

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590299

研究課題名(和文) 新規モデルマウスを用いたシグナル伝達解析

研究課題名(英文)

Analysis of signal transduction in a novel mouse model.

研究代表者

若尾 宏(WAKAO HIROSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30360671

研究成果の概要(和文)：

個体の免疫バランス調節に重要な役割を果たす免疫制御性 T 細胞を胚性幹細胞から *in vitro* で産生する試みを行なった。従前の研究より遺伝子再構成済みの当該 T 細胞抗原受容体(TCR) 発現がこの選択的分化に重要であることからレンチウイルスなどを用いて胚性幹細胞に免疫制御性 T 細胞特異的な TCR を発現させ、当該細胞への分化誘導を行ったが目的とする細胞は得られなかった。この結果は胚性幹細胞からの当該細胞の選択的分化誘導にはその iPS 化もしくは核移植による初期化が必要であること示唆する。

研究成果の概要(英文)：

We have tried to differentiate immune-regulatory cells that play an important role in maintaining the immune-balance in the body from the embryonic stem (ES) cell. From our previous study, it is known that the rearranged configuration of the TCR plays an important role in a selective differentiation of the immune-regulatory cells. We have introduced such a TCR by the lentiviral vector into ES cells and let them differentiate into T cells. However, few immune-regulatory cells developed under such conditions. Our data indicate that the conversion of immune-regulatory cells into iPS cells or the nuclear transfer of such cells will be required to induce immune-regulatory cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：胚性幹(ES)細胞、免疫制御性 T 細胞、TCR

## 1. 研究開始当初の背景

個体の免疫バランス調節に重要な機能を担う免疫制御性 T 細胞は将来の細胞治療や再生医療等に応用可能である。生体中には種々の免疫制御性 T 細胞が存在し、或る細胞群は免疫強化能を発揮するのに対して、別の細胞群

は免疫抑制能を示して個体の免疫反応を制御している。これら細胞群の機能破綻はがん・アレルギー・感染・自己免疫疾患などの病態と深く関連しており、臓器移植における免疫寛容や経口免疫寛容にも重要な役割を担っていると考えられている。現在の研究は

動物個体内での当該細胞の機能解析あるいは当該細胞を分離・精製してその性状を解析するというを中心に行われている。しかし、当該細胞の持つ生理的意義を更に深く追求・理解し、これらを再生医療・細胞治療等の応用研究に資する場合にはこれら細胞を *in vitro* で大量に産生する必要があるが、かかる要請に応える研究は従来存在しなかった。

## 2. 研究の目的

ES 細胞はその増殖能が無限で体の中のあらゆる種類の細胞・臓器になりうる。従って、ここから選択的にある標的細胞を分化誘導させることができれば、それは細胞治療、あるいは創薬のための薬剤スクリーニングを可能とし、ひいては現在未充足である生活習慣病を初めとする種々の疾患に対する国民の医療ニーズを満たすことにつながる。

免疫制御性 T 細胞は上記のように個体の免疫バランスを制御し、免疫系が免疫能強化に向かうか反対に免疫抑制に傾くかを決定する重要な細胞群である。その性状をより詳細に研究・解析するためには当該細胞を胚性幹(ES)細胞から大量かつ選択的に分化誘導する方法が確立されることが望まれる。本課題ではこの要請に応えるべく、再生医療・細胞治療実用化のプロトタイプとして ES 細胞から免疫制御性 T 細胞の選択的分化誘導を目指して研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト CD2 プロモーターを使用したヒトマウスハイブリッド型 cDNA のマウス ES 細胞への遺伝子導入と分化誘導。

内在性のマウス TCR と区別するため、ヒト由来  $V\alpha$ - $J\alpha$  とマウス由来  $C\alpha$  からなる cDNA を T 細胞特異的発現を導く CD2 プロモーター下に置き、同時にネオマイシン耐性遺伝子を発現するよう設計されたベクターを作製し、これを electroporation 法にてマウス ES 細胞に導入し、ネオマイシン耐性クローンをプールした。これらの ES 細胞を血液幹細胞分化誘導条件下で培養して CD34<sup>+</sup>細胞を精製した。その後これら CD34<sup>+</sup>細胞を T 細胞分化誘導条件下で培養し、フローサイトメーター等により目的細胞が誘導されているか確認した。

(2) レンチウイルスベクターを利用した免疫制御性 T 細胞特異的な TCR cDNA 発現

免疫制御性 T 細胞特異的な TCR alpha 鎖および beta 鎖 cDNA をプロマイシン耐性を持つレンチウイルスベクターに組み込み、これをマウス・サル ES 細胞に感染させた後、薬剤耐性クローンをプールした。その後、(1)

と同様のステップにて CD34<sup>+</sup>細胞を得、これを T 細胞分化誘導条件下で培養し、フローサイトメーター等により目的細胞が誘導されているか確認した。

(3) 臍帯血を利用した免疫制御性 T 細胞特異的な TCR cDNA 発現

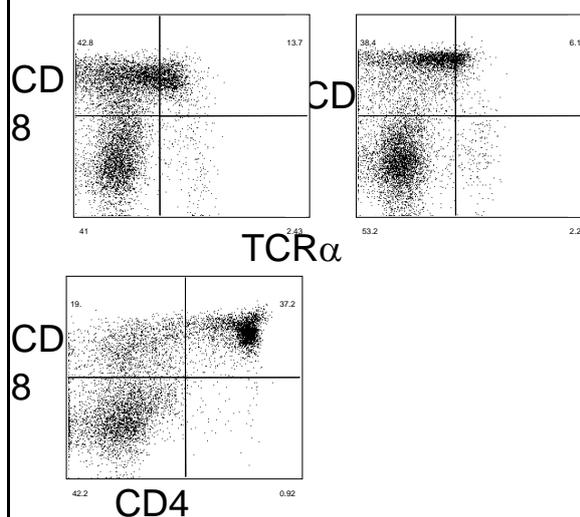
ヒト免疫制御性 T 細胞特異的な TCR cDNA をレンチウイルスベクターに組み込み、これを臍帯血から精製した血液幹細胞 (CD34<sup>+</sup>細胞) に感染させた後、T 細胞分化誘導条件下で培養した。そしてフローサイトメーター等により目的細胞が誘導されているか確認した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト CD2 プロモーターでドライブされる TCRcDNA を利用した免疫制御性 T 細胞分化誘導。

マウス ES 細胞 Bruce4 (C57BL/6 由来) を使用して Electroporation を行い、数百ヶのネオマイシン耐性クローン取得した。これらのクローンをフィーダー細胞 OP9 上で 3 日間培養した後、notch のリガンドである delta-like 1 を発現する OP9 上 (OP9/d) に移植し、前駆 T 細胞分化・増殖に必須のサイトカインの存在下で T 細胞分化を行った。その結果、TCR $\alpha\beta$  を発現する T 細胞を得ることは出来たが、得られた細胞は未熟な CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞であって、目的の免疫制御性 T 細胞はこれらの細胞中には存在しなかった (図 1)。

(図 1)



(2) レンチウイルスベクターを利用した免疫制御性 T 細胞分化誘導

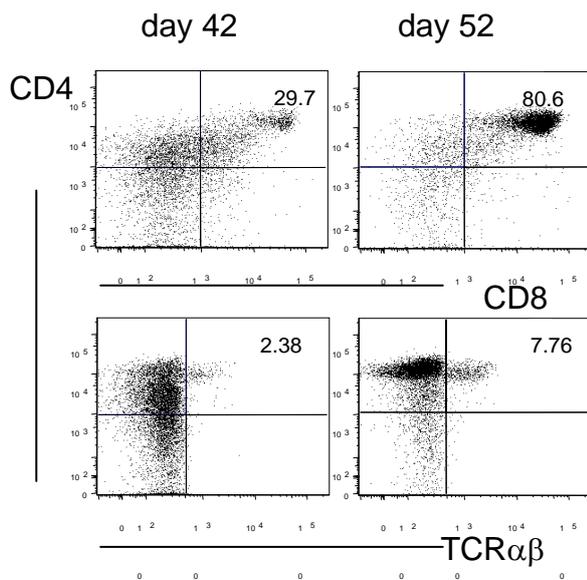
プロマイシン耐性を有するレンチウイルスベクターにて免疫制御性 T 細胞特異的 TCR

cDNA をマウス・サル ES 細胞に感染後、プロマイシン耐性クローンをプールして、(1)と同様の条件下で T 細胞へ分化させた。その結果、未熟な T 細胞である CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 細胞は得られたが免疫制御性細胞は得られなかった。

(3) 血液幹細胞を使用した免疫制御性 T 細胞分化誘導。

臍帯血から MACS カラムによって 98%以上の純度で CD34<sup>+</sup>細胞を分離・精製した。これに、ヒト免疫制御性 T 細胞特異的な TCRα1pha鎖、beta 鎖 cDNA をコードするレンチウイルスベクターを感染させ、OP9/d 上で培養した。培養後 42 日で得られたリンパ球の約 30%が CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>であり、2.4%が TCRαβ<sup>+</sup>細胞として検出された。さらに培養を続けると CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞ならびに TCRαβ<sup>+</sup>細胞の割合はそれぞれ 80%、7.8%まで増大した。しかしながら、これらの条件下でも免疫制御性 T 細胞特異的 TCR を発現させた細胞から免疫制御性 T 細胞は産生されなかった(図 2)。

(図 2)



## 結論

以上の結果から、ES 細胞等の幹細胞から免疫制御性 T 細胞を分化誘導するためには単純な強制発現系の構築では不十分であることが判明した。マウスで我々が示した様に (Wakao et al, FASEB J. 2008)、免疫制御性 T 細胞の核移植を行ってクローン胚を樹立し、ここから当該細胞を分化誘導するか、免疫制御性 T 細胞自身を iPS 化して、ここから当該細胞の分化誘導を行う方法を喫緊に確立する必要がある。これらが可能となれば、in

vitro で大量かつ選択的な免疫制御性 T 細胞の産生が可能となり、当該細胞を使用した細胞治療・再生医療等が具現化するのみならず当該細胞を標的とした創薬スクリーニングも可能となり、国民の健康増進・福祉向上に貢献することができる。

## 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 6 件)

1. Wakao, H., Wakao, R, Oda, A., and Fujita, H. Constitutively active Stat5A and Stat5B promote adipogenesis. *Environmental Health and Preventive Medicine* (2011) *In press* 査読あり

2. Komori T, Doi A, Furuta H, Wakao H, Nakao N, Nakazato M, Nanjo K, Senba E, Morikawa Y. Regulation of ghrelin signaling by a leptin-induced gene, negative regulatory element-binding protein, in the hypothalamic neurons.

*J Biol Chem*. 2010 Nov 26;285(48):37884-9 査読あり

3. Wakao, H.

Differentiation of iNKT cells from embryonic stem cells. *Curr. Immunol. Rev*. 2010 May 6(2):102-108 査読あり

4. Wakao H.

NKT cells: from totipotency to regenerative medicine.

*Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009

Mar-Apr;57(2):117-28. 査読あり

5. 若尾 宏 末梢リンパ球の全能性とその応用

生化学 81、277-289 日本生化学会 (2009) 査読なし

6. Wakao H, Wakao R, Sakata S, Iwabuchi K, Oda A, Fujita H.

In vitro induction of natural killer T cells from embryonic stem cells prepared using somatic cell nuclear transfer.

*FASEB J*. 2008 Jul;22(7):2223-31 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若尾 宏 (WAKAO HIROSHI)  
北海道大学大学院医学研究科 助教  
研究者番号：30360671

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし