

受賞者

片山 義雄

神戸大学医学部附属病院血液内科

研究テーマ

幹細胞におけるRac活性化因子Dock2の役割

## 1. 緒言

造血幹細胞及び前駆細胞は主に骨髄内に存在し、末梢血にはほとんど存在しない。ケモカイン CXCL12は、幹細胞を骨髄に誘導する重要な因子であり、その受容体である CXCR4 が幹細胞表面に発現している。CXCL12 は骨髄微小環境で産生され、幹細胞の骨髄移植後の生着に重要な役割を果たしている。幹細胞の遊走に際し、Rho GTPases family に属する Rac が、CXCR4 などの細胞表面受容体からのシグナル統合に働いており、細胞骨格の制御、増殖や生存にも関与している。

CDM family 分子は、Rac の上流で CXCR4 からのシグナル伝達に関与している。Dock2 は造血細胞に発現している CDM family 分子で、成熟リンパ球の遊走に不可欠な Rac 活性化因子である。Dock2 欠損マウスの T 細胞、B 細胞はケモカインに対する遊走能を欠損しており、血液中の T 細胞減少、リンパ濾胞の萎縮や辺縁帯 B 細胞の欠損等の異常が確認されている。しかし、未分化造血細胞における発現や機能については不明であった。

我々は Dock2 が造血幹細胞及び前駆細胞に発現していることを確認し、その骨髄造血に関する役割を評価した。

## 2. 方法

Dock2 の発現の確認 野生型マウスの骨髄造血幹細胞 lineage-Sca-1+c-kit+(LSK) 細胞を FACS Aria で sorting により回収した。マウス造血前駆細胞の細胞株 FDCP-mix と LSK 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。Dock2-GFP knock-in mouse を用い、骨髄造血幹細胞分画における Dock2 蛋白の発現を flow cytometry で解析した。

Dock2 欠損幹細胞・前駆細胞のケモカインに対する遊走能 Dock2 欠損マウスの骨髄単核球、autoMACS で回収した lineage-cells を 24-well transwell (pore size, 5  $\mu$ m) の上槽にいれ、下槽の CXCL12 に向かって 3 時間後に移動した細胞数を測定した。Flow cytometry で上槽にいれた細胞と下槽に移動した細胞中の LSK 細胞を解析し、また、メチルセルロース法を用いて顆粒球系造血前駆細胞のコロニー形成数 colony-forming units in culture (CFU-Cs) で、各々の遊走能を評価した。

Dock2 欠損幹細胞・前駆細胞のケモカイン刺激によるアクチン重合化 野生型と Dock2 欠損マウスの骨髄単核球を CXCL12 で一定時間刺激し、4% パラホルムアルデヒドで固定する。重合アクチンに結合する蛍光色素で標識したファロイディンを利用して、flow cytometry にてアクチン重合度を評価した。

Dock2 欠損幹細胞・前駆細胞の  $\alpha 4$  インテグリンの発現と機能評価 Flow cytometry で、野生型と Dock2 欠損マウスの骨髄 LSK 細胞の  $\alpha 4$  インテグリンの発現を比較した。接着分子 VCAM-1 でコーティングした 96well プレートに、野生型と Dock2 欠損マウスの骨髄 lineage-細胞を入れ、CXCL12 で刺激した。10 分後にプレートに接着した細胞を PBS+0.1% BSA+5mMEDTA で回収し、CFU-Cs で接着能を評価した。

Dock2 欠損マウスの骨髄造血能評価 野生型と Dock2 欠損マウスの定常状態の骨髄の cellularity を比較した。代謝拮抗剤である 5-FU を毎週 150mg/kg または毎月 250mg/kg 静脈内に投与し、化学療法誘導骨髄抑

制下での生存率を野生型マウスと比較した。

**連続骨髄移植** 野生型とDock2欠損マウスの骨髄細胞を、致死放射線を照射した野生型のマウスに各々移植する。1ヵ月後に移植後マウスから骨髄細胞を採取し、致死放射線を照射した野生型のマウスに2次移植を行う。このような1ヵ月毎の移植を4回繰り返し、生存率を比較した。

**競合型移植モデルの作成** 野生型又はDock2欠損マウス(CD45.2陽性)の骨髄有核細胞と、同量のCD45.1陽性骨髄有核細胞を混合し、致死放射線を照射したCD45.1陽性レシピエントマウスに移植する。レシピエントから毎月採血し、白血球と各分類の細胞がCD45.1或いはCD45.2いずれの由来であるか、flow cytometryで解析した。また、移植1, 3, 6ヵ月後の骨髄のB細胞系(成熟B細胞 IgM+B220+, 前駆B細胞 IgM-B220+)、汎リンパ球前駆細胞common lymphoid progenitors( CLPs: lineage-IL-7R $\alpha$ +Sca-1<sup>du11</sup>c-kit<sup>du11</sup>)、造血幹細胞 hematopoietic stem cells(HSCs: lineage-IL-7R $\alpha$ -Sca-1+c-kit+)に加え、胸腺の前駆T細胞(CD3-CD4-CD8-c-kit+CD25-)についても解析を行った。

### 3. 結果 研究成果

**Dock2の発現の確認** マウス造血前駆細胞の細胞株FDCP-mixと、野生型マウスの骨髄造血幹細胞(LSK細胞)において、RT-PCRにてDock2のmRNA発現を確認した。Dock2-GFP knock-in mouseを用い、Dock2蛋白の発現をflow cytometryで解析したところ、骨髄単核球の大多数がDock2を有しており、CLPs, HSCsでも高度に発現していた。

**Dock2欠損幹細胞・前駆細胞のケモカインに対する遊走能** transwellを用いたアッセイでは、Dock2欠損のlineage<sup>-</sup>細胞, LSK細胞, CFU-Csいずれも、CXCL12に対する遊走能が野生型と比較して有意に低下していた。(右上図)

**Dock2欠損幹細胞・前駆細胞のケモカイン刺激によるアクチン重合化** Dock2欠損前駆細胞のCXCL12刺激によるアクチン重合化は、野生型と比較して有意に低下していた。(右下図)

**Dock2欠損幹細胞・前駆細胞の $\alpha 4$ インテグリンの発現と機能評価** Dock2欠損幹細胞・前駆細胞の $\alpha 4$ インテグリンの発現は野生型と有意差は無かった。野生型CFU-CsのVCAM-1に対する接着はCXCL12により促進され、 $\alpha 4$ インテグリンをブロックすると抑制されるが、同様の反応がDock2欠損CFU-Csで観察された。

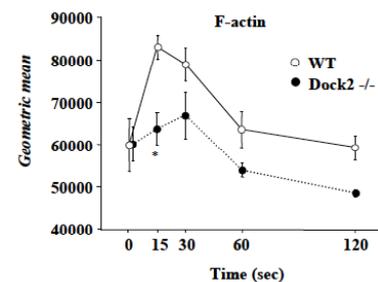
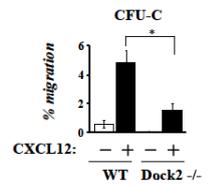
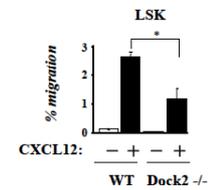
**Dock2欠損マウスの骨髄造血能評価** 定常状態のDock2欠損マ

ウスの骨髄有核細胞数は正常で、成熟リンパ球は野生型より少数であったが、前駆B細胞, CLPs, HSCsのような未熟な造血細胞の数は正常であった。化学療法による骨髄抑制下では、毎週5FUを投与した場合Dock2欠損マウスの生存率は低下するが、毎月投与した場合野生型と共に7ヶ月以上生存し、7ヵ月後の末梢血球数にも有意差は無かった。

**連続骨髄移植** Dock2欠損骨髄細胞を移植した群は、野生型と比較して生存率の低下を認めた。しかし、生存マウスの末梢血球数は野生型と比較して低下を認めなかった。

**競合型移植モデルの作成** 両群の骨髄は移植1ヵ月後には同程度の生着を示していた。Dock2欠損由来の

#### Transwell migration



白血球は2-6ヵ月後に著明な減少傾向を示した。白血球各分類の解析にて、Dock2欠損骨髄細胞を移植した群は、リンパ球系統のみ減少しており、好中球、単球等の骨髄系細胞の移植後の構成は野生型と同等であった。移植1ヵ月後のDock2欠損HSCsは野生型と同様に生着し、3ヵ月後に減少傾向を認めるものの、6ヵ月後には回復していた。しかし、Dock2欠損B細胞系(成熟B細胞, 前駆B細胞)は、移植1ヶ月後は野生型と同等であったが、3,6ヵ月後に有意に減少していた。胸腺の前駆T細胞も、定常状態では野生型と差は無いが、競合状態では有意に割合が減少していた。

#### 4. 考察 まとめ

Dock2は、造血幹細胞・前駆細胞を含む骨髄造血系細胞において高頻度に発現している。Dock2欠損幹細胞・前駆細胞は、CXCL12に対する反応としての遊走及びアクチン重合化が低下しているが、CXCL12刺激による $\alpha 4$ インテグリン活性化は影響を受けない。

$\alpha 4$ インテグリンは造血幹細胞・前駆細胞の生着に重要な接着因子で、CXCL12は $\alpha 4$ インテグリン接着活性を刺激する。しかし、Dock2欠損T細胞においてもCXCL12刺激による $\alpha 4$ インテグリン接着活性は低下せず、Dock2が欠損していても $\alpha 4$ インテグリン活性は他のRac関連蛋白により補われるものと推測される。骨髄抑制下でのDock2欠損マウスの高死亡率は造血障害によるものではなく、感染等の他の原因が考えられる。すなわち、幹細胞の骨髄生着におけるCXCR4の主な機能が、遊走よりむしろ $\alpha 4$ インテグリン活性化であると考えられる。

競合型移植6ヵ月後の、末梢血の骨髄系細胞数と骨髄の造血幹細胞数は野生型・Dock2欠損の両群同等で、血液細胞の根源となる幹細胞の数や自己複製能にDock2は必須でないと考えられる。一方、定常状態のDock2欠損マウスのT, B前駆細胞数は正常であるが、競合型移植においてDock2欠損T, B前駆細胞数は有意に低下していた。よって、Dock2は骨髄リンパ球造血を部分的に制御していると考えられる。

#### 5. 発表論文、参考文献

特記事項なし