

## 学位論文題名

レチノイン酸受容体 RAR  $\alpha$  の過剰発現による  
マウス正常骨髄細胞の分化にあたえる影響

## 学位論文内容の要旨

活性化ビタミンAであるレチノイン酸(RA)は細胞の増殖, 分化に対しRA特異的な核内受容体を介して幅広い生物学的活性を発揮する。現在までにRAの核内受容体としてRAR群( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ )とRXR群が同定されている。血液細胞の分化においてもRAおよびRAR $\alpha$ の影響が注目されている。例えば前骨髄球性白血病細胞株 HL-60に対するRAのRAR $\alpha$ を直接介した分化脱癌作用や, 大多数の急性前骨髄性白血病(APL)の患者がRAR $\alpha$ 遺伝子を含む染色体異常を示すことや, all-*trans* RAがAPLの白血病細胞を最終的な成熟細胞へと分化誘導することなどがあげられる。しかし, その正確な作用機序については不明な点が多く, RAおよびRAR $\alpha$ の正常骨髄細胞の分化に対する影響を*in vitro*で解析した報告はない。本研究ではマウス正常骨髄細胞の分化におけるRAおよびRAR $\alpha$ の影響を解析するために, レトロウイルスベクターを用いて, マウス正常骨髄細胞にヒトRAR $\alpha$  (hRAR $\alpha$ )の遺伝子を導入し, ストローマ細胞株(PA6-neo)上で, 薬剤耐性マーカー(Neo<sup>r</sup>)にて感染細胞を選別し, その感染細胞の動態をすべて*in vitro*の系で解析, 検討した。

【材料と方法】hRAR $\alpha$  cDNAをレトロウイルスベクター(pM5neo)に組み込みリコンビナントレトロウイルスベクター pM5neoRAR $\alpha$ を作成した。pM5neoおよびpM5neoRAR $\alpha$ をpackaging細胞株ある $\psi$ CREにリン酸カルシウム法にて導入し, 高力価を示したウイルス産生細胞株を樹立した。各々を $\psi$ control (ウイルス力価  $4 \times 10^5$  CFU/ml),  $\psi$ RAR $\alpha$  ( $8 \times 10^5$  CFU/ml)とした。血液幹細胞群として約8週令のC57BL/6マウスより正常骨髄細胞を採取し, lineage marker(抗Mac-1抗体, 抗B220抗体, 抗赤血球抗体, 抗CD4, CD8抗体)および抗c-kit抗体(ACK4)にて染色し, lineage<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞群を分取した。2Gyの放射線照射したウイルス産生細胞株上で血液幹細胞群をポリブレン(5 $\mu$ g/ml), リコンビナントIL3(50U/ml)およびstem cell factor(SCF 100ng/ml)の存在下で一昼夜共培養した。培養2日目にストローマ細胞株であるPA6-neoを加え, 4日目にG418(250 $\mu$ g/ml)およびSCF(100ng/ml)を含む培養液に交換した。G418の存在下で12日から14日間培養し, 生存細胞をウ

イルス感染細胞として、その動態を解析、検討した。

【結果】1. マウス正常骨髄細胞へのウイルス感染実験：マウス正常骨髄細胞に $\psi$  controlウイルスを感染させ、PA6-neo上で長期培養を行ったところ、G418存在下で20日から40日間生存が可能であった。ウイルス感染操作を行っていない骨髄細胞はG418存在下ではほぼ7日目で全て死滅した。ウイルス感染細胞のNeo<sup>r</sup>遺伝子の発現をNorthern blot法にて確認した。

また、培養系にIL7(200U/ml)を加えることにより、ウイルス感染細胞からのB細胞の出現を抗B220抗体を用いたフローサイトメトリーにて確認した。

2. マウス正常骨髄細胞への $\psi$  RAR $\alpha$ ウイルス感染実験：マウス正常骨髄細胞に $\psi$  RAR $\alpha$ ウイルスを感染させ、その発現をNorthern blot法にて確認した。M-G染色による形態学的検索では $\psi$  control感染細胞は大部分が成熟した顆粒球であるのに対し、 $\psi$  RAR $\alpha$ 感染細胞では細胞質内に微細な顆粒を認め、核が粗である前骨髄球様の細胞を多数を認めた。これらの細胞はMPO染色が陽性であった。感染細胞の表面抗原をACK4とMac1で展開すると $\psi$  RAR $\alpha$ 感染細胞ではc-kit陽性細胞の頻度が増加していた。両培養系におけるマクロファージの数、その形態に変化を認めなかった。

培養12日目頃の骨髄培養系にRA( $10^{-6}$ M)を加えたところ、 $\psi$  control感染細胞では細胞数や形態学的に変化を認めなかったが、 $\psi$  RAR $\alpha$ 感染細胞では細胞数が激減し、感染細胞は成熟顆粒球へと分化する傾向を示した。このこと確かめるために、G418存在下培養12日目の感染細胞を用い、RA( $10^{-6}$ M)の有無でIL3コロニーアッセイを行った。 $\psi$  control感染細胞におけるコロニー数はRAの存在下で若干の増加を認めたが、 $\psi$  RAR $\alpha$ 感染細胞では著明にRA存在下でそのコロニー数を低下させた。また、各々のコロニーを独立に回収し、M-G染色を行いその内訳を解析した。両感染細胞の顆粒球系、単球系コロニーの出現頻度に著明な差を認めないが、顆粒球系コロニーを構成する細胞が $\psi$  control感染細胞では成熟した顆粒球が大部分を占めるのに対し、 $\psi$  RAR $\alpha$ 感染細胞ではその構成細胞が未熟な細胞で占められ、成熟した顆粒球が極端に減少していた。さらにRA存在下でその傾向が緩和され、顆粒球系コロニーに多数の成熟顆粒球を認めた。単球系のコロニーでは構成する細胞に変化を認めなかった。

【考案】本研究ではレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法とマウス長期骨髄培養法を併用することで、遺伝子導入率がきわめて低いとされている血液細胞に外来遺伝子を導入し、薬剤耐性マーカーを用いてストローマ細胞株上でウイルス感染細胞を選択し、その動態をすべて*in vitro*の系で解析することができた。ウイルス感染細胞がIL7の存在下でB細胞へも分化したことから、ウイルス感染は非常に未熟な細胞にも可能であり、感染自体によっても細胞の増殖、分化に多大な影響を与えないことが分かった。本研究における血液細胞への外来遺伝子導入法は正常骨髄細胞の分化に関わる遺伝子の解析には非常に有用な系を思われた。

本研究ではこの系を用いてRAR $\alpha$ の正常骨髓細胞に対する影響を*in vitro*で解析した。hRAR $\alpha$ を過剰に発現したマウス骨髓細胞は顆粒球系の分化過程が未熟な段階（前骨髓球）で抑制されていた。さらにその抑制傾向は高濃度のRAの投与により回復し、未熟な細胞は最終的には成熟顆粒球へと分化した。長期骨髓培養およびIL3コロニーにおけるマクロファージの動態に変化を認めないことから、RAR $\alpha$ は顆粒球系の分化に対して重要な役割を演じていることが示唆された。RAR $\alpha$ の過剰発現が顆粒球系の分化過程を未熟な段階で抑制したことに関しては下記のように推論した。RAR $\alpha$ はRAと結合することで活性化され、二量体を形成し、転写因子として標的遺伝子の転写調節領域内にあるRAR反応配列に直接結合し、その発現を誘導する。しかし、RAR $\alpha$ が転写因子として作用するためにはRXRと結合して、RAR $\alpha$ /RXRの二量体を形成することが重要であり、RAR $\alpha$ /RAR $\alpha$ の二量体ではRAR反応配列に結合できず、標的遺伝子の発現を誘導できない。RAR $\alpha$ を過剰に発現している骨髓細胞ではRAが結合したRAR $\alpha$ のほとんどはRAR $\alpha$ /RAR $\alpha$ の二量体を形成し、顆粒球系の分化に必須な遺伝子の発現を誘導するRAR $\alpha$ /RXRの二量体を形成できないこととなる。そこに $10^{-6}$ Mという生理的濃度の約 $10^3$ 倍高濃度のRAを投与することにより比率的には低いながらもRAR $\alpha$ /RXRが形成され、転写因子として作用し、顆粒球系の分化に必須な遺伝子の発現を誘導し、骨髓細胞は最終的な成熟顆粒球へと分化したと考えられた。今後は正常骨髓細胞内でRAR $\alpha$ とRXRが実際に二量体を形成しているのか、さらにはこの二量体が誘導する遺伝子を解明することで血液細胞の分化の機構がより一層明確にされたいと思われた。

#### 【結語】

- 1)レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法と長期骨髓培養法の併用により、マウス正常骨髓細胞に外来遺伝子を導入し、ウイルス感染細胞を長期に*in vitro*の系で解析することができた。
- 2)hRAR $\alpha$ を過剰に発現したマウス骨髓細胞はその顆粒球系の分化過程を未熟な段階で抑制される傾向にあり、高濃度のRAの投与によりその抑制傾向が緩和される傾向にあった。
- 3)マクロファージ系に変化を認めないことから、RAR $\alpha$ は顆粒球系細胞の分化に対して重要な役割を演じていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

## 学 位 論 文 題 名

### レチノイン酸受容体 RAR $\alpha$ の過剰発現による マウス正常骨髄細胞の分化にあたえる影響

活性化ビタミンAであるレチノイン酸(RA)は、RA特異的な核内受容体(RAR)を介して幅広い生物学的活性を有することが知られている。近年、白血病細胞の遺伝子解析から、血液細胞の分化に対してもRAR  $\alpha$ が重要な影響をおよぼすことが知られてきた。しかし、その作用機序に関してはいまだ不明な点が多く、現在各方面から種々の解析が行われている。本研究ではまずレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法とマウス長期骨髄培養法を併用することで、遺伝子導入率がきわめて低いとされている正常血液細胞に外来遺伝子を導入し、ストローマ細胞株上で薬剤耐性マーカー(Neo<sup>r</sup>)を用いてウイルス感染細胞を選択し、その動態をすべて *in vitro*で解析できる系を確立した。次にこの実験系を用いることでマウス正常骨髄細胞にヒトRAR  $\alpha$  cDNA(hRAR  $\alpha$ )を導入し、その感染細胞の動態を解析することで、血液細胞の分化に対するRAおよびRAR  $\alpha$ の影響を検討した。

ウイルス感染によりNeo<sup>r</sup> 遺伝子を獲得した骨髄細胞はneomycinのアナログであるG418存在下でも長期骨髄培養が可能であり、IL7の添加によりB細胞へも分化することが可能であった。このことはレトロウイルス感染が非常に未熟な細胞にも可能であり、感染自体によっても細胞の増殖、分化に多大な影響を与えないことを示唆していると思われた。次にこの実験系を用いることで正常骨髄細胞に対するhRAR  $\alpha$ の影響を *in vitro*で解析した。ウイルス感染によりRAR  $\alpha$ を過剰に発現したマウス骨髄細胞は顆粒球系の分化過程が未熟な段階(前骨髄球)で抑制される傾向にあった。さらにその抑制傾向は高濃度のRAの投与により回復し、未熟な細胞は最終的には成熟顆粒球へと分化した。IL3コロニーアッセイにおいても顆粒球系コロニーはその大部分が未熟な細胞群によって占められており、高濃度のRA

によってコロニーを形成する細胞は成熟顆粒球へと変化した。1個のコロニーが1個のIL3反応細胞より形成されることを考えれば、RAR $\alpha$ の過剰発現が骨髓球の分化過程を未熟な状態で停止させていると考えられ、長期骨髓培養およびIL3コロニーにおけるマクロファージの動態に変化を認めないことから、RAおよびRAR $\alpha$ は顆粒球系の分化にたいして重要な役割を演じていることは明白と考えられる。本研究はRAR $\alpha$ 遺伝子の異常と関連性の高い前骨髓性白血病の病態解析に有用な示唆を与えるものであり、さらにこのような*in vitro*の実験系を用いることで血液分化に関与すると考えられる各種遺伝子の機能的解析が一層進むことが想定される。

これらの観点から本論文は学位論文として評価しうるものと判断された。副査の西、葛巻両教授との間で各数問の質疑があり、又その後個別的にも審査を受けたが、いずれも適正な応答を得たと判断され、合格と判定された。