

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19890275

研究課題名（和文）ヒト赤血球脱核関連遺伝子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of candidate gene for enucleation of human erythrocyte

研究代表者

三原田 賢一（MIHARADA KEN-ICHI）

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・基礎科学特別研究員

研究者番号：40455366

研究成果の概要： ヒト臍帯血から分化誘導した赤血球系細胞の各分化段階、および貧血マウス脾臓に集積した赤芽球と脱核能の低いマウス ES 細胞由来赤芽球に関して、それぞれ Subtraction assay を用いた発現遺伝子比較を行った。その結果、脱核に関連していると考えられる 5 遺伝子が候補として同定された。そのうちの 1 つである GDI-beta は、近年脱核機構に重要であると報告された Rho シグナルに関与する遺伝子であり、脱核の実行に重要な遺伝子である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,330,000 | 0 | 1,330,000 |
| 2008 年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,680,000 | 405,000 | 3,085,000 |

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：赤血球・脱核・輸血用血液・MEDEP・Subtraction assay・臍帯血・GDI・mDia

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、日本国内においても慢性的な輸血用血液不足が深刻化している。国内で輸血を必要としている人は年間で百万人を超えるが、少子高齢化の進む日本では増加する需要に対する供給不足がより顕著になるであろうと予測される。また、肝炎やエイズなど、献血には感染症の問題も含まれていることなどから、今後は献血に頼らない新たな輸血用血液の供給システムを確立することが必要であると思われる。この新たな供給システムは大別して、1) 人工血液の作製、2) 造血幹細胞からの赤血球誘導、3) 他組織由来細胞からの赤血球誘導、などが挙げられる。この

うち、1) は主に酸素結合能に着目した物質の研究が進展しており、その化学的解析が行われているが生体内で安定化させたり血流に乗せて循環させるための方法など、大きな問題が残存している他、コスト面での問題も無視できない。一方で 2) に関しては、臍帯血などに含まれる造血幹細胞から *in vitro* において成熟赤血球を作り出す技術の開発が進められている。赤血球は、分化の過程においてヘモグロビンの合成や脱核など形態的・生化学的変化が大きい細胞である。そのため、転写因子などについては重要な機能を持つ遺伝子が明らかにされているが、各分化段階を制御している機構については不明な点が

多い。特に赤血球最大の特徴の一つである核の放出、「脱核」は関与する遺伝子も報告されておらず、従来は脱核を効率よく誘導することは困難であった。国内外の研究機関においても臍帯血由来幹細胞からの脱核赤血球誘導は試みられているが (*Nat Biotechnol.* 20: 467-472 [2002], *Nat Biotechnol.* 23: 69-74 [2004]) これらの分化誘導系では中途段階までしか分化しなかったり、完全に分化させるにはマウス由来のフィーダー細胞が必要だったりといった問題点があった。しかし近年、申請者らのグループは臍帯血由来の造血幹細胞から、フィーダー細胞を用いずに *in vitro* において脱核した成熟赤血球を効率よく誘導する培養系を確立した (*Nat Biotechnol.* 24: 1255-1256 [2006])。この培養系ではフィーダー細胞を用いないため全ての細胞が臍帯血由来であり、ほぼ 100%が赤血球系の細胞になるため脱核などの赤血球分化を解析する上で非常に有効な手法であると言える。

(2) その一方で、現実的な臨床応用を鑑みた場合、輸血に必要な量の脱核赤血球を得るためには増幅効率面で大幅な改良が必要なことも事実である。我々の報告した手法は、フィーダー細胞を用いる手法に比べて遜色ない増幅効率ではあるが、正常細胞の分裂能力としては既に限界レベルの増殖をしていると推測される。現在の手法では、増殖フェーズ(活発な細胞分裂をする未分化な段階)と分化フェーズ(分化・成熟過程)が混在しており、増殖すると同時に分化しているためであり、これらの壁を打開するには、不死化遺伝子や細胞周期関連遺伝子などの遺伝子操作が必要だと思われるが、こういった操作には腫瘍形成のリスクが伴うのが一般的である。しかし、赤血球は成熟の過程で核を放出し、遺伝情報を持たない状態になるため、分化の過程で遺伝子組み換えなどの操作を行っても脱核さえ制御できれば腫瘍化の問題を回避できることが最大の利点なのである。前述の 3) に関して、胚性幹 (ES) 細胞や他組織由来細胞、あるいは不死化した細胞株などから赤血球分化を誘導する際に遺伝子組み換えを行う事が可能になり、現在模索されている様々な細胞治療に比べても実現が比較的近い手法であると考えられる。そのためにも脱核の完全な制御は必須の技術であると考えられる。

申請者らの報告した脱核誘導法は、従来法に比べると格段に効率が良く、優れた分化誘導系であると考えられるがその効率は 100%ではなく、また培地の改良によるところが大きい。実際には脱核がどのようなメカニズムに基づいて実行されているかに関しては未だ不明であり、ほぼ完全に脱核を誘導するため

には、脱核自体を制御するマスター遺伝子をつきとめ、明らかにすることが重要であると考えられる。従来は、そもそも脱核を *in vitro* で再現すること自体が困難であったため、こういった遺伝子のクローニングは手法・材料的に無理であったが、我々の手法を元にすれば mRNA、タンパク質レベルでの解析が可能になると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト臍帯血由来造血幹細胞から誘導した成熟赤血球を用いて脱核関連遺伝子の同定を目指すものである。申請者らは、既に *in vitro* における効率的な脱核赤血球誘導法を確立しており、ここから得られる細胞を用いて以下の検討を行う。

- (1) 赤血球分化誘導中に経時的に遺伝子発現を調べ、分化後期に特異的に発現する遺伝子を特定する。
- (2) 同定された遺伝子と脱核との関連をヒト臍帯血由来細胞および細胞株で解析する。
- (3) 同定した遺伝子とヒト臍帯血由来細胞を用いて脱核赤血球の大量培養系を確立する。

以上の解析を行うことにより、脱核に関わるキー遺伝子を探索する。将来的には、増殖効率を大幅に改良した赤血球産生システム構築のために、遺伝子操作後の細胞に対する脱核誘導能を検討するが、本研究はその前段階となる。

3. 研究の方法

(1) 対象となる細胞は、ヒトおよびマウス細胞を用いた。ヒト細胞は、理化学研究所・亜バイオリソースセンター細胞材料開発室から提供されている研究用ヒト臍帯血を用い、ヒト赤血球分化誘導培地 (hEDM) に赤血球分化に有効なサイトカインであるエリスロポエチン (EPO)、SCF、IL-3、VEGF、IGF-1I を添加したもので培養した。マウス細胞は、8 週齢の C57BL/6N、雌マウスに溶血剤であるフェニルヒドラジン (80mg/kg) で腹腔内投与して溶血性貧血を誘導した後に脾臓を摘出し、集積している赤芽球系細胞を採取した。また比較細胞として、細胞材料開発室にて樹立されたマウス ES 細胞由来赤芽球細胞株 (MEDEP) を入手し、これを用いた。

(2) 詳細な遺伝子発現比較を実施するためには、対象となる細胞が可能な限り均一である方が好ましい。しかし一般に分化誘導した初代培養細胞は複数の分化段階の細胞が混在しているため、分化マーカーを用いてこれら細胞群を分ける必要がある。そのため、分化段階特異的な細胞表面抗原を認識する蛍

光色素標識モノクローナル抗体、核酸標識色素、およびフローサイトメトリーを用いて細胞を解析・分取する。

具体的には、代表的な赤血球系細胞のマーカーである Glycophorin-A、CD71 (トランスフェリン受容体)の他に、CD11b、CD36、CD45、CD41、CD117(c-kit)、SYTO16、SYTO85、SYTOX Blue などの表面抗原・生体核染色色素を利用し、FACS Calibur、FACS Aria を用いて細胞群の解析を行った。

(3) 分取した細胞は、Subtraction Assayにより特異的遺伝子の発現を比較した。アッセイには、TaKaRa-Clontech社のPCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Cat. No. 637401) を用いた。

4. 研究成果

(1)2007 年度は、遺伝子発現解析を行う前準備として比較解析する細胞群の選別を行った。既に赤芽球～脱核赤血球への分化誘導系は確立しているが、この分化誘導系では様々な分化段階の赤芽球が混在するため、そのまま細胞を解析に用いることは特異的な遺伝子を同定するためには不都合である。そこで、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析と細胞内核酸含有量の差異により、細胞を3～4段階に分類することにした。当初、代表的な赤血球系マーカーである Glycophorin-A を用いる予定であったが、十分分化が進行した赤血球に抗 Glycophorin-A 抗体を反応させると細胞が凝集してしまうことがわかった。そこで、凡血球マーカーでありながら赤血球系細胞では発現しない CD45 抗原を指標とし、CD45 陰性細胞中で(1)細胞のサイズ (FSC)、(2)SYTO16 による生体核染色を利用した核酸含有量、の2点で赤血球系細胞を分類した。結果、[a] FSC-high, SYTO16+, [b] FSC-low, SYTO16+, (脱核直前) [c] FSC-low, SYTO16- (脱核直後) の3段階の区分が可能であることが判明した。この分類法は、従来より用いられている形態学的分類法とよく対応していることが分取後の細胞の形態解析などにより確認された。

網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイによる mRNA 解析) の前に、前述の方法で分取した細胞の mRNA を用いて Differential Display 法、Subtraction 法を実施し、特異的遺伝子の同定を目指したが、これらの手法では特筆すべき差は認められなかった。このことから、マイクロアレイを用いた網羅的かつより詳細な解析が必須であると結論づけると同時に、核の凝集した赤芽球では mRNA よりもタンパク質の解析が有効であると判断した。

(2) 2008 年度は、昨年度に検討した赤血球細

胞の詳細な分画に従い、マウス細胞を用いてこれを分取したものと、前述の ES 細胞由来赤血球前駆細胞株 (MEDEP) を用いて Subtraction Assay を行った。MEDEP は脱核能を有するが限定的であり、培養条件での脱核は非常に少ないため、初代培養細胞と遺伝子発現の差異を調べることで実行遺伝子が同定できるのではないかと考えた。実験の結果、初代培養細胞特異的に発現していると思われる遺伝子として5つ、MEDEP 特異的に発現していると思われる遺伝子として4つが見つかった。その中で MEDEP 特異的に発現している遺伝子として挙げてきた GDI-beta は、近年 (トリガーではないが) 脱核に必須な遺伝子とされる mDia などが含まれる Rho シグナルに關与する遺伝子であった。

MEDEP

| Name | Accs. No. | Gene Name |
|------|-----------|---|
| M03 | NM172703 | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3 |
| | NM007486 | Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta |
| M04 | NM144858 | Dihydrouridine synthase 3-like |
| M05 | NM023119 | Enolase 1, alpha non-neuron |
| M07 | NM023418 | Phosphoglycerate mutase 1 |
| | NM008060 | Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit |
| M08 | X05165 | Murine Leukemia virus (MuLV) endonuclease gene |
| M09 | NM009150 | Selenium binding protein 1 |
| M18 | BC113756 | Melanoma antigen |
| M19 | BC113756 | Melanoma antigen |
| M24 | NM011046 | Furin (paired basic amino acid cleaving enzyme) ??? |

Ter119(-)

| Name | Accs. No. | Gene Name |
|------|-----------|--|
| T05 | BC010203 | Flap structure specific endonuclease 1 |
| T08 | - | - |
| T09 | - | - |
| T11 | - | - |

| | | |
|-----|----------|---|
| T13 | - | - |
| T16 | BC092240 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 |

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三原田 賢一 (MIHARADA KEN-ICHI)
独立行政法人理化学研究所・細胞材料開
発室・基礎科学特別研究員
研究者番号：40455366