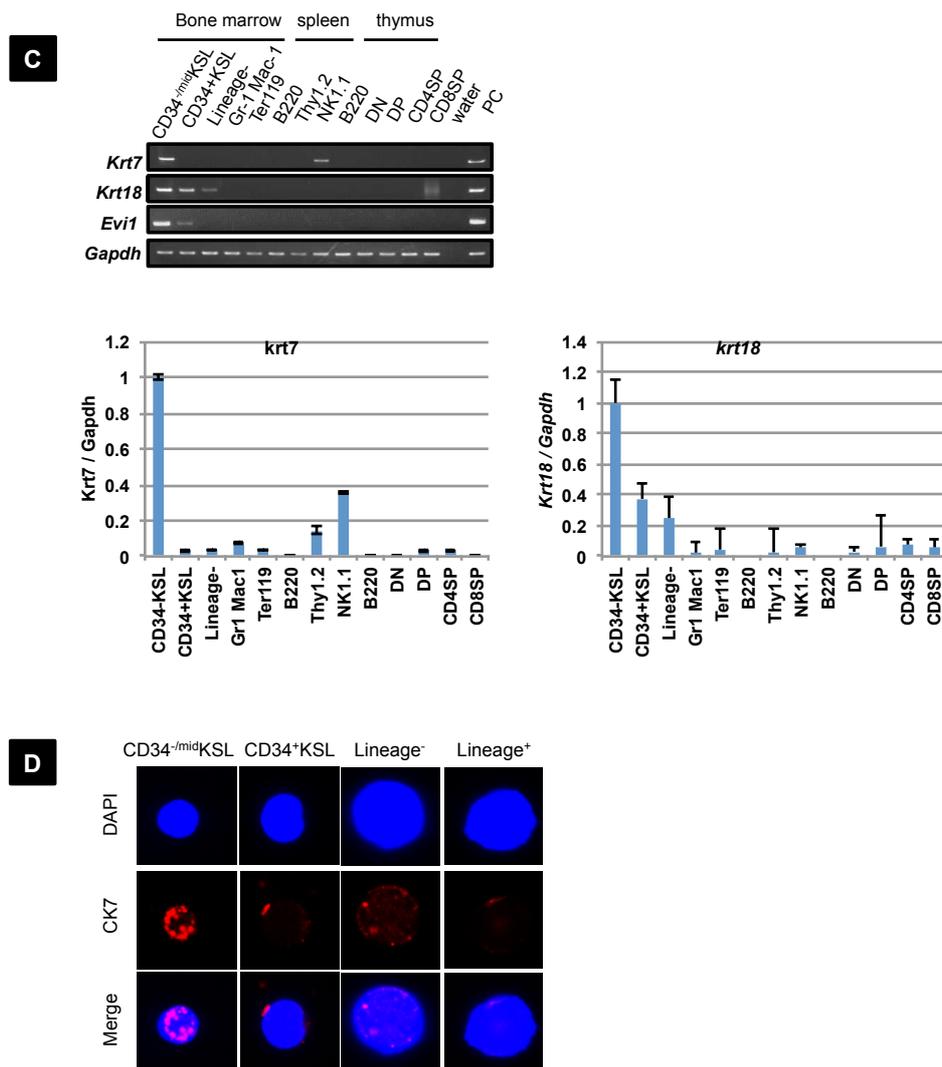
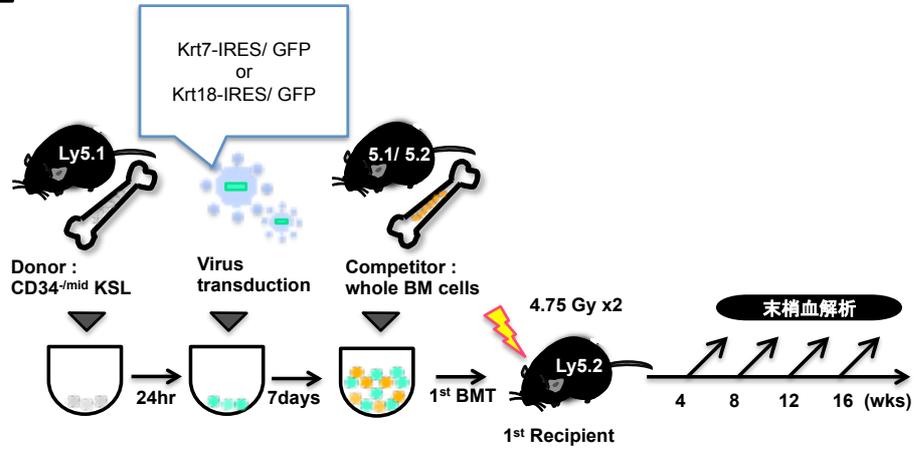


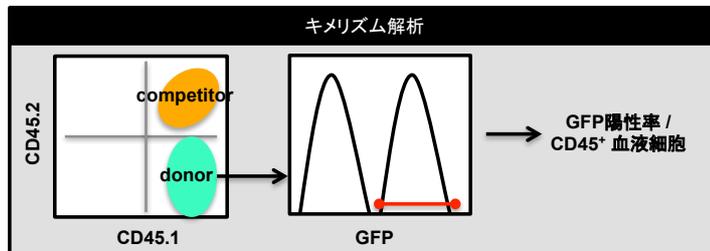
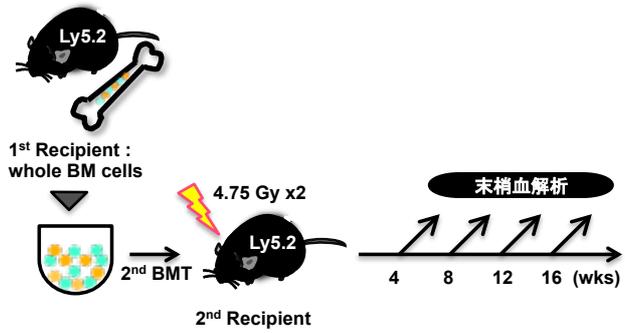
図 8. 造血幹細胞特異的遺伝子の探索。

- 血液細胞系譜における半定量的 PCR 解析。骨髄、脾臓、胸腺から全血液細胞系譜をフローサイトメトリーによって分取し、RNA を抽出した。造血幹細胞におけるアレイから候補分子を抽出し、それぞれに関して各分画における発現量を解析した。
- 血液細胞系譜におけるサイトケラチンファミリーの半定量的 PCR 解析。赤字はタイプ II (塩基性)、青字がタイプ I (酸性) サブファミリー。タイプ I とタイプ II はヘテロ二量体を形成して機能する。
- 造血幹細胞に高く発現する遺伝子 (*Krt7*, *Krt18*, *Evi-1*) の半定量および定量 PCR 解析。
- 造血幹細胞分画 (CD34^{mid}KSL)、前駆細胞分画 (CD34⁺KSL)、未分化細胞分画 (Lineage⁻)、分化細胞分画 (Lineage⁺) における in droplet immunostaining による CK7 の発現解析。
- 血液細胞系譜における IL-7 の半定量的 PCR 解析。

A 1次移植



2次移植



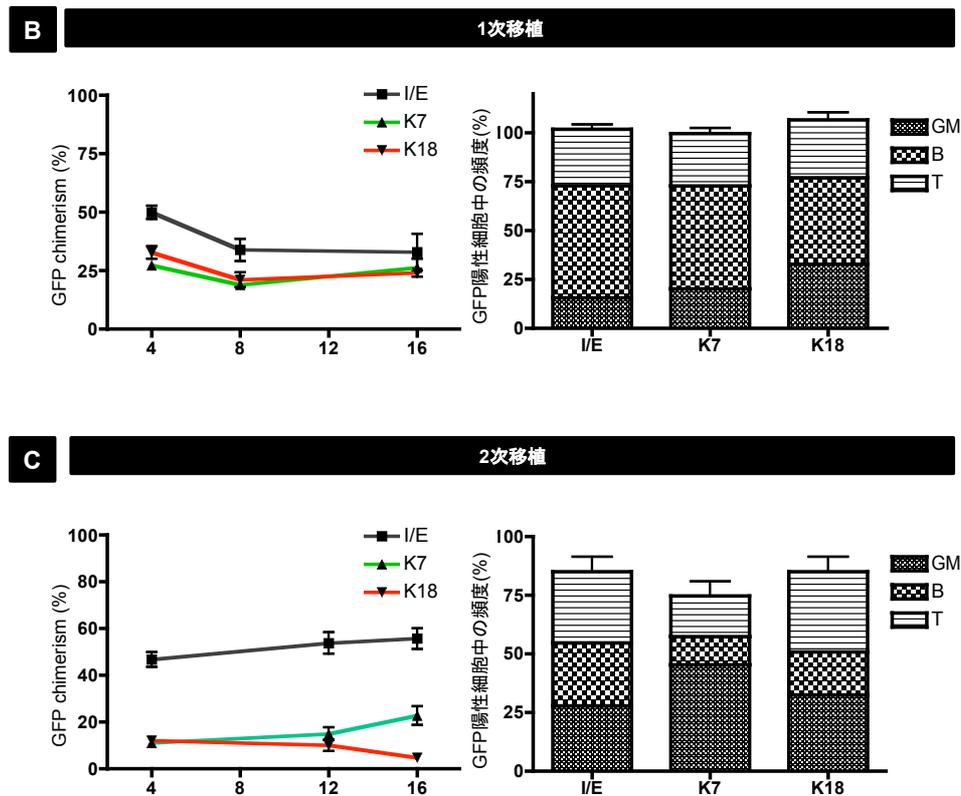
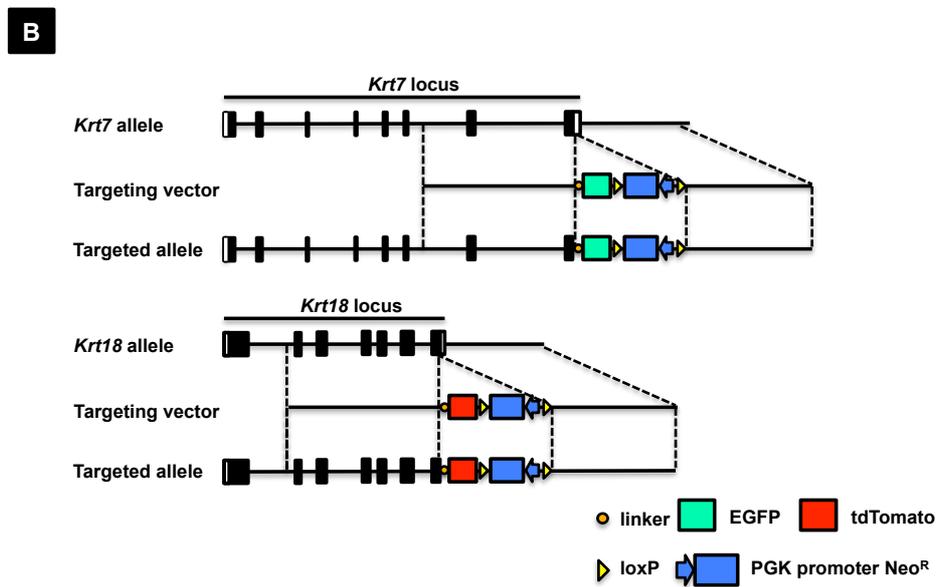
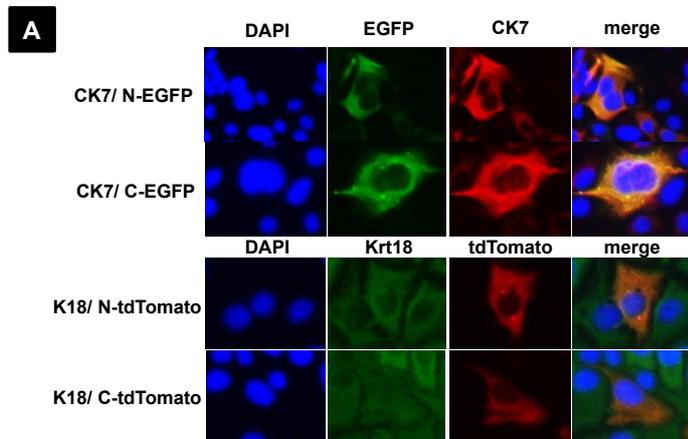


図9. 造血幹細胞における Krt7 および Krt18 の機能評価

- A. 実験の流れと解析方法。Ly5.1野生型マウスから分取した造血幹細胞分画(CD34^{-mid}KSL)に GFP 蛍光レポーターおよび *Krt7* あるいは *Krt18* 遺伝子を搭載したウイルスを感染させた。一週間培養後、Ly5.1/ Ly5.2 コンペティターマウスの骨髄細胞と混ぜて致死量保放射線照射を施した Ly5.2 レシピエントマウスに移植した (1st BMT)。移植後 16 週目のレシピエントマウスから骨髄細胞を分取し、致死量保放射線照射を施した Ly5.2 レシピエントマウスに移植した (2nd BMT)。造血幹細胞の長期的骨髄再構築能は、移植後継時的に末梢血を採取してフローサイトメトリーによって解析し、末梢血中のキメリズムの変動から評価した。キメリズムは、CD45 陽性血液細胞中の GFP 陽性細胞の割合から算出した。
- B. 1 次移植における末梢血中の GFP 陽性キメリズムの推移 (左) と移植後 16 週目における GFP 陽性細胞中の分化細胞の割合 (右)。
- C. 2 次移植における末梢血中の GFP 陽性キメリズムの推移 (左) と移植後 16 週目における GFP 陽性細胞中の分化細胞の割合 (右)。



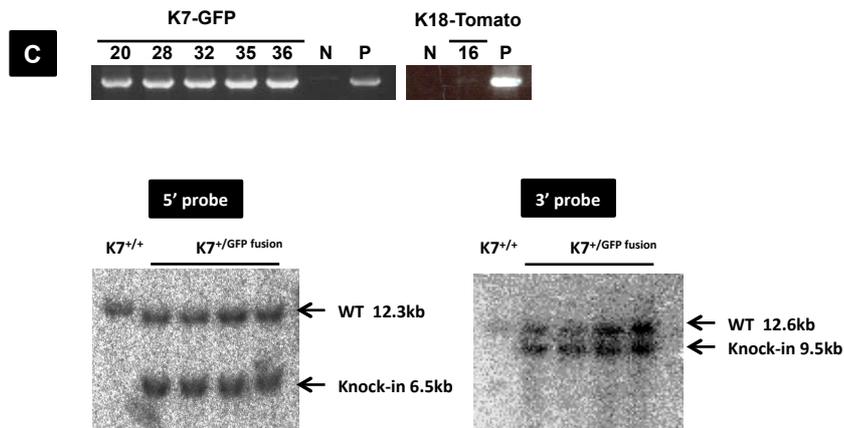


図 10. CK7-EGFP および CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞の樹立。

- 蛍光レポーターの種類および挿入位置の検討。Krt7 および Krt18 cDNA の N 末端側、C 末端側に蛍光レポーターを融合型としてつないだ強制発現ベクターを HPPL(hepatic progenitor cells proliferating on laminin) に導入し、それぞれ蛍光と対象遺伝子の発現の相関および発現様式を観察した。。
- Targeting デザイン。Flexible linker につないだ蛍光レポーター遺伝子を Krt7 遺伝子および Krt18 遺伝子の終止コドン部分にノックインするように設計した。
- PCR スクリーニング。B6 ES 細胞あるいは K3 (B6/129) ES 細胞にエレクトロポレーション法によって各 Targeting ベクターを導入し、Neomycin 添加培地で培養後、コロニーをピックアップし genomic PCR によってノックイン ES 細胞を選択した。それらのクローンを広げてゲノムを抽出し、Southern blot によって正しくノックインされていることを確認した。

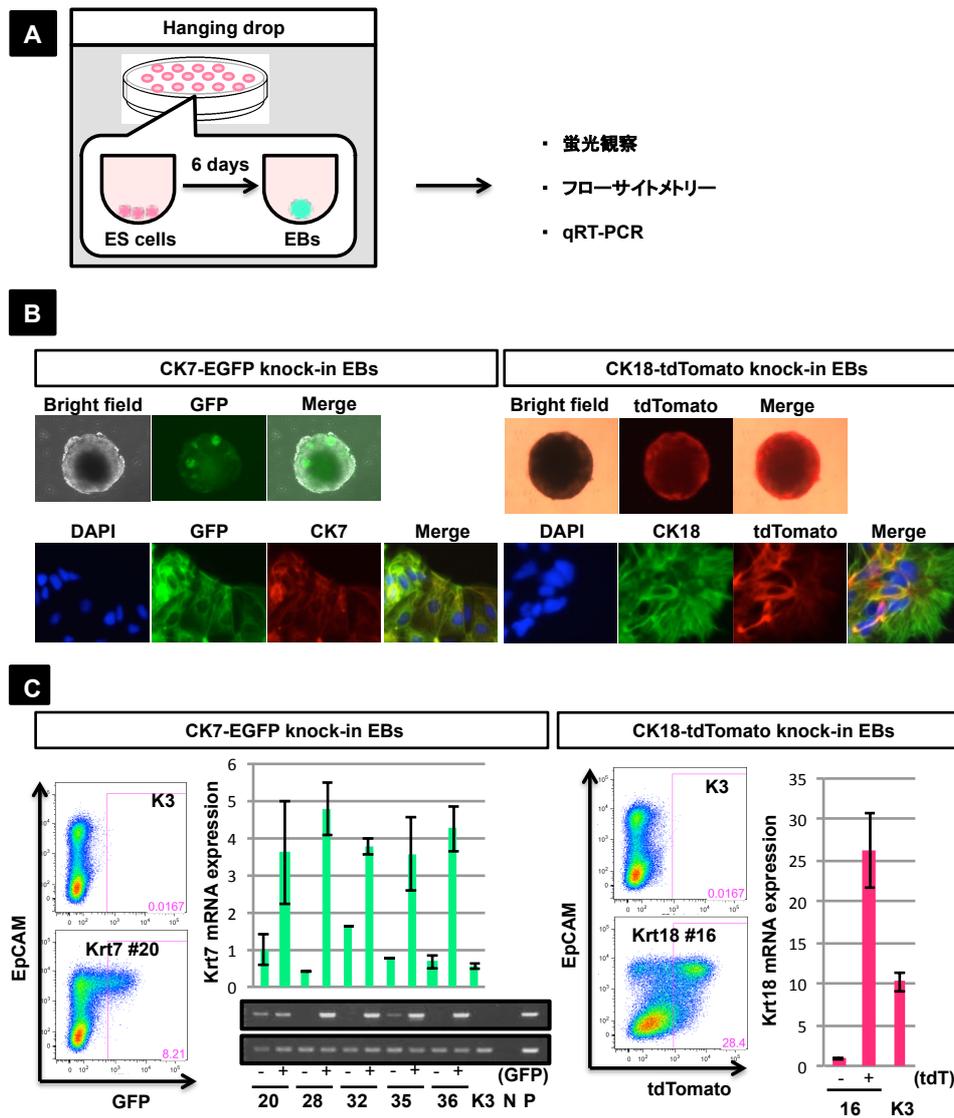


図 11. CK7-EGFP および CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞の評価。

- Hanging drop 法により胚葉体(EB)形成を誘導し、蛍光観察および免疫染色、半定量的 PCR により蛍光と遺伝子発現の相関を検証した。
- 誘導 6 日目の EB における蛍光観察および免疫染色。
- 培養 6 日目の EB のフローサイトメトリー解析および定量的 PCR 解析。0.25% EDTA-Trypsin を用いてシングルセルにした後、フローサイトメトリーを用いて蛍光レポーター陽性分画と陰性分画をそれぞれ分取し、*Krt7* および *Krt18* の発現を定量的 PCR によって解析した。

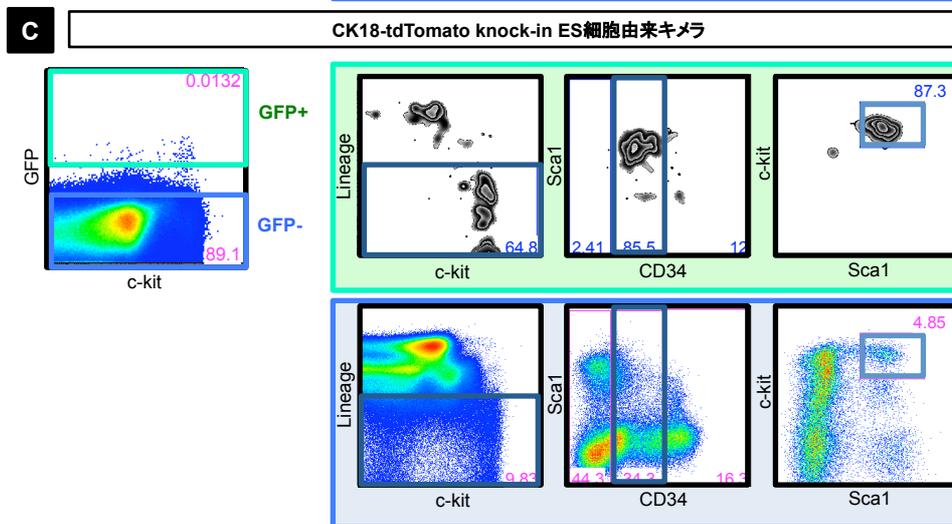
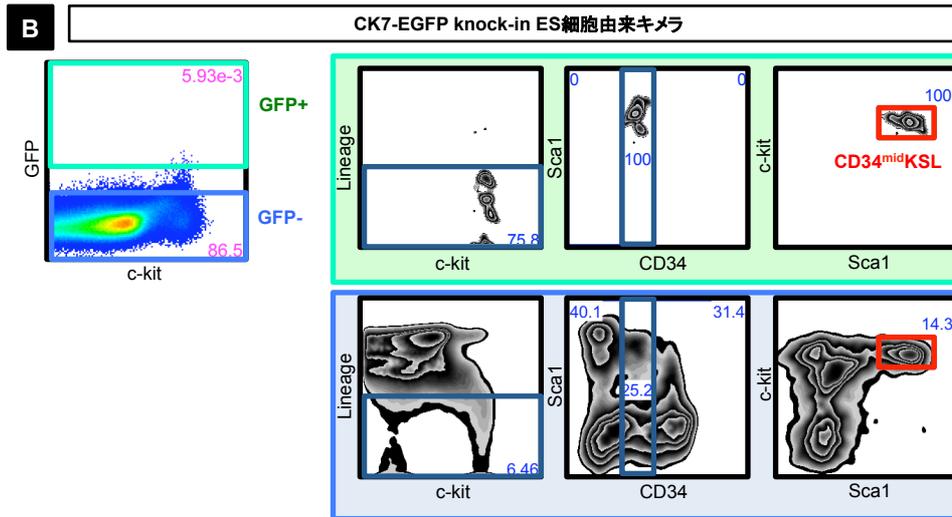
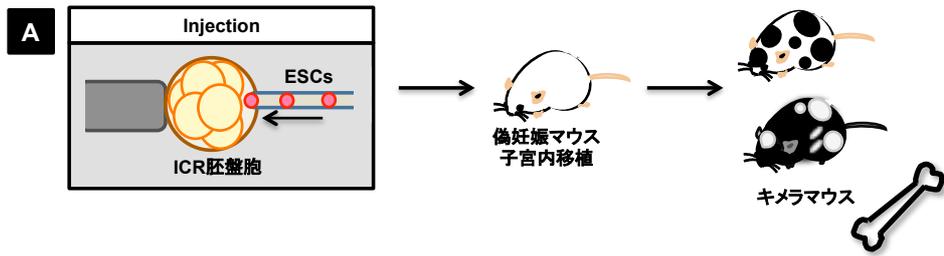
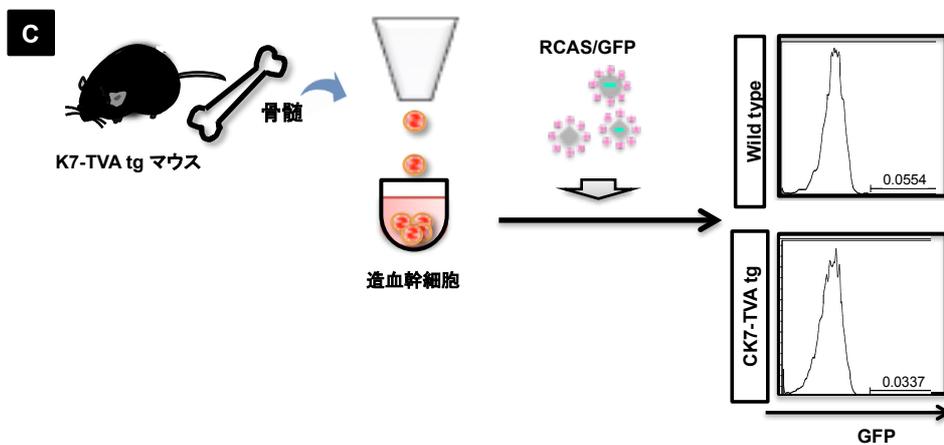
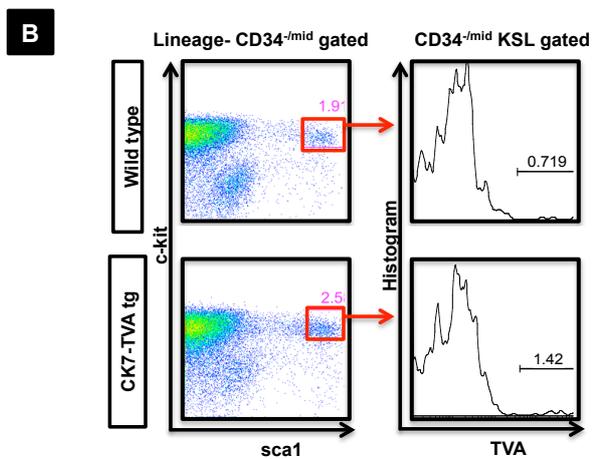
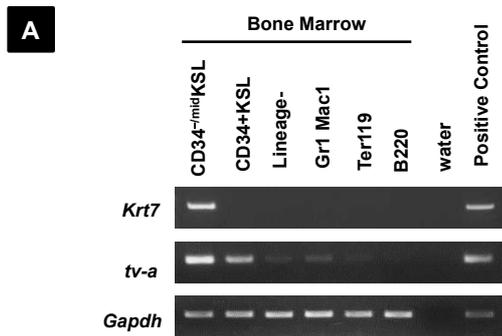


図 12. CK7-EGFP および CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞由来キメラマウスの解析

- A. CK7-EGFP および CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞を ICR マウス胚盤法に注入し、偽妊娠マウスの子宮内に移植することでそれぞれのキメラマウス個体を得た。
- B. K7-EGFP ノックイン ES 細胞由来キメラマウスの骨髓細胞解析。キメラマウスの骨髓を分取し、シングルセルに素した後 CD34, c-kit, Sca-1, Lineage marker 抗体で染色してフローサイトメーターによって解析した。
- C. CK18-tdTomato ノックイン ES 細胞由来キメラマウスの骨髓細胞解析。キメラマウスの骨髓を分取し、シングルセルに素した後 CD34, c-kit, Sc



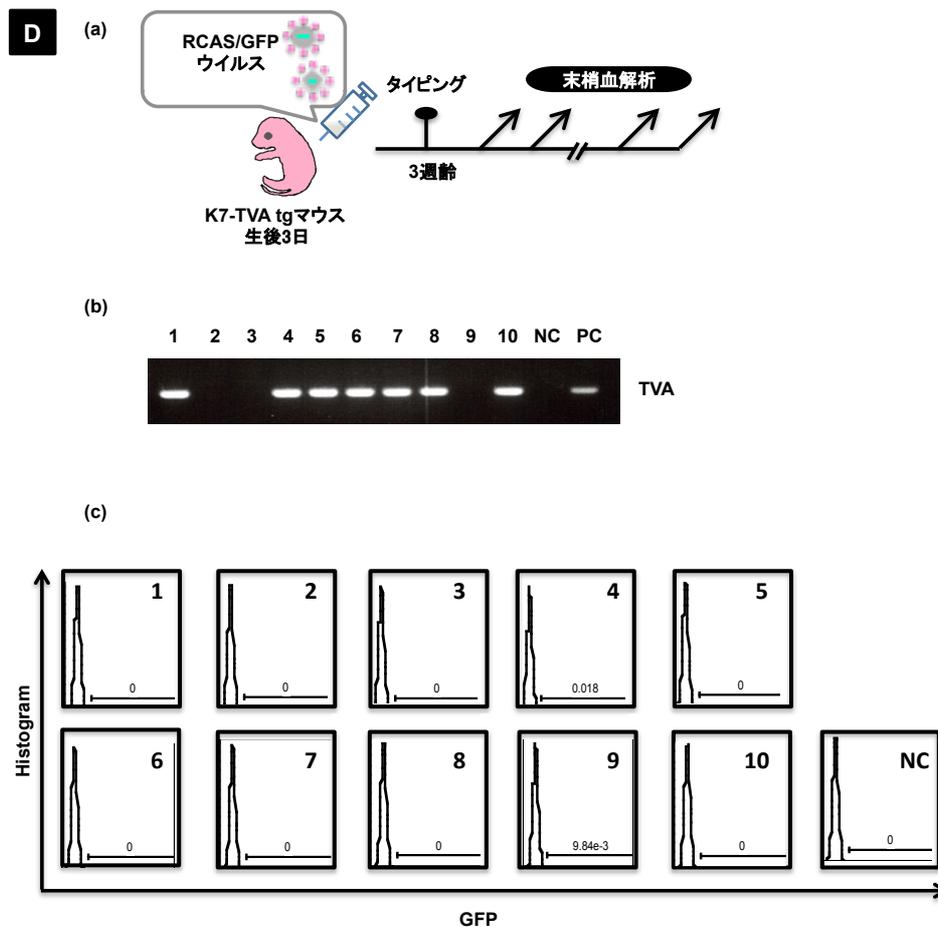


図 13. K7-TVA tg マウスにおける RCAS/TVA システム。

- A. K7-TVA tg マウス骨髄細胞系譜における Krt7 および tv-a の発現。フローサイトメトリーによって骨髄細胞系譜を分取し、各分画における Krt7 と tv-a の発現を半定量的 PCR によって解析した。
- B. K7-TVA tg マウス骨髄細胞における TVA タンパク質の発現。TVA モノクローナル抗体を用いて K7-TVA tg マウス骨髄細胞を染色し、フローサイトメータによって解析した。
- C. K7-TVA tg マウスの造血幹細胞における試験管内遺伝子導入実験。K7-TVA tg マウスからフローサイトメータによって造血幹細胞分画 ($CD34^{-mid}KSL$) を分取し、培養液中に RCAS/GFP ウイルスを添加して培養した。1 週間後にフローサイトメータによって GFP 陽性細胞の有無を解析した。
- D. K7-TVA tg マウス新生児期における生体内遺伝子導入実験。生後 3 日目の新生児に RCAS/GFP ウイルスを投与し、離乳後継時的に末梢血を採取してフローサイトメータによって GFP 陽性細胞の有無を解析した。

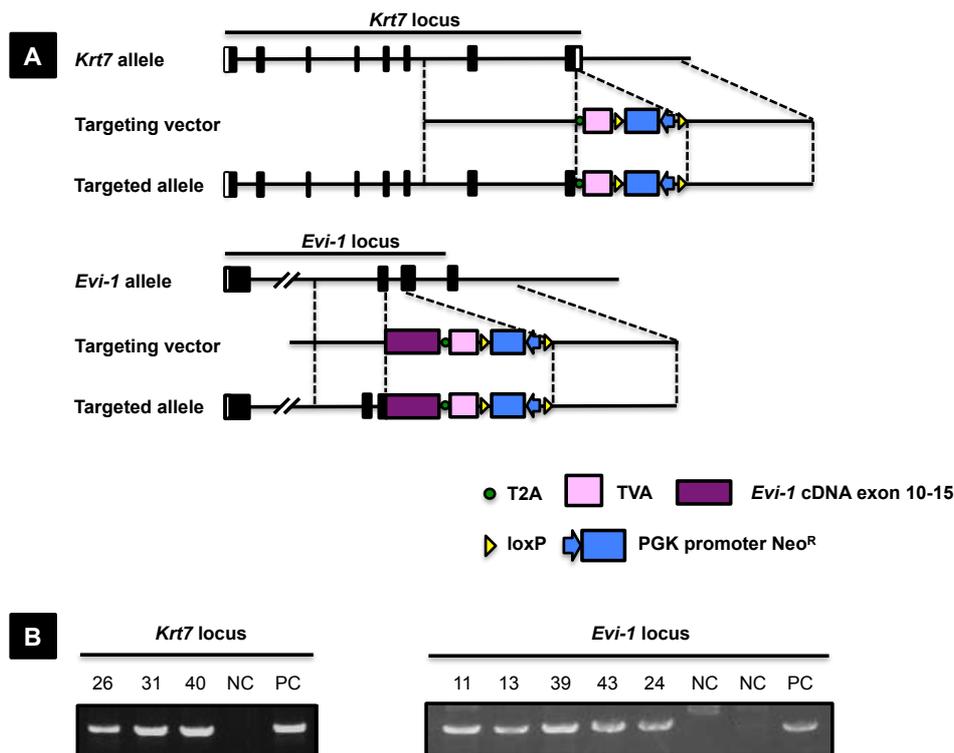
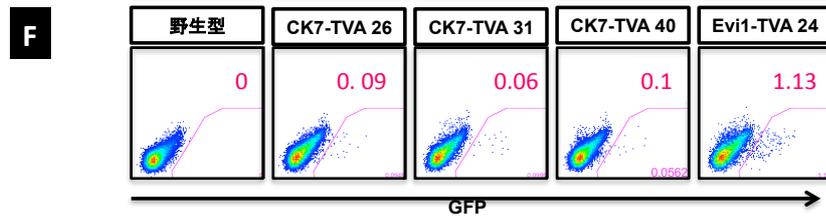
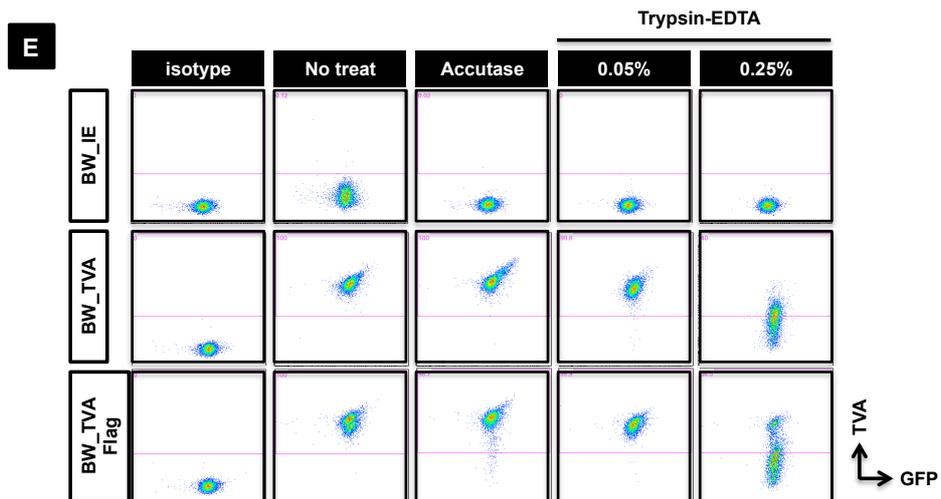
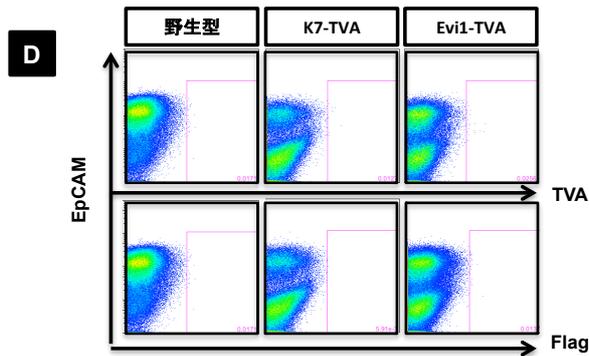
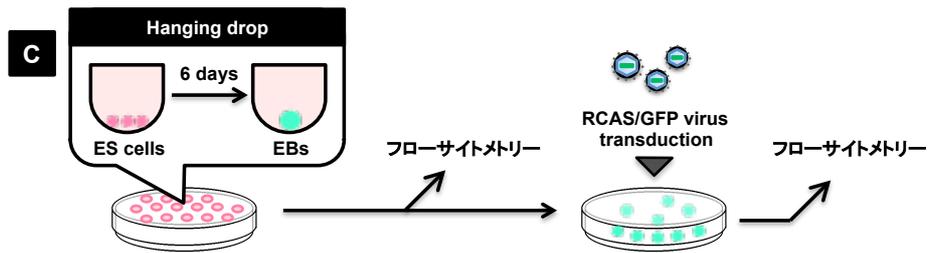


図 14. K7-TVA ノックインおよび Evi1-TVA ノックイン ES 細胞の樹立。

- A. **Targeting** デザイン。T2A ペプチド配列につないだ tv-a 遺伝子を *Krt7* 遺伝子の終止コドン部分にノックインするように設計した。Evi1 のデザインに関しては 2011 年の Evi1-GFP ノックインマウスのデザインを参考に、Evi1 cDNA exon10-15 に T2A ペプチド配列につないだ tv-a 遺伝子を Evi1 exon9 直下にノックインするように設計した。
- B. PCR スクリーニング。B6 ES 細胞あるいは K3 (B6/129) ES 細胞にエレクトロポレーション法によって各 Targeting ベクターを導入し、Neomycin 添加培地で培養後、コロニーをピックアップし genomic PCR によって TVA ノックイン ES 細胞を選択した。
- C. TVA ノックイン ES 細胞における RCAS/TVA システム。胚様体(Embryoid body:EB)形成によって CK7 あるいは Evi1 の発現を誘導し、TVA 抗体で染色してフローサイトメトリー解析を行った。また、RCAS/GFP ウイルスを添加して感染が成立するかを検証した。
- D. TVA ノックイン ES 細胞由来 EB における TVA 抗体によるフローサイトメトリー解析。誘導 6 日目の EB を 0.25% EDTA-Trypsin 処理によってシングルセルにした後、TVA 抗体によって染色して TVA の発現を検証した。EpCAM: 上皮細胞系マーカー。
- E. BW-TVA および BW-TVA Flag 細胞における TVA タンパク質の安定性。各細胞株を accutase, 0.005% EDTA-Trypsin、0.25% EDTA-Trypsin 処理した後に TVA 抗体によって染色して TVA の発現の安定性を検証した。
- F. TVA ノックイン ES 細胞由来 EB における RCAS/GFP ウイルスの感染。誘導 6 日目の EB 培養液中に RCAS/GFP ウイルスを添加し、2 日後にフローサイトメトリーによって蛍光の有無を観察した。



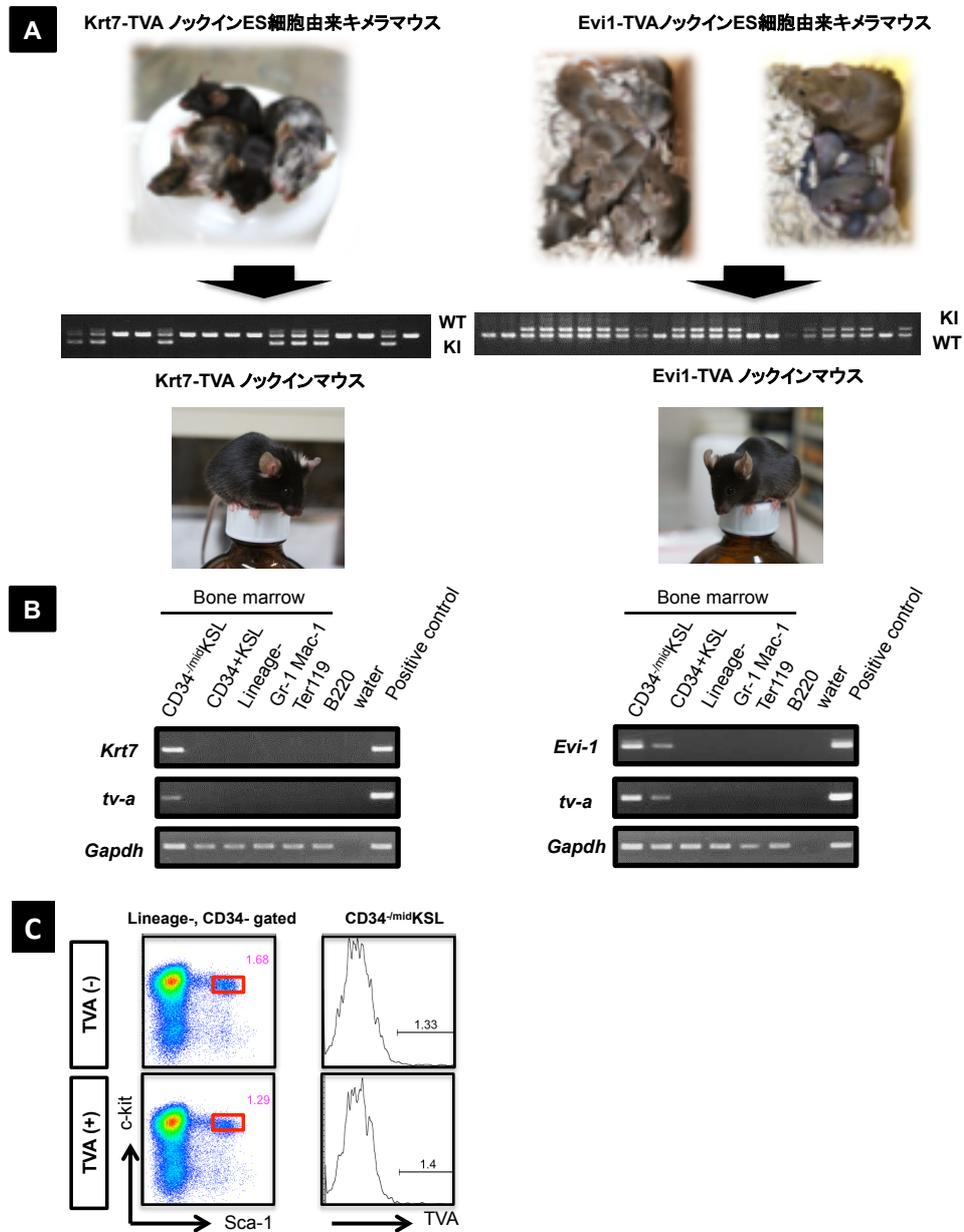


図 15. TVA ノックインマウスの作製

- A. TVA ノックイン ES 細胞を ICR マウス胚盤法に注入し、キメラマウスを得た。高毛色キメラ個体を野生型マウスと掛け合わせ、産仔の尻尾からゲノムを抽出し TVA ノックインマウス個体を得た。
- B. TVA ノックインマウス骨髄細胞系譜における RT-PCR。
- C. K7-TVA ノックインマウス骨髄細胞の TVA 抗体によるフローサイトメトリー解析。

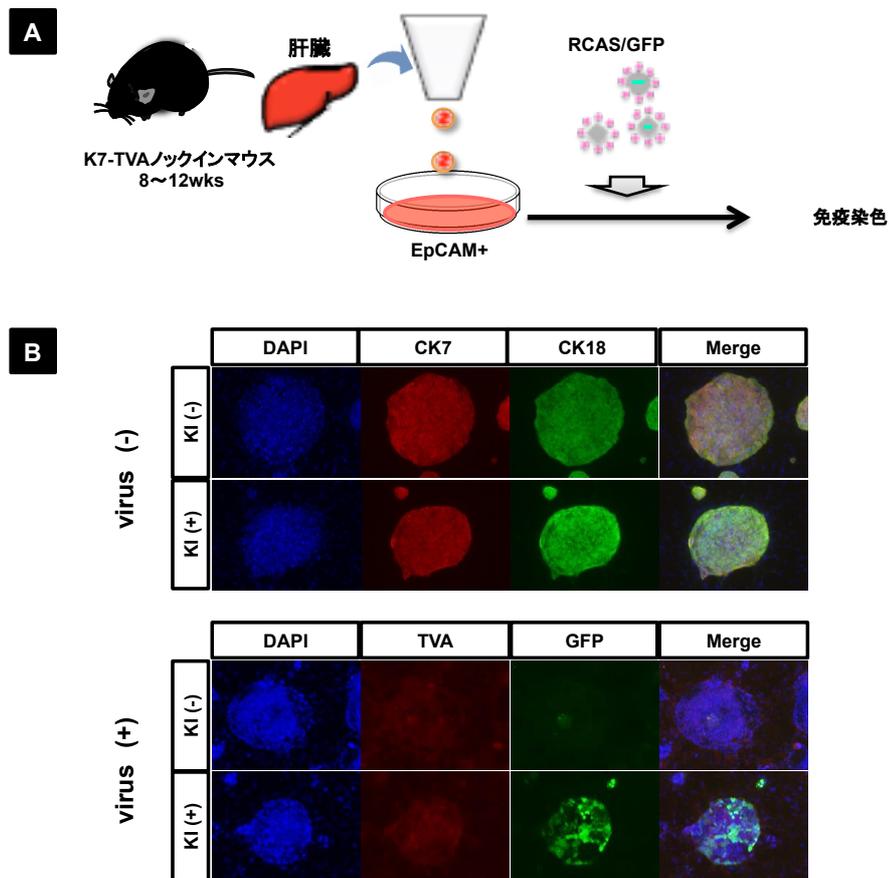
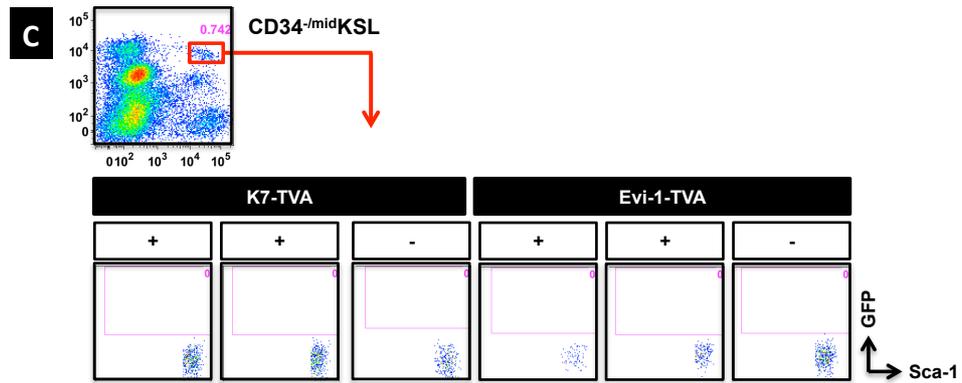
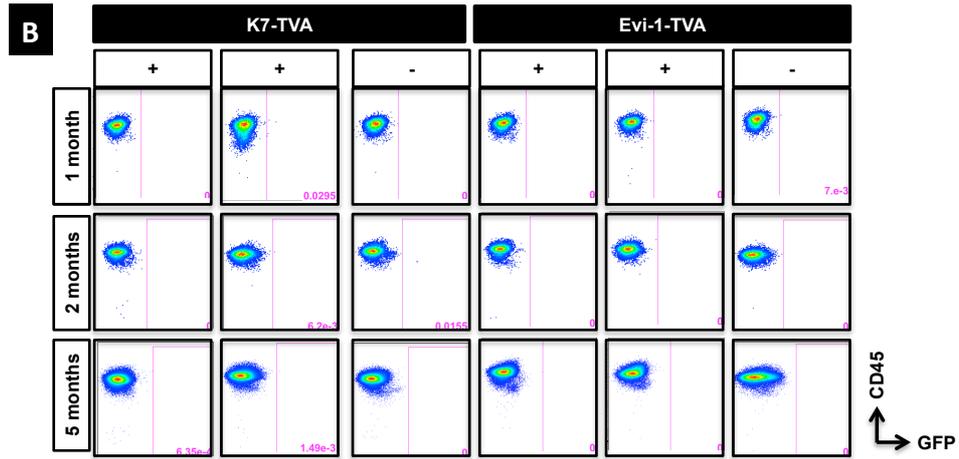
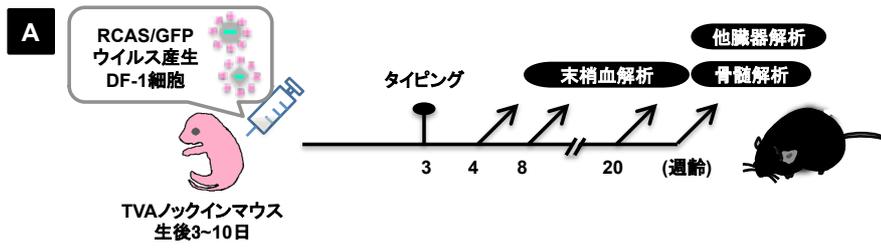


図 16. K7-TVA ノックインマウスにおける GFP 蛍光レポーター遺伝子の試験管内導入実験。

- A. 実験の流れ。成体期の K7-TVA マウスの肝臓から EpCAM 陽性細胞をフローサイトメトリーによって分取し、培地中に RCAS/GFP ウイルスを添加して、3 日後に免疫染色によって解析した。
- B. (上段) ウイルス非添加における EpCAM 陽性細胞における CK7 および CK18 の免疫染色。
(下段) EpCAM 陽性細胞の培養液中に RCAS/GFP ウイルスを添加し、3 日後に TVA 抗体および GFP 抗体によって免疫染色した。



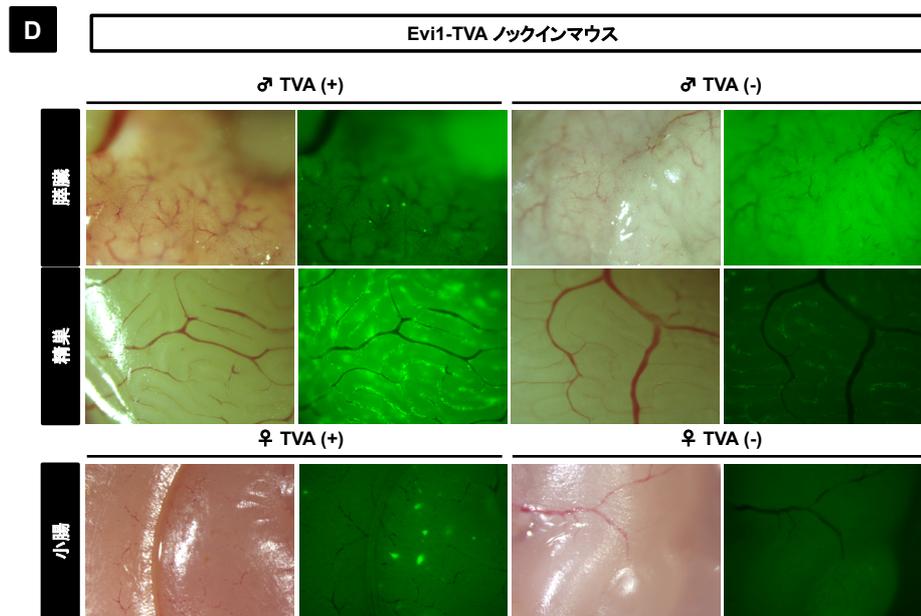


図 17. TVA ノックインマウスにおける GFP 蛍光レポーター遺伝子の生体内導入実験。

- A. 実験の流れ。S 新生児期のマウスの腹腔内に RCAS/GFP ウイルス産生 DF-1 細胞を投与し、各タイムポイントで末梢血および骨髄細胞をフローサイトメトリーによって解析した。また、骨髄解析と同時に、その他の臓器における蛍光も顕微鏡によって観察した。
- B. 末梢血におけるフローサイトメトリー解析。
- C. 骨髄細胞におけるフローサイトメトリー解析。
- D. Evi1-TVA 新生児にウイルスを投与した個体から脳、眼球、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、胃、膵臓、小腸、大腸、腎臓、皮膚、筋肉、骨髄、精巣または卵巣を取り出し、それぞれ蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光が観察された臓器を示した。

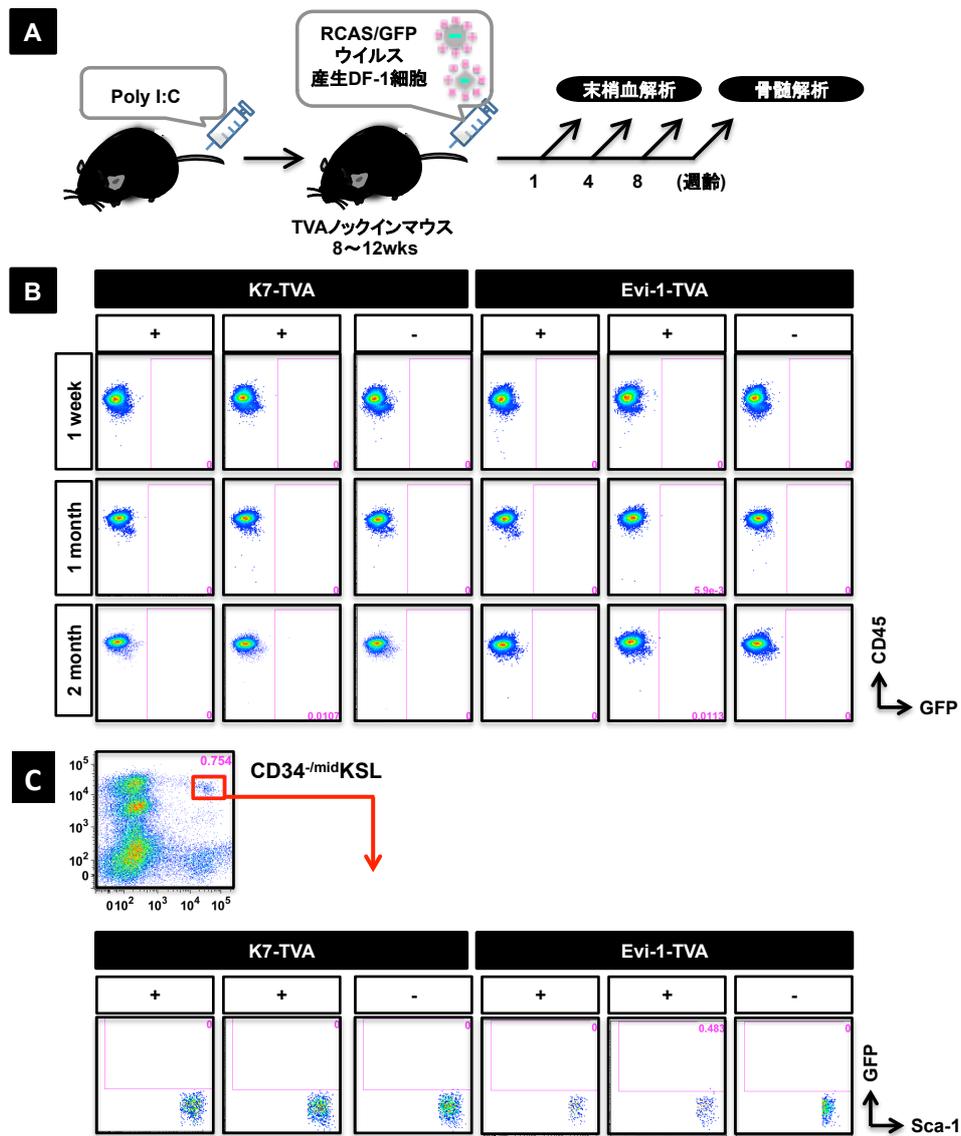


図 18. TVA ノックインマウスにおける GFP 蛍光レポーター遺伝子の生体内導入実験。

- A. 実験の流れ。成体期のマウスに poly I:C 投与後、尾静脈に RCAS/GFP ウイルス産生 DF-1 細胞を投与し、各タイムポイントで末梢血および骨髓細胞をフローサイトメトリーによって解析した。
- B. 末梢血におけるフローサイトメトリー解析。
- C. 骨髓細胞におけるフローサイトメトリー解析。

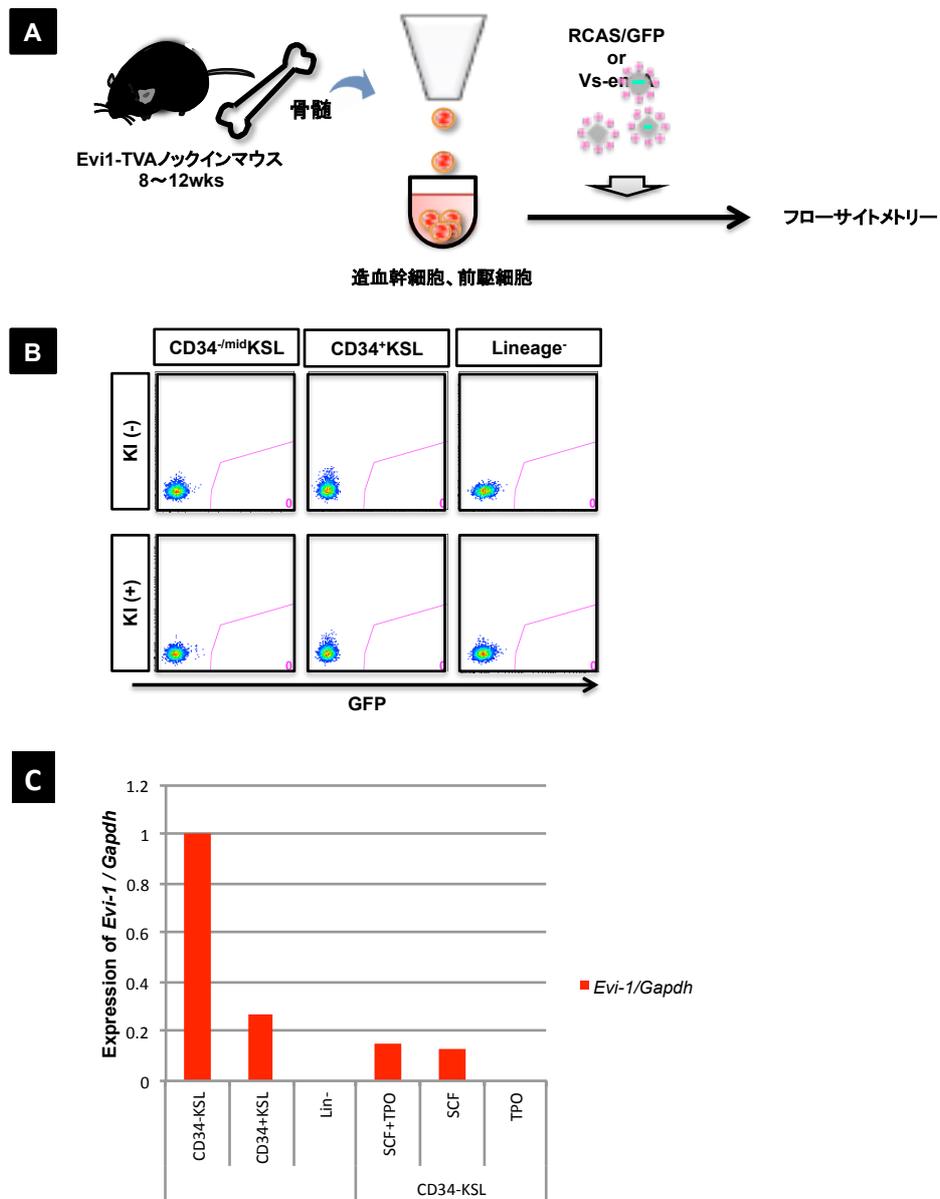


図 19. Evi1-TVA ノックインマウスにおける GFP 蛍光レポーター遺伝子の試験管内導入実験。

- A. 実験の流れ。成体期の Evi1-TVA マウスの骨髓細胞から造血幹細胞分画 (CD34^{low}KSL)、前駆細胞分画 (CD34⁺KSL)、未分化細胞分画 (Lineage⁻) をフローサイトメトリーによって分取し、サイトカインを含む培地中で一晩培養後、RCAS/GFP ウイルスを添加して、7 日後に GFP 陽性細胞の有無を解析した。
- B. ウイルス添加後 7 日目の各分画のフローサイトメトリー解析。
- C. 各分画およびサイトカインを含む培地中で培養した造血幹細胞分画における Evi1 遺伝子の半定量的 PCR。

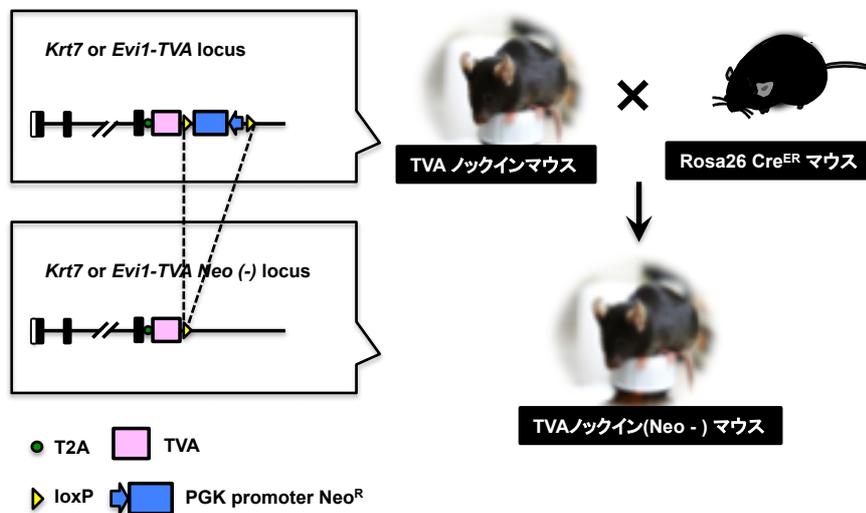


図 20. Rosa-Cre^{ER} マウスとの掛け合わせによる Neomycin 耐性遺伝子カセットの除去。

K7 および Evi1-TVA ノックインマウスを Rosa-Cre^{ER} マウスと掛け合わせ、TVA 遺伝子および Cre 遺伝子をもった産仔にタモキシフェン入りの餌を5日間与えた。その後、野生型マウスと掛け合わせ、得られた産仔をタイピングし、TVA 陽性かつ Neomycin 耐性遺伝子陰性 (TVA Neo(-)) のノックインマウスを得た。

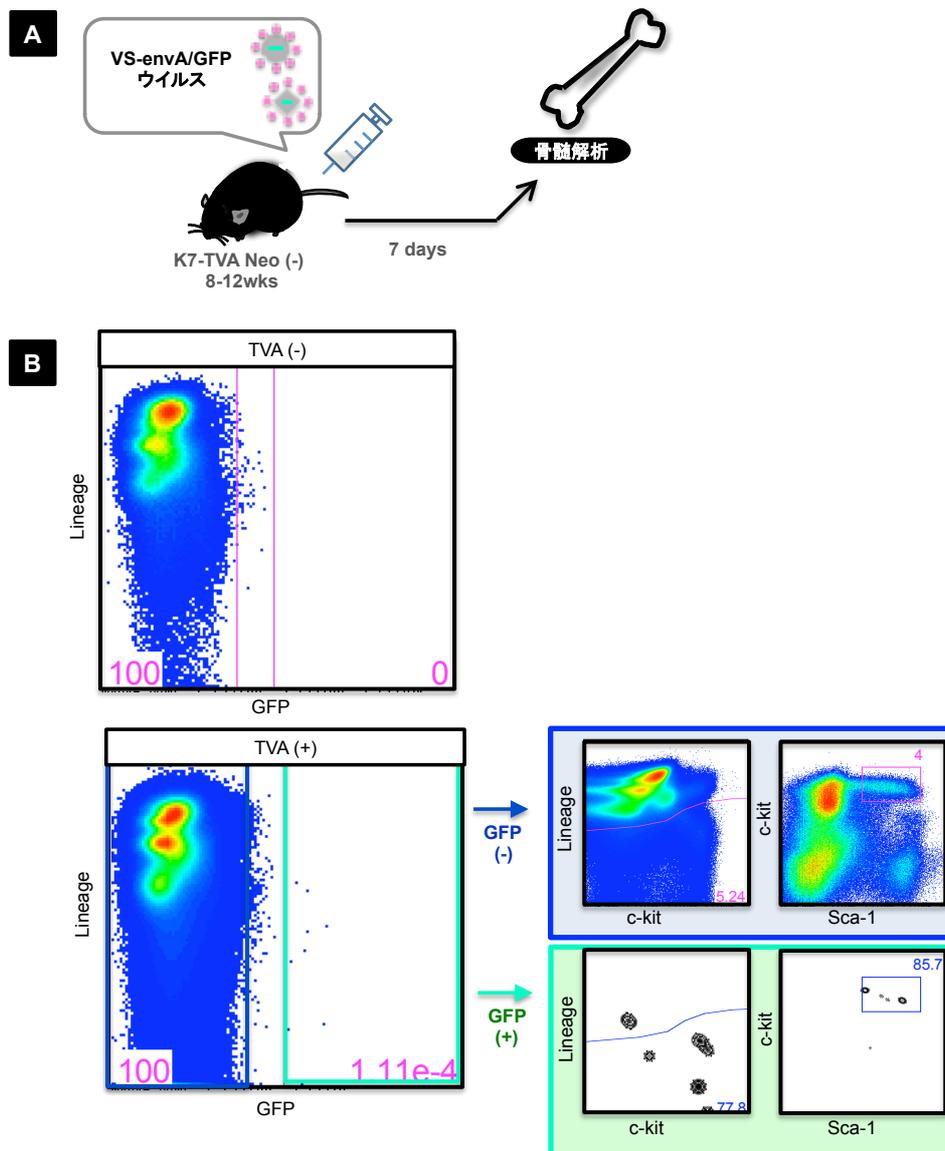


図 21. 成体期 K7-TVA Neo (-)マウスにおける GFP レポーター遺伝子の生体内導入実験。

- A. 実験の流れ。成体期の K7-TVA Neo (-)マウスの尾静脈から Vs-envA/ GFP ウイルスを 3 日間連続で投与し、投与後 7 日目の骨髄細胞をフローサイトメトリーによって解析した。
- B. フローサイトメトリーによる骨髄解析。ウイルス投与したマウスの骨髄をシングルセルにした後、CD34, c-kit, Sca-1, Lineage marker で染色した。

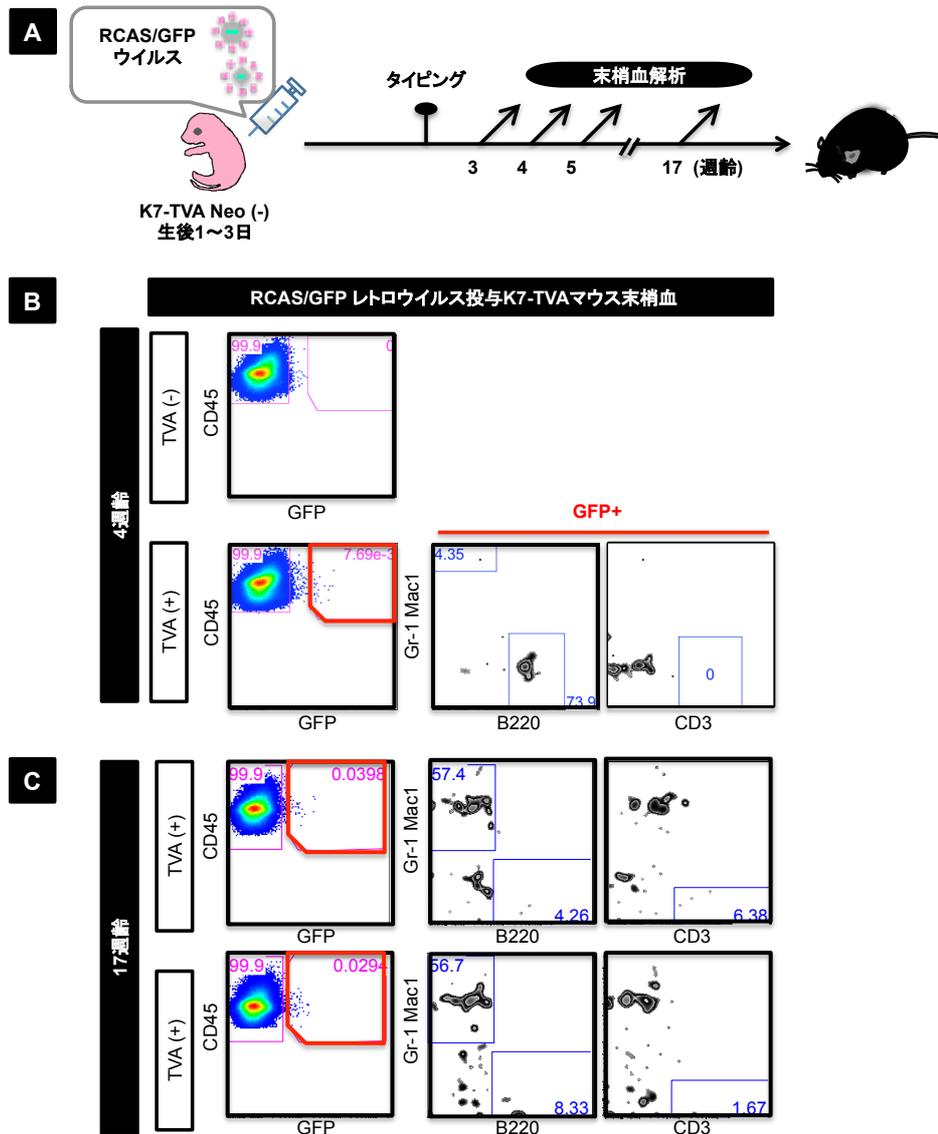


図 22. 新生児期 K7-TVA マウスにおける GFP レポーター遺伝子導入実験。

- A. 生体内遺伝子導入実験の流れ。生後 1～3 日目の新生児の腹腔内に RCAS/GFP レトロウイルスを 2 日間連続で投与した。離乳後、TVA 遺伝子の有無をタイピングし、その後 1~2 週間ごとに末梢血中の GFP 陽性率および分化細胞の割合を解析した。
- B. RCAS/GFP レトロウイルス投与後 4 週後のマウス末梢血のフローサイトメトリー解析。マウス末梢血を採取し、顆粒球(Gr-1, Mac-1: GM)、B 細胞(B)、T 細胞(T)抗体によって染色し、GFP 陽性率とともに各分化細胞の割合を展開した。
- C. ウイルス投与後 17 週後マウス末梢血のフローサイトメトリー解析。

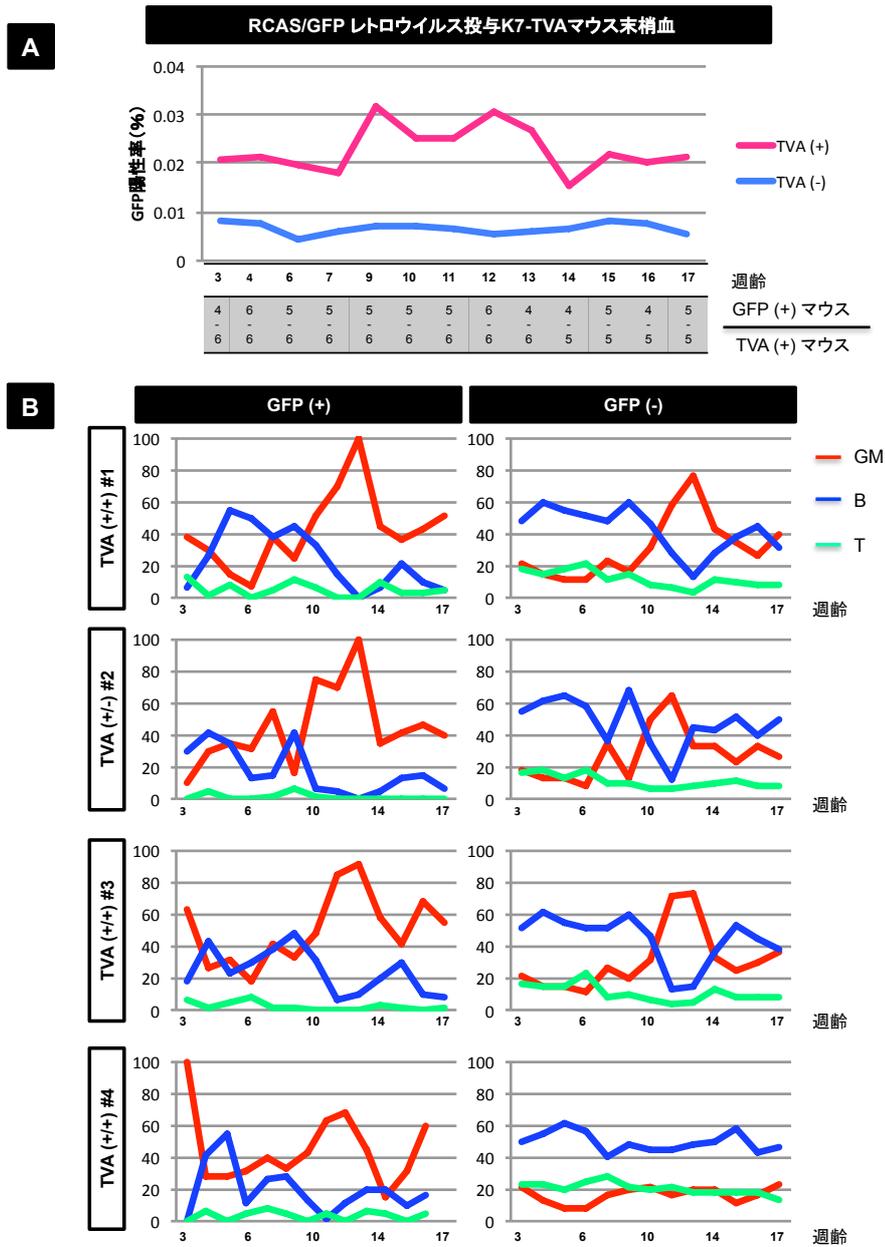


図 23. 新生児期 Evi1-TVA マウスにおける GFP レポーター遺伝子導入実験。

- A. CD45 陽性血液細胞中の GFP 陽性率の推移。各週齢における TVA(+)マウスおよび TVA(-)マウスにおける GFP 陽性率の平均値を示した。下段の表は TVA(+)マウス中末梢血中に GFP 陽性細胞が 0.001%以上 検出されたマウスの数。
- B. GFP 陽性細胞が検出されたマウスにおける末梢血分化細胞の推移。GFP 陽性あるいは GFP 陰性細胞中の顆粒球(GM)、B 細胞(B)、T 細胞(T)の割合を示した。

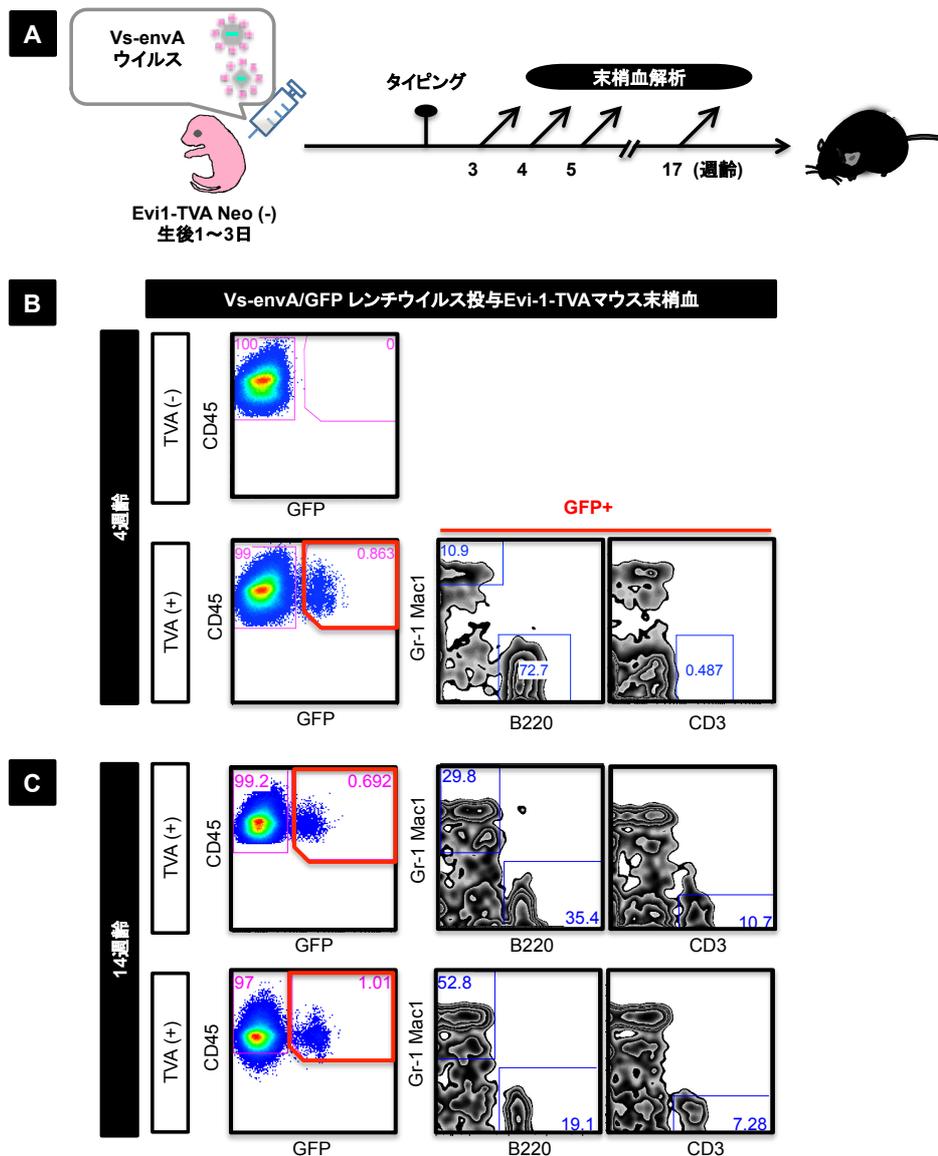


図 24. 新生児期 Evi1-TVA マウスにおける GFP レポーター遺伝子導入実験。

- A. 生体内遺伝子導入実験の流れ。生後 1～3 日目の新生児の腹腔内に Vs-envA/GFP レンチウイルスを投与した。離乳後、TVA 遺伝子の有無をタイピングし、その後 1~2 週間ごとに末梢血中の GFP 陽性率および分化細胞の割合を解析した。
- B. Vs-envA/GFP レンチウイルス投与後 4 週後のマウス末梢血のフローサイトメトリー解析。マウス末梢血を採取し、顆粒球(Gr-1, Mac-1: GM)、B 細胞(B)、T 細胞(T)抗体によって染色し、GFP 陽性率とともに各分化細胞の割合を展開した。
- C. ウイルス投与後 14 週後マウス末梢血のフローサイトメトリー解析。

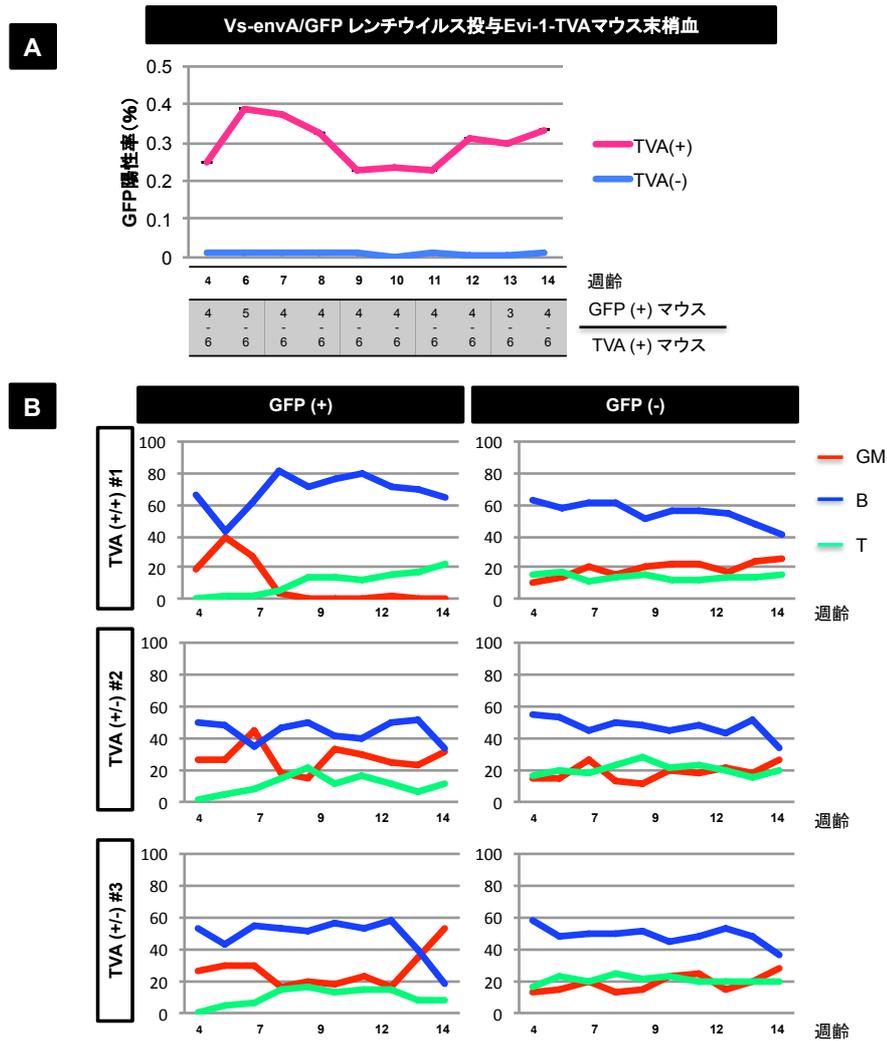


図 25. 新生児期 Evi1-TVA マウスにおける GFP レポーター遺伝子導入実験 (約 8×10^6 virus/マウス)。

- A. CD45 陽性血液細胞中の GFP 陽性率の推移。各週齢における TVA(+)マウスおよび TVA(-)マウスにおける GFP 陽性率の平均値を示した。下段の表は TVA(+)マウス中末梢血中に GFP 陽性細胞が 0.001%以上検出されたマウスの数。
- B. GFP 陽性細胞が検出されたマウスにおける末梢血分化細胞の推移。GFP 陽性あるいは GFP 陰性細胞中の顆粒球(GM)、B 細胞(B)、T 細胞(T)の割合を示した。

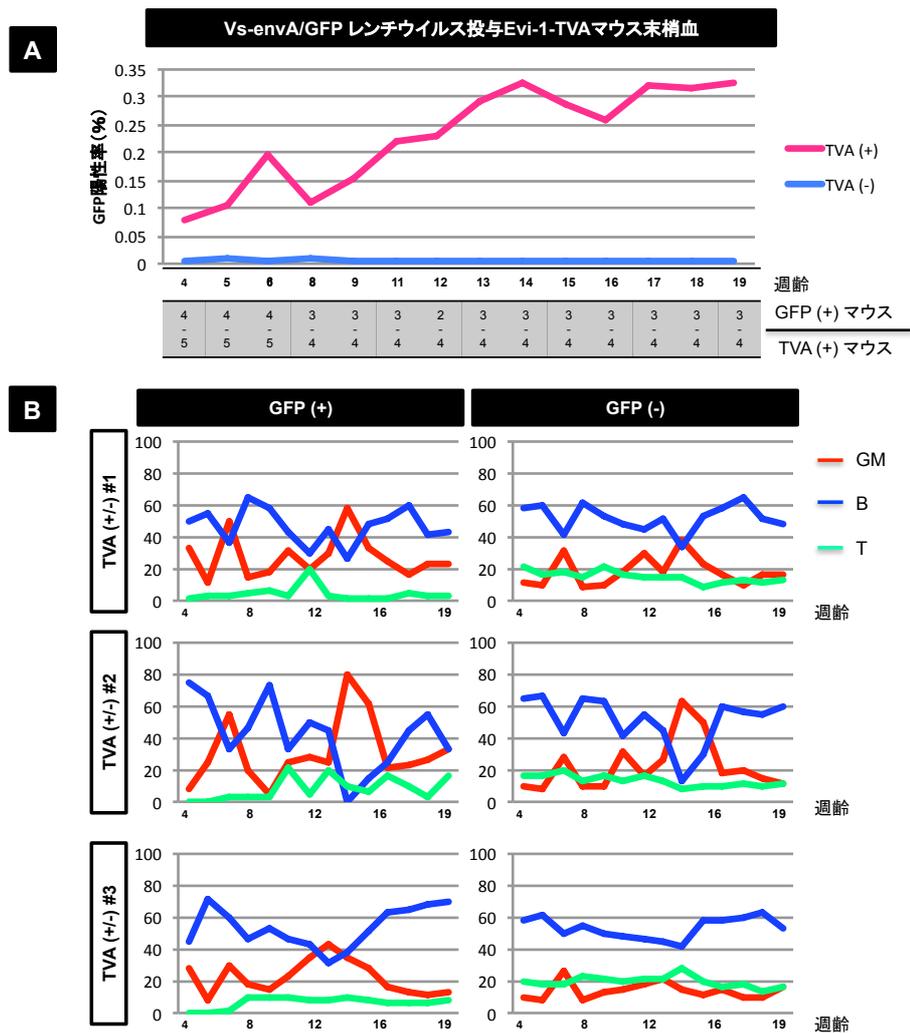


図 26. 新生児期 Evi1-TVA マウスにおける GFP レポーター遺伝子導入実験 (約 2.5×10^6 virus/マウス)。

- A. CD45 陽性血液細胞中の GFP 陽性率の推移。各週齢における TVA(+)-マウスおよび TVA(-)-マウスにおける GFP 陽性率の平均値を示した。下段の表は TVA(+)-マウス中末梢血中に GFP 陽性細胞が 0.001%以上 検出されたマウスの数。
- B. GFP 陽性細胞が検出されたマウスにおける末梢血分化細胞の推移。GFP 陽性あるいは GFP 陰性細胞中の顆粒球(GM)、B 細胞(B)、T 細胞(T)の割合を示した。

A

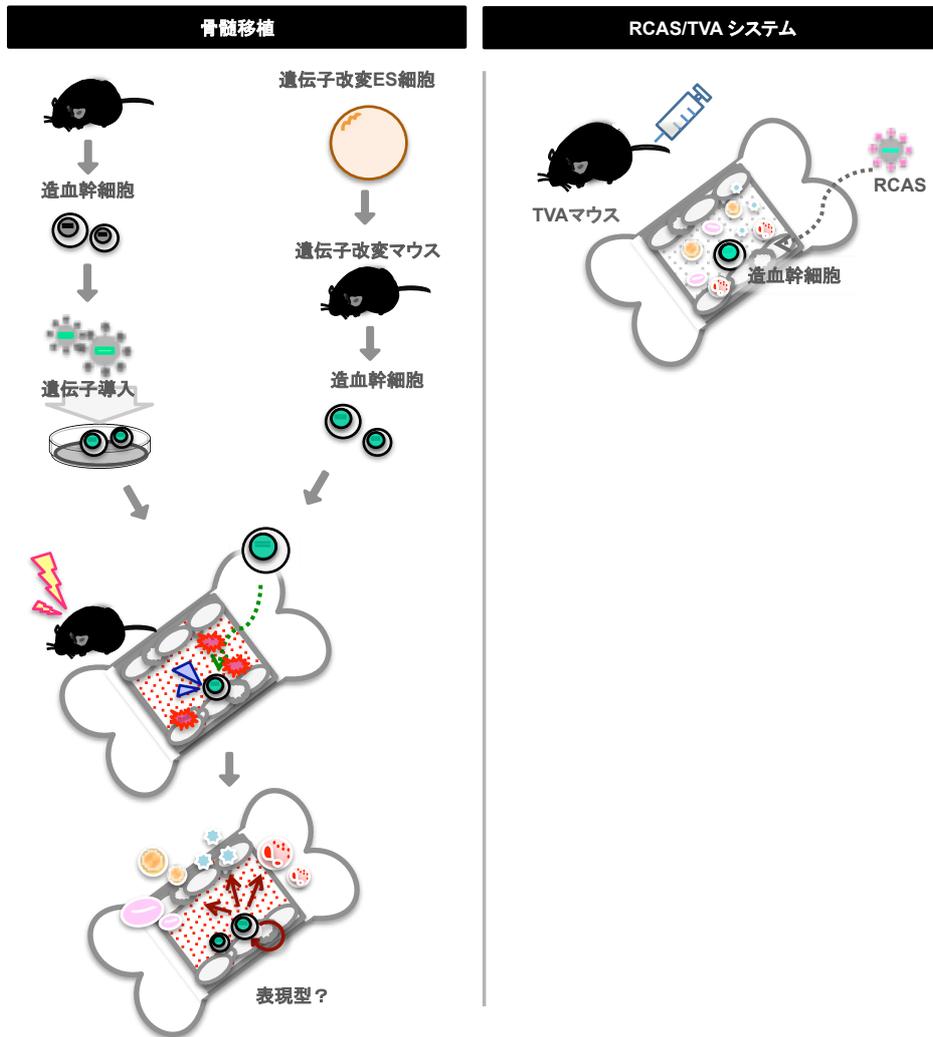
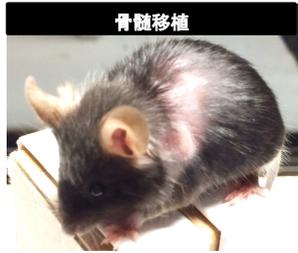


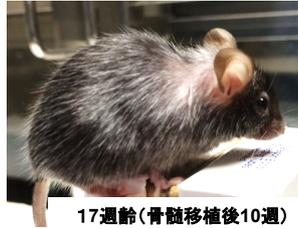
図 27. 骨髄移植法と RCAS/TVA システム。

- A. 従来の骨髄移植法は、遺伝子の機能評価までに多段階のステップが必要であったことに加え、生体外分取や前処置による骨髄ニッチへのダメージ、移植後の強い造血ストレスなど、様々な側面において‘非生理的条件’における解析手法である。RCAS/TVA システムは、ウイルスを投与するのみで、定常状態にある造血幹細胞に特異的に生体内遺伝子導入が可能になる。
- B. 骨髄移植を受けたマウスと RCAS ウイルスによる遺伝子導入を行ったマウス。

B



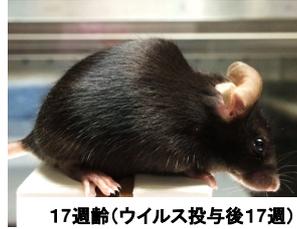
13週齢(骨髄移植後6週)



17週齢(骨髄移植後10週)



13週齢(ウイルス投与後13週)



17週齢(ウイルス投与後17週)

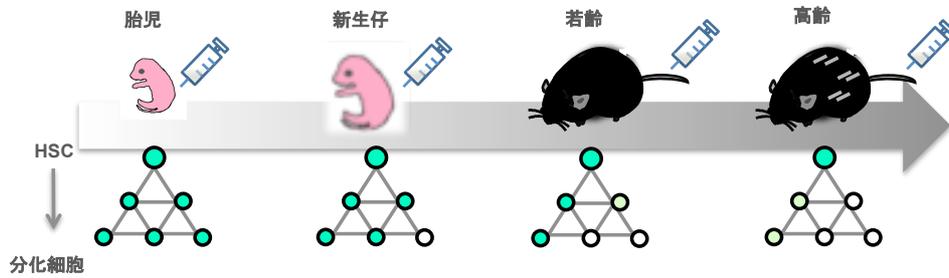
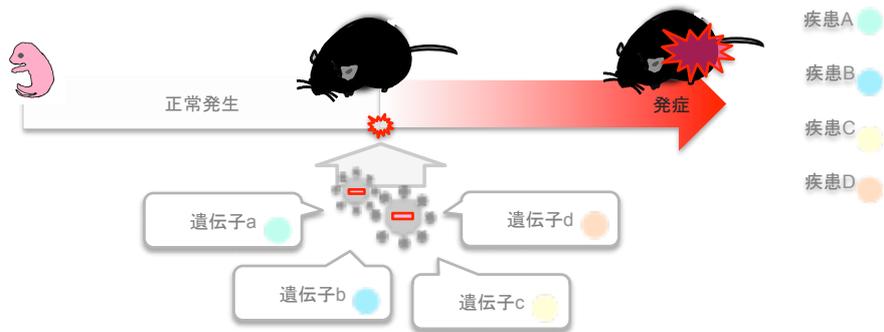
A**発生及び加齢に伴う造血幹細胞の能力変化の観察、遺伝子機能評価****B****血液疾患発症モデルの構築、スクリーニング**

図 28. RCAS/TVA システムの応用

- A. RCAS/TVA システムを利用すれば、生理的条件下にある造血幹細胞で様々な遺伝子機能解析が容易に行えることに加え、異なる発生段階、あるいは加齢に伴う造血幹細胞の能力変化の観察や遺伝子の機能評価をおこなえる可能性がある。
- B. 正常状態で発生、加齢したマウスに任意の段階で疾患遺伝子を導入することによって、より自然発症に近い疾患モデルを構築することも可能である。搭載する遺伝子を変えることで、疾患関連遺伝子のスクリーニングなども容易に行うことができる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として本研究の場を与えて頂いた東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究分野 中内啓光教授に感謝いたします。

本研究の着想および進行を導いて頂いた山崎聡氏、本研究全般にわたり終始ご指導を頂いた伊藤慶一氏、ノックインマウスの作製にご協力いただいた海野あゆみ氏に心から感謝申し上げます。そして、自由で気兼ねない研究環境を提供して頂いた幹細胞治療研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、現在まで温かく見守り、サポートして頂いた家族に心からの感謝の意を表します。