

## 120. Ca 結合タンパク質 Efp による血球・免疫系制御の解析

岡本 一男

\*東京大学 大学院医学系研究科 免疫学教室

Key words : 赤血球, T 細胞, B 細胞, 造血, 免疫

### 緒言

赤血球は末梢組織に酸素を供給する、生命維持に必須の血液成分である<sup>1)</sup>。近年ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) やヒト臍帯血造血幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた再生医療の実現化が重要視される中、こうした多能性/全能性幹細胞を生体外にて個々の造血系細胞へと分化誘導できる培養系を構築することが、血液疾患患者への治療法確立に向けて急務とされている。特に赤血球については、血液型さえ合致すれば必ずしも自己由来である必要がないため、早期の臨床応用が期待されている。現在国内外にて多能性/全能性幹細胞から生体外にて赤血球へ分化誘導する手法について研究が進められているものの、実用化という観点からすると未だ十分とはいえない。従って造血幹細胞から赤血球への運命決定に関わる分子機構について理解を深めることは、血液再生医療技術の発展に向けて重要な課題である。私は、Ca<sup>2+</sup>結合ドメインである EF-hand motif を有する分子 (EF-hand protein: Efp と称する) が、血球系・免疫系にて高く発現していることを見出し、遺伝子欠損マウスを用いてその生理的意義を検討したので報告する。造血細胞系統特異的 *Efp* 遺伝子欠損マウス、及びリンパ球系特異的 *Efp* 遺伝子欠損マウスを新規に作製し、それらの遺伝子改変マウスの解析から、Efp は免疫細胞の中でも赤血球形成に特異的に機能する必須因子であることを明らかにした。

### 方法

*Efp* 遺伝子のエクソン領域が Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟まれた、*Efp* floxed マウスを作製し、造血細胞系統で Cre が発現する Cre トランスジェニック (TG) マウスと交配させ、造血系統特異的 *Efp* 遺伝子欠損マウスを作製した。赤血球や血小板、リンパ球などの造血障害を検討し、Efp の生理的意義を明らかにした。また T 細胞特異的に Cre を発現する Cre TG マウス、および B 細胞特異的に Cre を発現する Cre TG マウスとの交配により、T 細胞特異的 *Efp* 欠損マウス及び B 細胞特異的欠損マウスを作製し、各種リンパ球分化における Efp の機能を検討した。

### 結果および考察

1. 造血細胞特異的 *Efp* 遺伝子コンディショナルノックアウト (conditional knockout: CKO) マウスの作製および解析

*Efp* 遺伝子のエクソン領域が Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟まれた、*Efp* floxed マウスを作製した。まず  $\beta$ -actin Cre TG マウスとの交配により、全身性に片アレルのみ遺伝子欠損させた *Efp*<sup>+/ $\Delta$</sup>  マウスを作製した。この *Efp*<sup>+/ $\Delta$</sup>  マウスを *Vavi*Cre (iCre: codon-improved Cre recombinase) TG マウス<sup>2)</sup> と掛け合わせ、*Efp*<sup>+/ $\Delta$</sup>  *Vavi*Cre マウスを作製した。*Vavi*Cre マウスは、造血細胞細胞特異的に Cre が発現する TG マウスである。したがって、*Efp*<sup>+/ $\Delta$</sup>  *Vavi*Cre マウスと *Efp*<sup>lox/flox</sup> マウスを交配させることで得られる「*Efp*<sup>lox/ $\Delta$</sup>  *Vavi*Cre マウス」は、造血細胞特異的に *Efp* 遺伝子が欠損された CKO マウスとなる。大変興味深いことに、当該 *Efp* CKO マウス (*Efp*<sup>lox/ $\Delta$</sup>  *Vavi*Cre マウス) はメンデルの法則に従い出生するものの、皮膚の明らかな蒼白化が認められ、生後 0 日齢 (P0 齢) で死亡することが判明した (図 1)。そこで胎仔期における造血細胞特異的 *Efp* 欠損マウスを解析したところ、胎生期 E13.5~E14.5 までは造血細胞特異的 *Efp* 欠損マウスは外見上の異常が認められないが、E18.5 齢では皮膚の蒼白化が観察され、胎生期後期より貧血症状を呈するものと示唆された。

\*現所属：東京大学 大学院医学系研究科 骨免疫学寄付講座

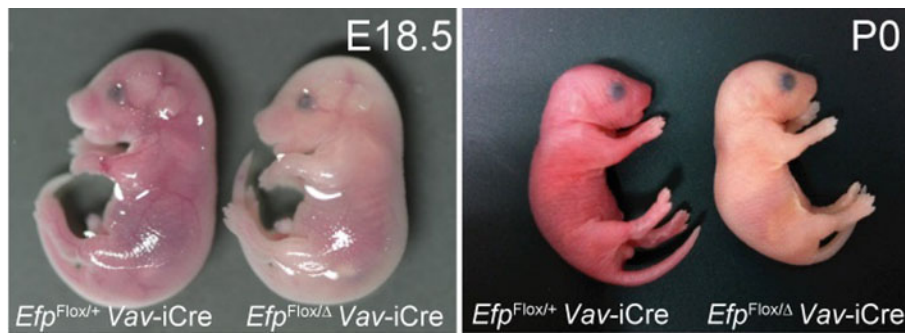


図1. 造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスは皮膚の蒼白化が認められる

胎生期 E18.5 齢 (左) および、生後直後 (P0 齢: 右) の造血細胞特異的 *Efp* CKO マウス (*Efp*<sup>Flox/Δ</sup> *Vav-iCre*) では、皮膚の明らかな蒼白化が認められ、重度の貧血を呈していることが示唆された。*Efp*<sup>Flox/+</sup> *Vav-iCre* マウスは、同腹コントロールマウスである。

P0 齢の造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスより末梢血を採取し、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数を解析した。造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスでは、赤血球数の低下、ヘモグロビン量の低下、ヘマトクリット値の低下が認められたが、血小板数は同腹コントロールマウスと差異が認められなかった (図2)。さらに血液塗抹標本作製し、メイギムザ染色による細胞診を行ったところ、赤血球数が著しく減少し、有核赤芽球が多く認められた。

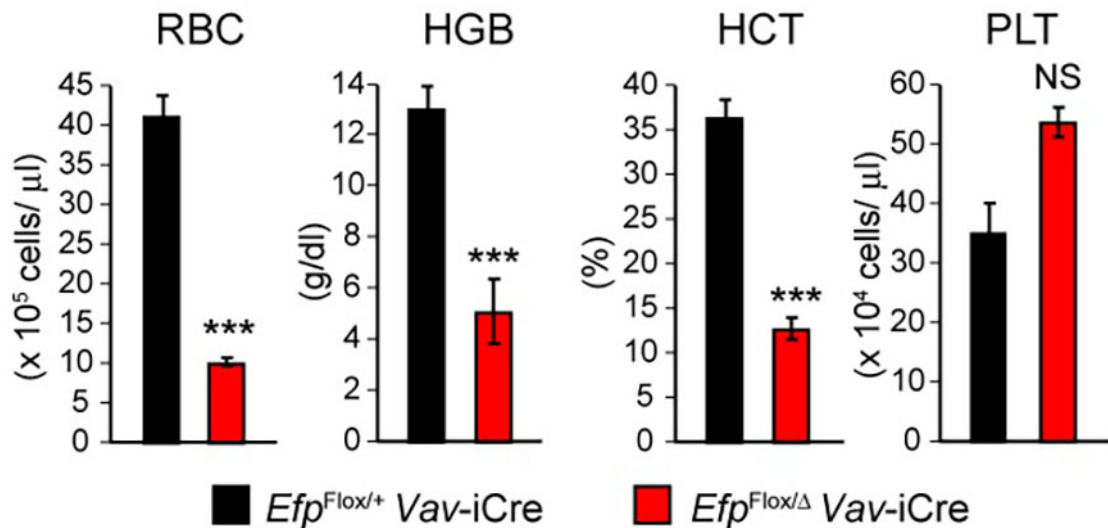


図2. 造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスは貧血を呈する

生後0日齢 (P0 齢) の造血細胞特異的 *Efp* CKO マウス (*Efp*<sup>Flox/Δ</sup> *Vav-iCre*) および同腹コントロールマウス (*Efp*<sup>Flox/+</sup> *Vav-iCre*) より血液を採取し、赤血球数 (red blood cell: RBC)、ヘモグロビン量 (hemoglobin: HGB)、ヘマトクリット値 (hematocrit: HCT)、血小板数 (platelet number: PLT) を解析した。造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスでは、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の低下が認められた。一方、血小板数には同腹コントロールマウスと有意な差が認められなかった。統計処理: unpaired two-tailed Student's t test, \*\*\*P<0.005, NS: not significant。

フローサイトメーターを用いた各種血液細胞・免疫細胞マーカー (CD45、CD71、Ter119、CD3、B220、CD11b) の発現解析を実施した。造血細胞特異的 *Efp* 欠損マウスの末梢血では、Ter119 陽性 CD71 陽性赤芽球が異常に集積していることが判明した。一方で、CD3 陽性 T リンパ球集団、B220 陽性 B リンパ球集団、CD11b 陽性骨髄・単球系細胞集団の割合に関しては、有意な差が認められなかった (図3)。以上より、造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスの出生直後の死亡要因は重篤な貧血に起因するものと示唆された。

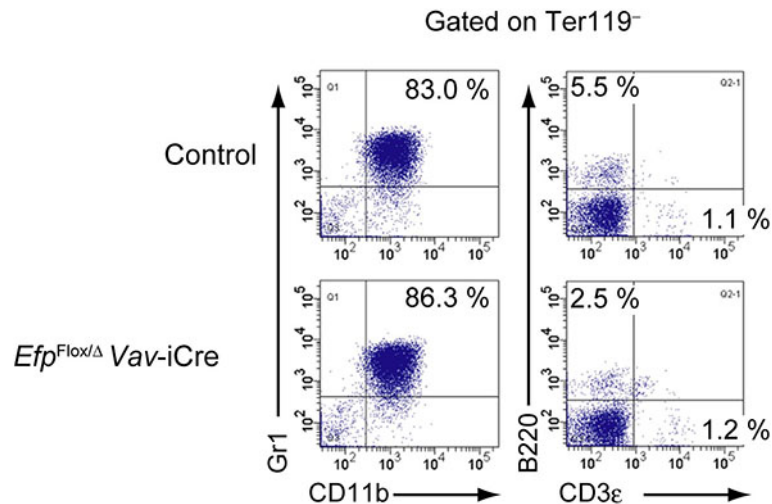


図3. 血細胞特異的 *Efp* CKO マウスにおける T 細胞、B 細胞、骨髄・単球系細胞の割合

生後0日齢 (P0 齢) の造血細胞特異的 *Efp* CKO マウス (*Efp*<sup>fllox/Δ</sup> Vav-iCre) および同腹コントロールマウス (*Efp*<sup>fllox/+</sup> Vav-iCre、および *Efp*<sup>fllox/+</sup>) より血液を採取し、フローサイトメトリーにより CD3 陽性 T リンパ球集団、B220 陽性 B リンパ球集団、CD11b 陽性骨髄・単球系細胞集団の割合を解析した。いずれの細胞集団においても同腹コントロールマウスと比べて有意な差は認められなかった。

さらに成体の骨髄造血における *Efp* の重要性を検証するため、造血細胞特異的 *Efp* CKO マウスの胎仔肝細胞を用いたキメラマウスを作製し、移入後7週目の末梢血を解析した。当該キメラマウスでは赤血球数の低下、ヘモグロビン量の低下、ヘマトクリット値の著明な低下が認められた。また骨髄及び脾臓には未熟な Ter119 陽性 CD71 陽性赤芽球が多く観察され、赤血球形成に障害が生じていることが確認できた。したがって成体においても *Efp* が赤血球形成に重要であることが明らかとなった。さらに、*Efp* 欠損胎仔肝細胞を用いたキメラマウスでは、骨髄と脾臓内の B 細胞、および脾臓内の T 細胞の数も減少しており、*Efp* 欠損によりリンパ球減少を引き起こすことが示唆された。

## 2. T 細胞および B 細胞特異的 *Efp* CKO マウスの解析

*Efp* は T 細胞および B 細胞でも発現が認められることから、*Efp* がリンパ球分化を制御している可能性が示唆された。そこで、T 細胞特異的に Cre を発現する TG マウス (Lck-Cre マウス)<sup>3)</sup> と *Efp*<sup>fllox/fllox</sup> マウスを交配させ、T 細胞特異的 *Efp* CKO マウスを作製した。胸腺における CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative 細胞、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive 細胞、CD4<sup>+</sup> single positive 細胞、CD8<sup>+</sup> single positive 細胞、さらに脾臓・リンパ節中の CD4<sup>+</sup>ないしは CD8<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞の、細胞数と割合を検討したが、いずれも同腹コントロールマウスと差異が認められなかった。つぎに、B 細胞特異的に Cre を発現する TG マウス (Mb1-Cre マウス)<sup>4)</sup> と *Efp*<sup>fllox/fllox</sup> マウスを交配させ、B 細胞特異的 *Efp* CKO マウスを作製した。骨髄における pre-pro B、proB、preB、成熟 B 細胞、さらに脾臓・リンパ節中の成熟 B 細胞、末梢血中の各種免疫グロブリンクラスを解析したが、いずれも同腹コントロールマウスと差異が認められなかった。以上より、*Efp* はリンパ球でも発現しているが、その分化には必須ではないことが判明した。*Efp* 欠損胎仔肝細胞を用いたキメラマウスで認められたリンパ球減少の表現型は、骨髄・脾臓での未熟赤芽球の異常な集積による副次的影響の結果であると考えられた。

以上の研究より、*Efp* は免疫細胞の中でも赤血球形成に特異的に機能する必須因子であることが明らかとなった。EF-hand motif を有する分子としてこれまで 60 種類以上同定されており、calcineurin に代表されるように、その多く

が細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルトランスデューサーとして機能している。しかしながら、*Efp* CKO マウスの表現型に類似する遺伝子欠損マウスは報告されておらず、*Efp* は全く新しい Ca<sup>2+</sup>シグナルトランスデューサーの機能を有していると考えられている。

現在、*Efp* による赤血球分化の制御機構について分子レベルでの解析を進めている。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科免疫学の高柳広、井上真以亜、奥濱絢子、東京医科歯科大学医学総合研究科分子情報伝達学の中島友紀である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(7):543-55. doi: 10.1038/nrc1648. PubMed PMID: 15965494.
- 2) de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, et al. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *European journal of immunology*. 2003;33(2):314-25. doi: 10.1002/immu.200310005. PubMed PMID: 12548562.
- 3) Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, et al. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*. 2001;15(5):763-74. PubMed PMID: 11728338.
- 4) Hobeika E, Thiemann S, Storch B, Jumaa H, Nielsen PJ, Pelanda R, et al. Testing gene function early in the B cell lineage in *mb1-cre* mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(37):13789-94. doi: 10.1073/pnas.0605944103. PubMed PMID: 16940357; PubMed Central PMCID: PMC1564216.