

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12785

研究課題名（和文）幹細胞から成熟赤血球製造効率の向上に向けた赤芽球脱核現象の制御研究

研究課題名（英文）Regulation of erythroblast enucleation to improve the efficiency of mature erythrocyte production from stem cells

研究代表者

満田 憲昭（Mitsuda, Noriaki）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10314329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞周期制御因子Cyclin D3はCdk4と複合体を形成しキナーゼ活性を発揮させることが知られている。申請者は赤芽球脱核時にプロテアソームによってCyclin D3が分解されることやCyclin D3の分解を人為的に遅らせることにより脱核の進行が遅れること、またその脱核の遅れがCdk4阻害剤の添加によりキャンセルされることを見出した。これらの結果から、プロテアソームによるCyclin D3-Cdk4複合体のキナーゼ活性の低下が赤芽球に脱核を誘導するトリガーであり、それを制御することによって赤芽球の脱核効率を改善できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性的な輸血用血液不足や献血における未知の感染症の問題から、献血に頼らない新たな輸血用血液の供給システムの確立が必要とされている。そのためには多分化能を有する細胞から赤血球を作製する試みがなされているが、脱核の効率が悪く実用化に至っていない。申請者はプロテアソームによるCyclin D3の分解が脱核を誘導するトリガーであり、これを制御することによって赤芽球の脱核効率を改善できる可能性を見出した。本研究結果から、多分化能を有する細胞から効率よく赤血球を作製する薬剤の開発が可能となれば、社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：The cell cycle regulator Cyclin D3 is known to form a complex with Cdk4 and exert its kinase activity. The applicant found that Cyclin D3 is degraded by proteasomes during enucleation of mouse erythroblasts, that the progress of enucleation is delayed by artificially delaying the degradation of Cyclin D3, and that the delay in enucleation is canceled by the addition of Cdk4 inhibitors. These results suggest that degradation of Cyclin D3 by proteasomes and reduction of the kinase activity of the Cyclin D3-Cdk4 complex are triggers that induce enucleation, and that control of these factors can improve the efficiency of erythroblast enucleation.

研究分野：生理学

キーワード：Cyclin D3 プロテアソーム 赤血球分化 脱核

## 1. 研究開始当初の背景

慢性的な輸血用血液不足や献血における未知の感染症の問題から、献血に頼らない新たな輸血用血液の供給システムの確立が必要とされている。最近、ヒト ES 細胞から赤芽球前駆細胞の性質を維持し、安定した増殖を示す不死化赤芽球株が作製され、分化誘導後に脱核が観察されることや高いヘモグロビン合成能を有していることが示された。このことから O 型 Rh(D) 陰性血液型ドナーからヒト iPS 細胞を作製し、同様の方法でヒト不死化赤芽球株を作製することで理論上ほぼ全ての患者に対する輸血用赤血球製剤の作製が可能と考えられる。しかしながら、現状では脱核効率が悪く、実用化には至っていない。

哺乳類の赤血球分化においてのみ観察される脱核は、赤血球分化の最終過程で行われるダイナミックな生命現象である。赤芽球前駆細胞は、赤芽球増殖・分化因子であるエリスロポエチン (EPO) 刺激を受けて赤芽球に分化し、約 5 回細胞分裂を行った後、増殖を停止し、脱核する。申請者はこれまでに、マウス赤芽球の脱核へのトランスフェリン受容体 1 の関与を報告している (FEBS Open Bio, 2019)。しかしながら、EPO 刺激を受け増殖を開始した赤芽球系前駆細胞が、その後増殖を停止し、脱核するメカニズムはよくわかっていない。

多分化能を有する細胞からの輸血用赤血球製剤の作製には、脱核効率を改善する何らかの工夫が必要であり、そのためには脱核過程そのものの理解が必要であると考えられる。そこで申請者は、脱核効率を良くするためには、赤芽球が増殖を停止し、脱核を開始するメカニズムを解析することが重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

細胞周期制御因子である Cyclin D3 のノックマウスの解析結果から、赤芽球系前駆細胞の EPO 刺激による分化誘導の際に Cyclin D3 が細胞分裂の回数を制御し、それによって赤血球のサイズと数を制御している可能性が示唆されている。しかしながら、そのメカニズムについては不明であることから、申請者は赤芽球分化過程における Cyclin D3 の挙動をより詳細に解析し、その知見により Cyclin D3 の機能制御の開発を行う。本研究成果を、多分化能を有する細胞から赤血球を分化誘導に応用することにより Cyclin D3 の機能制御による脱核効率の改善が可能となり、社会的意義は極めて大きい。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス胎児肝臓由来赤芽球系前駆細胞の単離と分化誘導

マウスを交配させ、交尾を確認後 14.5 日目の胚を取り出し、肝臓を摘出する。摘出した肝臓をナイロンメッシュ上ですり潰し、細胞浮遊液を得る。得られた細胞浮遊液から赤芽球マーカー Ter119 陽性細胞を抗体と磁気ビーズを用いて除去し、Ter119 陰性細胞 (赤芽球系前駆細胞) を得る。ヒト組換え EPO 存在下での培養により Ter119 陽性細胞 (赤芽球) へと分化させ、脱核を誘導する。

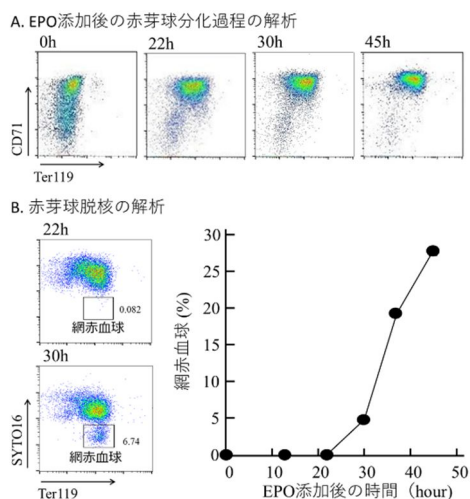
### (2) フローサイトメトリーによる赤芽球の分化と脱核の解析

赤芽球の分化は、蛍光標識した抗赤芽球特異的分化マーカーTer119 抗体と抗赤芽球非特異的マーカーCD71 抗体による染色により解析する。脱核は、蛍光標識抗 Ter119 抗体と膜透過性 DNA 結合色素 SYTO16 による染色を行い、脱核によって生じる網赤血球 (Ter119<sup>high</sup>SYTO16<sup>low</sup> 細胞) の割合を脱核率として評価する。

(3) マウス赤芽球へのプラスミド DNA や siRNA の導入

Lonza 社 Nucleofector 2b と Cell Line Nucleofector kit V による nucleofection 法を用いる。

プログラムは X-001 を使用した。予備実験により、この条件では約 60% の効率でプラスミド DNA が導入される。nucleofection 後、EPO を含む培地中で 13 時間培養し、赤芽球を回収する。Lymphoprep を用いた密度勾配遠心により死細胞を除去し、引き続き EPO を含む培地中で培養する。

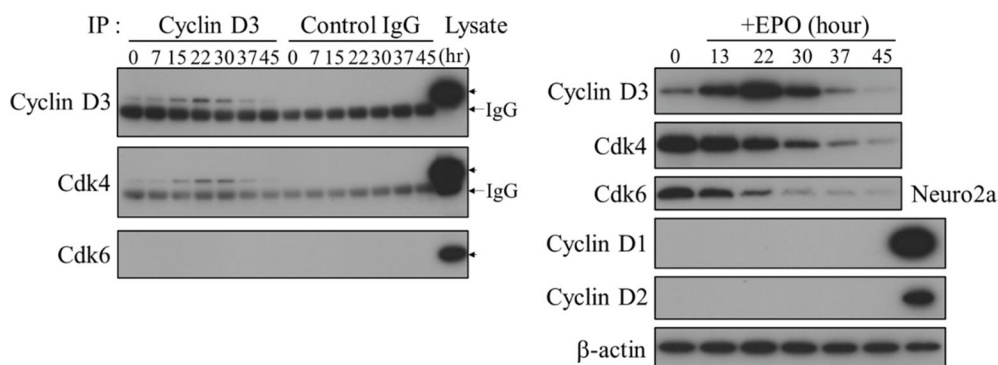


#### 4. 研究の成果

これまでの研究により Cyclin D ファミリーには Cyclin D1, D2, D3 の 3 種類が存在し、それらは Cyclin-dependent kinase (Cdk) 4 や Cdk6 (Cdk4/6) と複合体を形成しキナーゼ活性を發揮させることが知られている。申請者は、これらについて以下のことを明らかにした。

(1) マウス赤芽球には、Cdk4 および Cdk6 が発現し、Cyclin D ファミリーとして Cyclin D3 のみが発現している。免疫沈降実験から Cyclin D3 は主に Cdk4 と複合体を形成し、Cdk6 との複合体は検出限界以下であった。

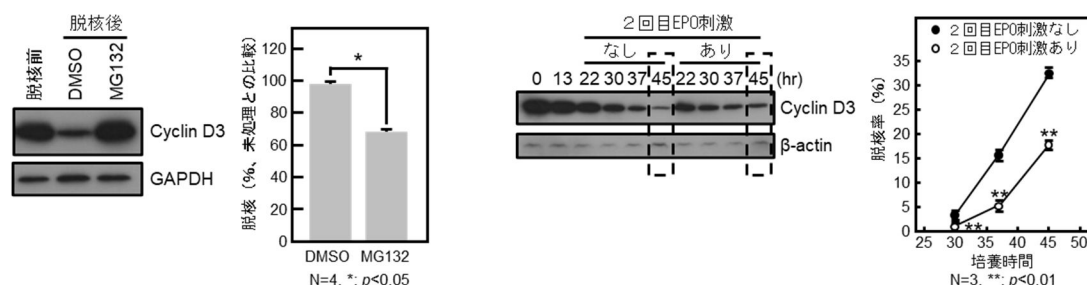
(2) EPO 刺激により分化誘導した際に Cyclin D3 タンパク質量が増加し、脱核開始時 (誘導開始後 30 時間) に分解を受ける。



(3) 脱核時に Cyclin D3 タンパク質はプロテアソームにより分解を受ける。

(4) プロテアソーム阻害剤 (MG132) の添加により、Cyclin D3 タンパク質の分解が阻害されるとともに脱核が抑制される。

(5) EPO 刺激による分化誘導の 13 時間後に 2 回目の EPO 刺激を行うことにより Cyclin D3 タンパク質の分解が遅れ、かつ脱核の進行も遅れた。この脱核の遅れは Cdk4 阻害剤 (PD0332991) の添加により緩和された。



以上の結果は、赤芽球が分化する際の Cyclin D3 のプロテアソームによる分解を受け、それを人為的に遅らせることにより脱核の進行が遅れること、またその脱核の遅れが Cdk4/6 阻害剤の添加によりキャンセルされることを意味し、脱核の開始時期の決定に Cyclin D3-Cdk4 複合体の分解によるキナーゼ活性の低下が重要であることがより強く示唆された。

脱核開始時期の決定に Cyclin D3 タンパク質のプロテアソームによる分解が重要な働きをしている可能性を更に検証する為に、プロテアソームによる分解を受けない Cyclin D 変異体の発現を、レンチウイルスベクターを用いて試みたが、赤芽球内での変異体タンパク質の発現を確認することはできなかった。Cyclin D3 タンパク質のプロテアソームによる分解に係るユビキチンリガーゼの候補である SCF E3 ユビキチンリガーゼ複合体 (SCF 複合体) の基質特異性を決める構成因子である F-box タンパク質のうち Fbx120 の mRNA がエリスロポエチン刺激共に増加していることを見出した。更に Fbx120 siRNA が Cyclin D3 タンパク質の分解を抑制するとともに脱核を遅らせたことから、脱核開始時期の決定に Fbx120 の関与が示唆された。

今後は、ES 細胞や iPS 細胞、臍帯血由来 CD34 陽性前駆細胞といった多分化能を有する細胞から赤血球を誘導する際に Fbx120 が脱核を制御する薬剤のターゲット候補として有用かどうかを検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoto Mamoru, Iwashita Akiho, Mita Kanako, Ohkubo Nobutaka, Tsujimoto Yoshihide, Mitsuda Noriaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Transferrin receptor 1 is required for enucleation of mouse erythroblasts during terminal differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 291 ~ 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12573	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 Ohkubo Nobutaka, Aoto Mamoru, Kon Kazunori, Mitsuda Noriaki	4. 巻 231
2. 論文標題 Lack of zinc finger protein 521 upregulates dopamine -hydroxylase expression in the mouse brain, leading to abnormal behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 116559 ~ 116559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2019.116559	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------