

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19689020

研究課題名（和文） AML1 遺伝子の NKT 細胞に対する機能解析と臨床応用への基礎的検討

研究課題名（英文） Functional assays of AML1 function on NKT cells and basic consideration for clinical application

研究代表者

浅井 隆司（ASAI TAKASHI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10376436

## 研究成果の概要：

AML1/Runx1 は急性骨髄性白血病においてしばしば観察される t(8;21)転座に関与する Runt ファミリーに属する転写因子である。ノックアウトマウスの解析から AML1 が成体型造血のマスターレギュレーターであることが明らかにされてきたが、私達は Cre-LoxP システムを用いた AML1 コンディショナルノックアウトマウスの作製に成功し、各血球系における AML1 の多彩な機能を明らかにしてきた。T 細胞特異的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスならびに誘導的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスの解析から AML1 が NKT 細胞分化にも重要な働きをしていることを示す知見が得られた。プロ T 細胞分化前後で AML1 発現が抑制されると NKT 細胞がほぼ消失するという表現型である。同様の結果は NKT 特異的コンディショナルノックアウトマウスでも観察することができ、AML1 が NKT 細胞分化に不可欠な転写因子であることが明らかとなった。

研究期間が短いため詳細な解析は今後の継続研究によるが、NKT 細胞を介した腫瘍免疫に対し AML1 遺伝子が重要な働きをすることを明らかにするとともに、AML1 遺伝子または AML1 によって調節を受ける標的遺伝子を *in vivo* で NKT 細胞特異的に操作し、抗腫瘍効果が得られることを疾患モデルマウスにて検証し、従来の NKT 細胞を用いた免疫細胞治療とは異なる NKT 細胞を用いた新しい免疫細胞・遺伝子治療の可能性を探る準備を進めていきたい。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：転写因子、ノックアウトマウス、腫瘍免疫、NKT 細胞、

## 1. 研究開始当初の背景

AML1/Runx1 は急性骨髄性白血病においてしばしば観察される t(8;21)転座に關与する Runt ファミリーに属する転写因子である。ノックアウトマウスの解析等から AML1/Runx1 が成体型造血のマスターレギュレーターであることが明らかにされてきたが、古典的な AML1 ノックアウトマウスは胎生致死を示すため、その詳細な機能解析は極めて困難であった。そこで、私達は Cre-LoxP システムを用いた AML1/Runx1 コンディショナルノックアウトマウスの作製に世界に先駆け成功し、各血球系における AML1/Runx1 の多彩な機能を明らかにしてきた。特に T 細胞特異的ならびに誘導的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスの解析から、AML1/Runx1 が T, B 細胞、巨核球初期分化に不可欠であることを示した。さらに、T 細胞特異的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスの解析から AML1 が NKT 細胞分化にも重要な働きをしていることを示す知見が得られているが、解析系の限界もあり、詳細な解析や標的遺伝子の同定は未だなされていない。

一方、免疫制御系の新しい細胞系列として同定された NKT 細胞は、T 細胞受容体と NK 細胞マーカーを併せ持ち、 $\alpha$ -galactosyl ceramide ( $\alpha$ -GalCer) が特異的なリガンドの一つであることが知られている。特に主要なサブセットであるマウス  $V\alpha$  14NKT 細胞、ヒト  $V\alpha$  24 $V\beta$ 11NKT 細胞は樹状細胞上の CD1d に結合した  $\alpha$ -GalCer によって活性化を受け、大量の IFN- $\gamma$  や IL-4 を産生することで、強力な免疫調節作用を有している。NKT 細胞はがん転移に特に強い抗腫瘍活性を持つことが知られているが、私達は造血器悪性腫瘍、特に急性リンパ性白血病に対する抗腫瘍効果が NKT 細胞にあることをすでに明らかにしてきた。抗腫瘍免疫において NKT 細胞が果たす役割は近年注目されており、NKT 細胞免疫系賦活化による免疫細胞治療への臨床応用もすでに試みられている。私達の研究室でも NKT 細胞を用いた難治性慢性骨髄性白血病のコントロールや造血器悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植療法後の移植片対宿主病 (GVHD) のコントロールに関する基礎研究が進行中である。ただし、従来の NKT 細胞免疫系賦活化による免疫細胞治療は、 $\alpha$ -GalCer を樹状細胞にパルスして *in vitro* で NKT 細胞を増幅し、その増幅した NKT 細胞を輸注するという非常に煩雑なものであった。

## 2. 研究の目的

本研究において AML1/Runx1 の NKT 細胞分化における詳細な作用を、新規作製する CD1d-Cre トランスジェニックマウスを用いた NKT 細胞特異的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスにより明確にすることが第一目的であった。

このマウス系で抗腫瘍免疫が増強するか否かを検討するため、造血器悪性腫瘍のモデルマウスとして私達が確立した慢性骨髄性白血病 (CML) のモデル Bcr/Abl トランスジェニックマウスをバックグランドとする NKT 細胞特異的 AML1 遺伝子発現増強マウスを作製し、CML の発症及び進展に抑制効果が得られるかどうかを検討し、さらに、NKT 細胞における AML1/Runx1 の標的遺伝子が同定されれば、その標的遺伝子のノックアウトマウス、または発現増強マウス (トランスジェニックマウス) を入手または作製することにより、NKT 細胞での表現型が確認されるかどうかを解析する予定であった。

本研究の最終目的は臨床研究への基礎検討に置いているが、AML1 遺伝子または AML1 によって調節を受ける標的遺伝子を *in vivo* で NKT 細胞特異的に操作することで、抗腫瘍効果が得られることを疾患モデルマウスにて検証し、従来の NKT 細胞を用いた免疫細胞治療とは異なる NKT 細胞を用いた新しい免疫細胞・遺伝子治療の可能性を提示し、今後のトランスレーショナル・リサーチへの橋渡しをしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

### NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスの作製

私達が既に確立した Cre-LoxP システムを用いた AML1 コンディショナルノックアウトマウスの系を使用し、NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスを作製する。その際には現在私達が作成中の CD1d-Cre トランスジェニックマウスとの交配が必要になる。具体的には AML1<sup>flox/+</sup> マウスと CD1d-Cre トランスジェニックマウスを交配し、AML1<sup>flox/+</sup> CD1d-Cre マウスを得て、さらにこのマウスと AML1<sup>-/-</sup> マウスを交配し、AML1<sup>flox/-</sup> CD1d-Cre マウスを作製する。作製したマウスを更に STOP<sup>flox</sup>-GFP トランスジェニックマウスを交配し、AML1<sup>flox/-</sup> STOP<sup>flox</sup>-GFP CD1d-Cre マウスを作製する。このマウスで GFP 陽性となる細胞集団が、AML1 欠損する細胞集団

とほぼ一致する。NKT 原始細胞にて AML1 が欠損していることを確認する。

#### NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスの解析

Lck-Cre トランスジェニックマウスとの交配を経て作製した T 細胞特異的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスの解析結果から、今回作製する NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスでは NKT 細胞が胸腺、末梢組織で認められないことが予想される。NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスの解析としては、まず NKT 細胞数をカウントし、その分化過程、活性化能、サイトカイン産生能をフローサイトメーター、マルチウェル蛍光測定器等により詳細に解析する。続いて、骨髄移植モデルを用い、致死放射線量を照射されたマウスに NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウス骨髄を輸注し、その免疫細胞再構成を観察したい。さらに、NKT 細胞を介した抗腫瘍細胞性免疫を腫瘍由来培養細胞ラインを用いた in vitro アッセイで確認するとともに、in vivo アッセイで行いたい。

In vivo アッセイによる抗腫瘍免疫の検討のため、(1)ヌードマウス皮内に腫瘍由来培養細胞ラインを移植し、さらに NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウス骨髄を輸注し、抗腫瘍効果がみられるかどうかの検討、(2)腫瘍細胞を造血器悪性腫瘍のモデルマウスとして私達が確立した慢性骨髄性白血病(CML)のモデル Bcr/Ab1 トランスジェニックマウス 4 をバックグランドとする NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスを作製し、CML の発症及び進展に抑制効果が得られるかどうかの検討、を行う予定である。

#### AML1/Runx1 の NKT 細胞における標的遺伝子の検索

AML1/Runx1 は既存の AML1 コンディショナルノックアウトマウス解析結果ならびに予備実験の結果から、NKT 細胞初期分化に不可欠な因子であることが想定されているが、その転写調節メカニズムは不明である。本実験では NKT 細胞特異的 AML1 欠損マウスならびにコントロールマウスから骨髄リンパ球前駆 (CLP) 細胞、胸腺 CD4,CD8 double negative(DN)細胞、CD4,CD8 double positive(DP)細胞等、NKT 前駆細胞と考えられている細胞集団をフローサイトメトリーでのソーティングにより選別し、DNA マイクロアレイ解析 (Affymetrix 社製 Gene Chip Array) により、NKT 前駆細胞における AML1/Runx1 によって転写調節を受ける遺伝子を抽出したい。候補となる遺伝子群はリアルタイム PCR 測定装置によりコントロー

ルマウスと比較により mRNA 発現量を定量的に分析したい。AML1/Runx1 は Runt ドメインと呼ばれる領域で CBF および DNA に結合し、その特異的 DNA 配列が知られている。候補となる標的遺伝子群から、各種データベースから AML1/Runx1 がその転写調節領域に直接結合する可能性が高い遺伝子を検索し、実際にその転写調節領域に AML1/Runx1 が結合するかどうか、またその遺伝子の転写調節能を有するかどうかを in vitro のアッセイ系を中心に検討したい。

#### 4 . 研究成果

T細胞特異的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスならびに誘導的 AML1 コンディショナルノックアウトマウスの解析から AML1 が NKT 細胞分化にも重要な働きをしていることを示す知見が得られた。プロ T 細胞分化前後で AML1 発現が抑制されると NKT 細胞がほぼ消失するという表現型である。同様の結果は NKT 特異的コンディショナルノックアウトマウスでも観察することができ、AML1 が NKT 細胞分化に不可欠な転写因子であることが明らかとなった。

研究期間が短いため詳細な解析は今後の継続研究によるが、NKT 細胞を介した腫瘍免疫に対し AML1 遺伝子が重要な働きをすることを明らかにするとともに、AML1 遺伝子または AML1 によって調節を受ける標的遺伝子を in vivo で NKT 細胞特異的に操作し、抗腫瘍効果が得られることを疾患モデルマウスにて検証し、従来の NKT 細胞を用いた免疫細胞治療とは異なる NKT 細胞を用いた新しい免疫細胞・遺伝子治療の可能性を探る準備を進めていきたい。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 180(7): 4402-8, 2008 (査読有り)
2. Takeshita M, Ichikawa M, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M.

AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia* 22(6): 241-9, 2008 (査読有り)

3. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol* 179(8): 5335-45, 2007 (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅井 隆司 (ASAI TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10376436

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者