

論文の内容の要旨

論文題目

RCAS/TVA システムの造血研究への応用

田島陽子

【背景と目的】

造血幹細胞は、生体中の全血液細胞を生み出すことができる能力（多分化能）と、多分化能を保ったまま増殖する能力（自己複製能）を兼ね揃えた組織幹細胞である。造血幹細胞はこの 2 種類の能力によって、生体内の血液細胞の恒常性を保っている。生体内に存在する組織幹細胞の中でも、造血幹細胞研究の歴史は最も古く、その存在は最も早くから証明されている (Till, J. and McCulloch, E. *Radiat. Res.* 1961)。その結果、多くの組織幹細胞に共通の基本概念を構築してきた。造血幹細胞が他の幹細胞に先立って研究が進められたのは、生体から容易に分離することが可能であったことに加え、骨髄移植という幹細胞の能力を評価する実験系が存在したからに他ならない。造血幹細胞を含む分画を生体外に取り出し、致死量の放射線照射によって血液細胞を除去したマウスに移植すると、長期にわたって個体の全血液細胞を供給する（長期的骨髄再構築能）(Ema *et al.*, *Nature Protocol*, 2007)。造血幹細胞は長期的骨髄再構築能を示す細胞として定義されることから、幹細胞性の多寡を評価するには、現在でも骨髄移植法が最も強力な解析ツールである (Yamamoto *et al.*, *Cell*, 2013)。一方で、生理的条件下における造血幹細胞の分子機構、さらには造血幹細胞が骨髄中でどのように振る舞っているのかはほとんど明らかになっていない。これは、正常状態で生体内に存在している造血幹細胞を的確に解析する手法がほとんどないことに起因すると考えられる。本研究では、上記のような問題点を解決するために、定常状態の造血幹細胞の動態解析および自己複製と分化の制御機構を解析するための、造血幹細胞特異的な生体内遺伝子導入法を新たに構築することを目的とした。

【方法】

近年、生体内における遺伝子導入法として、トリレトロウイルス由来のベクターを利用した RCAS/TVA システムが皮膚や臓器、神経といった組織で利用されている (von Werder *et al.*, *Nature Protocol*. 2012)。RCAS ウイルスはウイルス膜表面に発現している envA を介して、その受容体である TVA 発現細胞特異的に感染することができる。哺乳類細胞は本来 TVA 遺伝子を有さないことから、特定の組織・細胞特異的に TVA を発現させる遺伝子改変マウスと RCAS ウイルスを用いることで、任意の遺伝子を任意のタイミングで、生体内の特定の細胞に導入することが可能となる。また、miRNA や shRNA を導入することも容易であり、目的に応じて幅広い応用が可能である。上記のような簡便性、柔軟性に着目し、造血幹細胞研究においてこれまでほとんど存在しなかった生体内遺伝子導入法として RCAS/TVA システムを利用することとした (図)。本研究では、造血幹細胞における RCAS/TVA システムの構築にあたり、まず必要だと考えられる材料 (抗 TVA 抗体、RCAS ウイルス、造血幹細胞特異的 TVA 発現マウス) の作製を行った。続いて、これらの材料を用いて生体内遺伝子導入実験を行った。

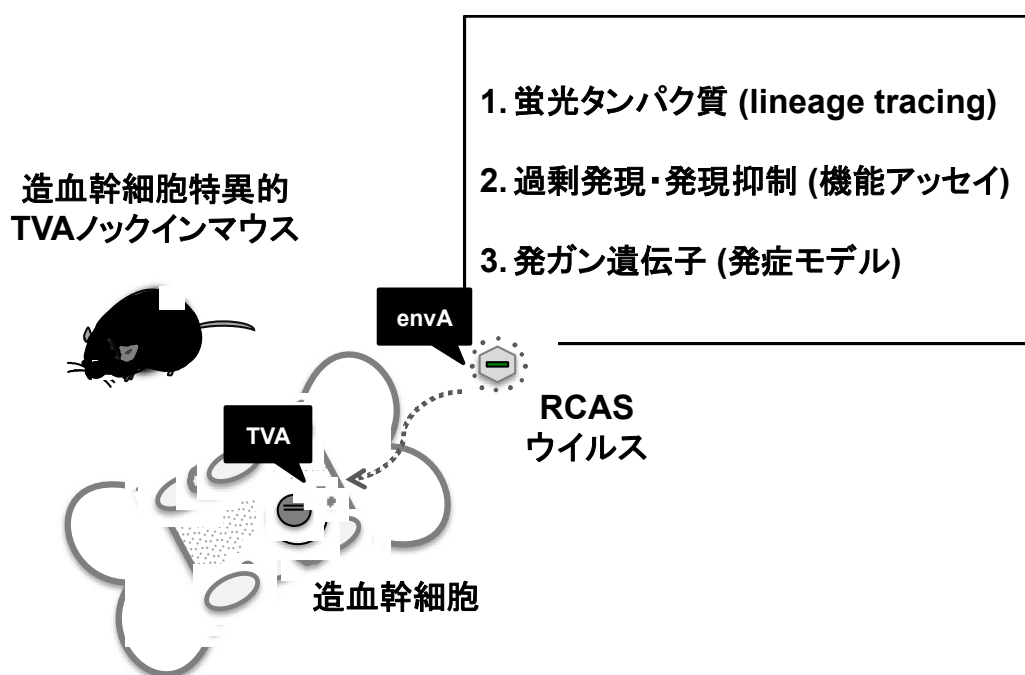


図 造血幹細胞における RCAS/TVA システム

造血幹細胞特異的 TVA knock-in マウスにおいては、RCAS ウイルスを介して任意のタイミングで造血幹細胞に生体内遺伝子導入が可能。TVA 抗体を用いれば容易に造血幹細胞を分取することもできる。

【結果】

1. 抗 TVA モノクローナル抗体の作製

膜タンパク質である TVA を発現する細胞を検出・分取する目的で、これまで作製されていない抗 TVA モノクローナル抗体の作製を試みた。具体的には、TVA を発現するマウス血液細胞株を樹立し、免疫原としてマウスに免疫した。免疫マウスのリンパ節および脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマを作製した。約 400 株のハイブリドーマをスクリーニングした結果、抗 TVA 抗体産生株として7株樹立することに成功した。更に、抗 TVA ハイブリドーマの培養上清から抗 TVA モノクローナル抗体を精製し、精製抗体の TVA 認識能を確認した。

2. RCAS ウイルスおよび envA 型レンチウイルスの作製

本研究では生体内での遺伝子導入システムに用いるウイルスとして、従来から使用されるトリレトロウイルス (RCAS) に加え、骨髄中の静止期にある造血幹細胞に、より効率的に感染させることも考慮して、細胞分裂を介さずに遺伝子導入が可能な改変型レンチウイルスの作製も行った。具体的には、HIV-1 由来のレンチウイルス作製時に、エンベロープタンパク質のみを envA (RCAS ウイルス由来) をコードするベクターに置き換えた envA 型レンチウイルスを作製した。産生された RCAS ウイルスおよび、envA 型レンチウイルスともに TVA 発現細胞特異的に感染性が認められたことから、増殖期および静止期にある細胞どちらにも遺伝子導入可能なツールの作製に成功した。

3. 造血幹細胞特異的 TVA 発現マウスの作製

従来、造血幹細胞の単離には複数の細胞表面抗原に対する抗体を組み合わせ使用しており (例; CD34^{-mid} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lineage marker⁻ (CD34^{-mid}KSL))、幹細胞特異的な発現を示す単一のマーカーの報告は極めて少ない。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、中間径フィラメントであるサイトケラチンファミリーの数種類が造血幹細胞で高く発現していることに着目した。全血球系細胞において 20 種類以上のサイトケラチンファミリーの発現を半定量 PCR および定量 PCR によって解析した結果、*Cytokeratin 7 (Krt7)* が造血幹細胞分画に最も特異的に発現することを見出した。この結果は、in droplet 免疫染色法、および蛍光タンパク質ノックイン ES 細胞由来のキメラマウスの解析によっても確認された。そこで、*Krt7* 遺伝子座の終止コドン部分に、自己切断ペプチド T2A につないだ TVA をコードする配列を挿入した CK7-TVA knock-in ES 細胞を作製した。この ES 細胞をマウス胚盤胞に注入し、CK7-TVA knock-in マウスを作製した。また近年、血液細胞において転写因子 Evi-1 が造血幹細胞特異的な発現を示すことが報告されている。その為、*Krt7* と同様に、*Evi-1* 遺伝子座

に TVA を knock-in した ES 細胞およびマウスを作製した。

4. 生体内遺伝子導入

CK7-TVA knock-in マウスおよび Evi-1-TVA knock-in マウスの新生児期に GFP 蛍光レポーターを搭載した RCAS レトロウイルスあるいは envA 型レンチウイルスを投与すると、生後 3 週目のマウス末梢血において GFP の蛍光を発する顆粒球、B 細胞、T 細胞が検出された。GFP 陽性の末梢血分化細胞はその後 4 ヶ月以上の長期にわたって検出され続けた。また、成体の CK7-TVA knock-in マウス尾静脈に envA 型レンチウイルスを投与し、投与後 1 週間後の骨髄を解析すると、未分化な血液細胞分画に GFP 陽性細胞が検出された。これらのことから、新生児期および成体期の TVA 陽性の造血幹細胞あるいは血液前駆細胞に生体内遺伝子導入が成功したと考えられた。

【考察】

本研究では、造血幹細胞における生体内遺伝子導入法として RCAS/TVA システムの導入を試みた。作製した TVA knock-in マウスおよび蛍光レポーターを搭載したウイルスを用いて生体内遺伝子導入を試みたところ、蛍光を有する血液分化細胞が多系統に、長期にわたって検出され続けた。このことから、これまで骨髄移植によって定義されてきた幹細胞集団に、非ストレス条件下で生体内遺伝子導入することが可能になったと考えられる。

一方で、今後、感染した細胞が幹細胞であることの証明、また標識がクローナルであるかの検証が必要である。特に CK7 に関しては造血幹細胞分画 (CD34^{mid}KSL) に限局した発現が認められたものの、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。

この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。さらに、正常状態で発生、加齢してき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り、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。

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。これらの遺伝子を用いて TVA knock-in マウスを作製すれば、より造血幹細胞研究に特化したシステムになると考えられる。