

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08315

研究課題名(和文) ヒト赤芽球におけるオルガネラリロケーションの統括的制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of organelle relocation in human erythroblasts.

研究代表者

小松 久美(鶴生川久美)(Ubukawa, Kumi)

秋田大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70646554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cdc42阻害剤CASINが、ヒト赤芽球前駆細胞CFU-Eの増殖と赤芽球の脱核を濃度依存性に抑制した。正常CFU-Eではダイニンは細胞質に島状に分布しているのに対し、CASIN投与後のダイニンは核近傍に点状に存在し、 $\alpha$ -チューブリンと共局在した。また、CASINはCFU-Eと成熟赤芽球におけるF-アクチンの集積を抑制した。以上から赤芽球分化の最終段階で、細胞質分裂、核の局在化、核の排出に、Cdc42がダイニンとアクチンフィラメント形成を通じて重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト赤芽球の分化、特に脱核時にCdc42が重要な役割を担うことを初めて示し、通常の細胞分裂と赤芽球脱核の類似点と相違点をまた一つ明らかにしたことに学術的意義がある。社会的意義としては、赤血球の工業的産生への応用や疾患の病態解明があげられる。iPS細胞を用いた人工的赤血球産生においては、低い脱核率が問題となっており、赤芽球脱核のメカニズムを明らかにする本研究は、この問題点を解決する一助となる可能性がある。また、Cdc42阻害を含む細胞質分裂阻害剤が引き起こす赤芽球形態の異常は骨髄異形成症候群の赤芽球形態と類似点があり、病態解明に結び付く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms involved in the terminal differentiation of erythroblasts have been elucidated by comparing enucleation and cell division.

We herein investigated the effects of the cell division control protein 42 homolog (Cdc42) inhibitor, CASIN, on cytokinesis and enucleation in colony-forming units-erythroid (CFU-Es) and mature erythroblasts (day 10). CASIN blocked the proliferation of CFU-Es and their enucleation in a dose-dependent manner. Dynein adopted an island-like distribution in the cytoplasm of non-treated CFU-Es, but was concentrated near the nucleus as a dot and co-localized with  $\alpha$ -tubulin in CASIN-treated cells. CASIN blocked the accumulation of F-actin in CFU-Es and day 10 cells. These results demonstrated that Cdc42 plays an important role in cytokinesis, nuclear polarization and nuclear extrusion through a relationship with dynein and actin filament organization during the terminal differentiation of erythroblasts.

研究分野：血液内科

キーワード：ヒト赤芽球 脱核 Cdc42

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでにヒト赤芽球脱核直前でのダイニンの核周囲への集積が核の偏在化(細胞極性化)に必須であること、脱核を担う収縮環様の構造は非筋型ミオシン IIB で構成されることを示したが、これらの制御因子と情報伝達系は不明な点が多い。

上皮系細胞における微小管の集合と分散およびアクチン繊維の形成は GTP 活性を有する Rho ファミリーに属する Cdc42 によって制御されることから、我々は「ヒト赤芽球脱核に際し、ダイニンを介する細胞極性化とアクトミオシンによる収縮環形成は Cdc42 が統括的に制御する」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

ヒト赤芽球の脱核に至る細胞極性化と収縮を統括的に制御するシグナルと情報伝達経路を明らかにすることを目的とした。特に、ダイニンやアクトミオシンの上流分子として Cdc42 に着目し、その細胞内局在や阻害剤による変化を探索することとした。

3. 研究の方法

既に確立したヒト赤芽球の培養系を用いる。脱核率の算定や細胞形態観察、FACS による細胞表面マーカーの解析、定量 PCR、ウェスタンブロットの手技は既報に則る。

- (1) Cdc42 の発現および細胞内局在：Cdc42 の発現を定量 PCR 及びウェスタンブロットにて確認する。免疫染色にて Cdc42 の細胞内局在を確認する。
- (2) Cdc42 の阻害剤の影響：Cdc42 阻害剤である CASIN を添加し、赤芽球の分化増殖や脱核に与える影響を形態観察や細胞数や脱核率、FACS により確認する。CASIN 投与時のダイニン、-チューブリン、アクチン、Cdc42 の細胞内局在の変化を免疫染色にて確認する。

4. 研究成果

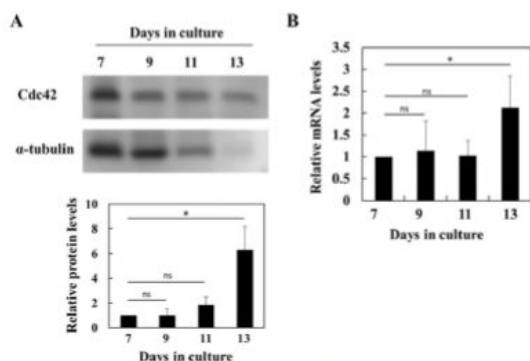


図1. CFU-Eから赤芽球の各分化段階におけるCdc42

(1) Cdc42 はヒト赤芽球の最終分化段階まで発現が維持される：ヒト赤芽球前駆細胞 CFU-E から、最終分化段階の赤芽球までの Cdc42 の発現を検討した。ウェスタンブロットでは、day7 の CFU-E から day10 以降の最終分化段階の成熟赤芽球までに Cdc42 の発現を認めた(図 1A)。リアルタイム PCR 法により、Cdc42 の相対的 mRNA レベルは day11 まで変わらず、day12 では増加していた(図 1B)。

(2) Cdc42 阻害剤はヒト CFU-E の増殖と分化を抑制する：Cdc42 阻害剤である CASIN は、濃度依存性に CFU-E の増殖を抑制した(図 2A)。CASIN 処理した CFU-E では、細胞周期の G2/M 期が優位に減少し(図 2B)、細胞形態はコントロールに比して大きくなった(図 2C)。CFU-E の分化段階を確認するため、CD71 と GPA で FACS を行った。CASIN 処理して 48 時間後の

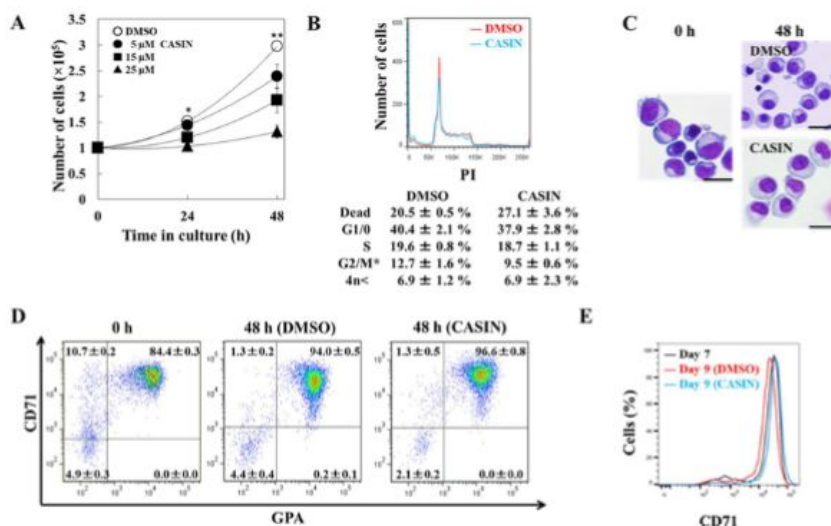


図2. CFU-EにおけるCdc42阻害剤の影響

CFU-E は、コントロールよりも CD71 の高発現が続いており(図 2D)、0 時間の細胞と同程度の CD71 発現を認めた(図 2E)。すなわち、Cdc42 阻害剤は CFU-E の増殖だけでなく、分化も抑制していた。

( 3 )Cdc42 阻害剤はヒト赤芽球の脱核を抑制する：CASIN を day10 赤芽球に添加すると、濃度依存性に脱核を抑制した ( 図 3A )。細胞周期には影響を与えず ( 図 3B )。細胞形態では明らかに脱核が抑制されていた ( 図 3C )。Day10 赤芽球を CASIN 処理して 72 時間後に FACS で CD71 と GPA の発現を確認したところ、コントロールと同様で、分化は抑制されなかった ( 図 3D, E )。

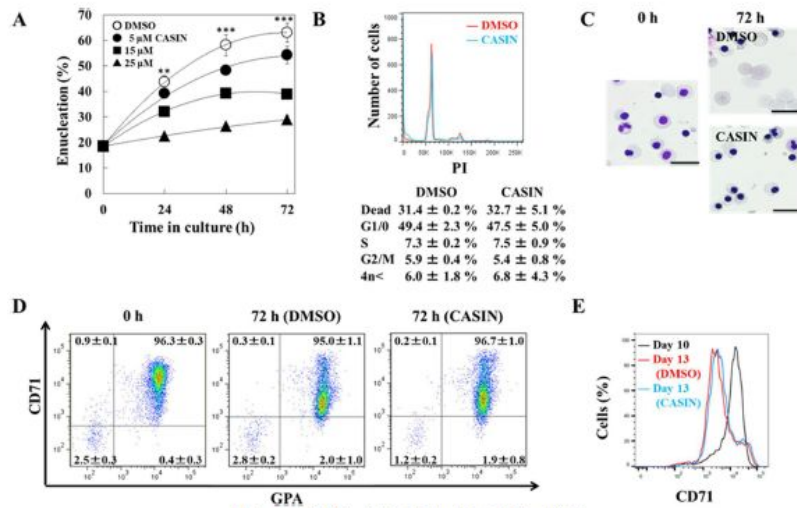


図 3. 赤芽球における Cdc42 阻害剤の影響

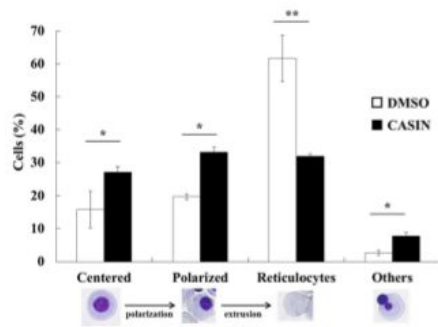


図 4. Cdc42 阻害剤投与時の核の局在

( 4 )Cdc42 阻害剤は、赤芽球脱核時の、核局在化と核排出を阻害する：Day10 赤芽球に CASIN を添加し、24 時間後の核の局在を検討した。コントロールに比べて、核が中央にある赤芽球と偏在化している赤芽球が増加し、脱核後の赤血球は減少していた ( 図 4 )。

( 5 )Cdc42 阻害剤により CFU-E の収縮環への Cdc42 の集積が阻害され、赤芽球脱核時の収縮環様構造物が形成されなくなる：コントロールでは、Cdc42 は CFU-E の細胞質分裂時に収縮環に集積するが、CASIN 投与で収縮環は形成しなくなり、Cdc42 の集積も認めなくなった ( 図 5A )。day11 赤芽球において、コントロールでは Cdc42 は脱核前には核近傍に F-アクチンと共に共局在し、それらは脱核後には赤血球側に移動するが、CASIN 処理により F-アクチンと Cdc42 の集積を認めなくなった ( 図 5B )。

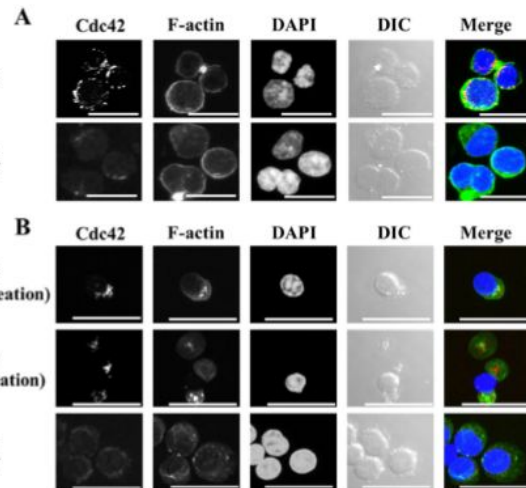


図 5. Cdc42 と F-アクチンの局在

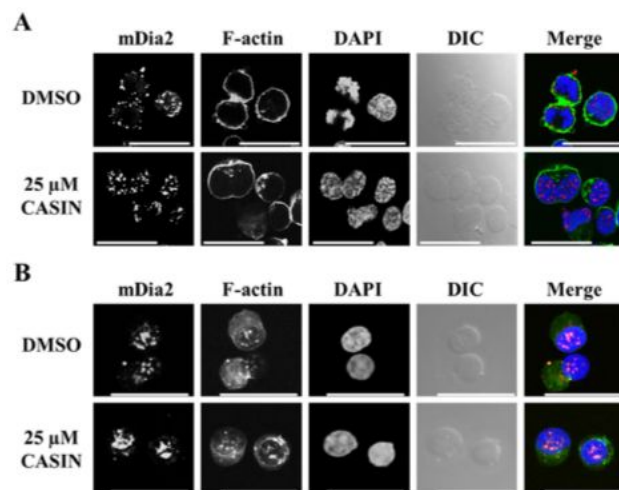


図 6. mDia2 と F-アクチンの局在

( 6 )Cdc42 はヒト赤芽球のアクトミオシン集積に関係するが、Cdc42 の下流分子である mDia2 は、赤芽球の増殖には関与するものの、脱核への関与は薄い：マウスにおいて、赤芽球脱核への関与が指摘されている mDia2 の、局在を検討した。コントロール CFU-E では、分裂時に mDia2 は細胞膜近くの細胞質に局在するのに対し、CASIN 処理した CFU-E では分裂が阻害され mDia2 は核内に局在した ( 図 6A )。一方、day11 赤芽球では、CASIN の有無に関わらず mDia2 は核内に存在した ( 図 6B )。

(7) Cdc42 阻害は、CFU-E と赤芽球のダイニンの局在を変化させる：コントロールでは、CFU-E においてダイニンは  $\gamma$ -チューブリン周囲に島状に存在したが、CASIN を添加するとダイニンは点状に集積し  $\gamma$ -チューブリンと共局在した (図 7A)。赤芽球でも同様に、コントロールではダイニンは  $\gamma$ -チューブリン周囲に島状に存在したが、CASIN を添加するとダイニンは点状に集積し  $\gamma$ -チューブリンと共局在した (図 7B)。

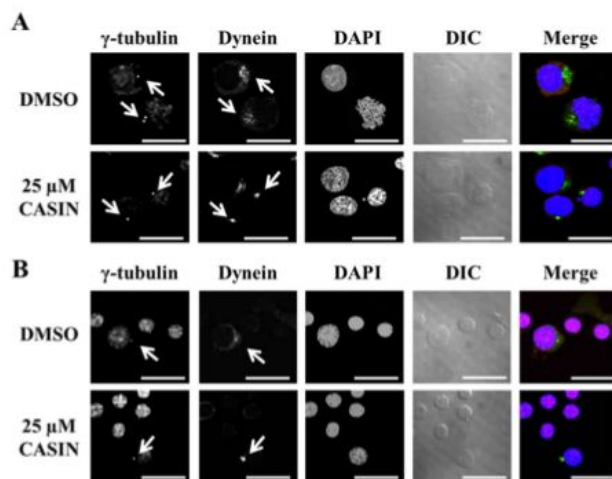


図7.  $\gamma$ -チューブリンとダイニンの局在

以上(1)~(7)より、Cdc42 が、ダイニンとアクチンフィラメント形成を調整することで、ヒト赤芽球最終分化段階の核局在化と核放出に重要な役割を果たしている と結論づけた。

<引用文献>

Kobayashi I, et al.: Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process. *Exp Hematol.* (2016) 44: 247-256.

Ubukawa K, et al.: Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood* (2012) 119:1036-1044.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasaki Yumi, Guo Yong-Mei, Goto Tatsufumi, Ubukawa Kumi, Asanuma Ken, Kobayashi Isuzu, Sawada Kenichi, Wakui Hideki, Takahashi Naoto	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-6 Generated from Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells through TLR4 Signaling Promotes Emergency Granulopoiesis by Regulating Transcription Factor Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ubukawa Kumi, Goto Tatsufumi, Asanuma Ken, Sasaki Yumi, Guo Yong-Mei, Kobayashi Isuzu, Sawada Kenichi, Wakui Hideki, Takahashi Naoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Cdc42 regulates cell polarization and contractile actomyosin rings during terminal differentiation of human erythroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68799-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Goto T, Ubukawa K, Kobayashi I, Sugawara K, Asanuma K, Sasaki Y, Guo YM, Takahashi N, Sawada K, Wakui H, Nunomura W.	4. 巻 72
2. 論文標題 1.ATP produced by anaerobic glycolysis is essential for enucleation of human erythroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Hematol.	6. 最初と最後の頁 14-26.e1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Araki Katsuya, Sugawara Kotomi, Hayakawa Eri H., Ubukawa Kumi, Kobayashi Isuzu, Wakui Hideki, Takahashi Naoto, Sawada Kenichi, Mochizuki Hideki, Nunomura Wataru	4. 巻 108
2. 論文標題 The localization of $\alpha$ -synuclein in the process of differentiation of human erythroid cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 130 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2457-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鶴生川久美	4. 巻 28
2. 論文標題 赤血球脱核とその異常	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 血液フロンティア	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Goto T, Ubukawa K, Asanuma K, Kobayashi I, Guo YM, Takahashi N, Wakui H, Nunomura W.
2. 発表標題 Cdc42 regulates terminal differentiation in human erythroblasts.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤樹史、鶴生川久美、浅沼研、小林五十鈴、郭永梅、高橋直人、涌井秀樹、布村涉
2. 発表標題 ヒト赤芽球の終末分化におけるCdc42の情報伝達経路の解明.
3. 学会等名 第91回日本生化学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 直人  (Takahashi Naoto)  (80344753)	秋田大学・医学系研究科・教授    (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------