

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591242

研究課題名 (和文) 細胞核に局在する WASP 蛋白質複合体の機能解明とその臨床的意義

研究課題名 (英文) Clinical significance of WASP protein complex in nucleus.

研究代表者

笹原 洋二 (SASAHARA YOJI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：60372314

研究成果の概要 (和文)：

原発性免疫不全症 Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子は WASP であり、その恒常的活性化変異により好中球減少症と骨髄異形成症候群を引き起こす。その分子病態として、WASP は骨髄球系細胞の細胞核内においてその分化に重要な遺伝子の転写調節に関与していることを明らかにした。また、WIP(WASP 結合蛋白質)と複合体を形成し、WIP との結合が WASP の安定化と機能に重要であることも明らかにし、新規病型の病態理解に貢献した。

研究成果の概要 (英文)：

Constitutively activating WASP causes X-linked neutropenia and myelodysplastic syndrome. We have identified that WASP played a significant role in transcriptional regulation of myeloid cell differentiation in nucleus. We also clarified that WIP formed a complex with WASP and regulated WASP protein stability, leading us to understand molecular pathogenesis of new type of WAS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：WASP、WIP、原発性免疫不全症、Wiskott-Aldrich 症候群

## 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は大学院在籍中より現在まで、WASP の分子病態の研究を継続しており、これまでに、Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)の遺伝子診断系とフローサイトメトリー法による迅速簡易診断系を確立し、現在臨床診断に広く応用されている。併せて臨床的に示唆に富む同症候群患児の症例報告も行ってきた。分子病態の基礎研究としては、WASP は

T 細胞受容体シグナル伝達系(TCR)においてアクチン重合化とサイトカイン産生を司る重要な分子であることから、T 細胞受容体刺激後または T 細胞-抗原提示細胞間免疫学的シナプス形成時における WASP のシナプスへのリクルートの分子機構につき報告している。2007 年には、WIP ノックアウトマウス T 細胞において WASP 蛋白質発現が正常の 10%以下に低下していること、WASP と

WIP ノックアウトマウスの表現型が類似していること、WAS 患者の変異解析の集計から WAS 患者の WASP ミスセンス変異の 90% 以上が WIP 結合領域に集中していることを発見し、WIP は WASP の分子シャペロンとして機能し、WIP による WASP 蛋白質の安定化機構の破綻が大多数の WAS 患者の分子病態の理解に重要であることを共筆頭者として報告している。近年になり WASP 恒常的活性化変異による X 染色体連鎖性好中球減少症 (XLN) と骨髓異形成症候群 (MDS) 症例の報告がなされた。これまで WASP の機能解析は細胞質や免疫学的シナプスなど細胞膜近傍での細胞骨格系の制御を中心になされてきたが、その後は細胞核内にて WASP が細胞分化に重要な遺伝子転写調節系や染色体安定性にも重要な役割を果たすことを解明する必要性があった。

## 2. 研究の目的

(1) WASP の細胞核内での新しい機能解析、WASP 恒常的活性化変異による X 染色体連鎖性好中球減少症 (XLN) および骨髓異形成症候群 (MDS) 分子病態解析

細胞核内において WASP が骨髓球系細胞分化に重要な遺伝子転写調節系や染色体安定性にも重要な役割を果たすことを解明する。そのために、疾患のモデル系として、WASP の恒常的活性化変異による X 染色体連鎖性好中球減少症 (XLN)、WASP 異常症としての骨髓異形成症候群 (MDS) の分子病態を解明する。

## (2) WASP-WIP 複合体としての機能解析

WASP が活性化され、機能を発揮した後の WASP 蛋白質分解の分子メカニズムは未だ不明であるため、その詳細と WASP 蛋白質安定性における WIP の役割について解析する。(1) の研究成果を踏まえ、WASP の細胞核内での機能が WASP-WIP 蛋白質複合体として発揮されるかについて解明する。これにより、新規 WAS 病型である WIP 欠損症の解析と合わせ、WIP は WASP の蛋白質安定性、機能の発揮に不可欠な分子シャペロンとして機能するための分子機構を示し、WASP-WIP 複合体として、細胞核内で遺伝子転写系や染色体安定性を司る分子群としていかに機能するかを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) WASP の細胞核内での新しい機能解析、WASP 恒常的活性化変異による X 染色体連鎖性好中球減少症 (XLN) および骨髓異形成症候群 (MDS) の分子病態解析

X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked

neutropenia:XLN) は WASP の恒常的活性化変異により、WASP 蛋白質の 3 次構造が変化して常に active conformation の状態となり、WASP 活性化を司る結合分子群との結合が強まり Arp2/3 を介したアクチン重合化が促進されるために、結果として骨髓中の骨髓球系細胞の分化停止により引き起こされる病態である。そこで本研究代表者は、HA-tag を付加した恒常的活性化変異型 WASP、野生型 WASP 遺伝子発現ベクターを、内因性 WASP を発現していない骨髓球系細胞株 K562 に恒常的に発現させ、最適な恒常的発現細胞株クローンを選択し、WASP の細胞内局在、チロシンリン酸化レベルを検討した。次に、この遺伝子導入細胞株より抽出した total RNA を用いて、マイクロアレイ法にて、遺伝子発現プロファイルを骨髓球系細胞の分化、アポトーシスに関与する遺伝子群の転写に絞って網羅的に検索した。これらの遺伝子群が本当に転写活性調節を受けるかを定量的 RT-PCR 法や Western Blot 法などにより検証し、その遺伝子群の転写制御系に WASP がいかに関わっているかを分子生物学的手法を用いて検討した。上記細胞株を用いて、Chip 法や免疫沈降法、更には Chip on Chip 法などにより WASP と転写制御に関わる分子群間相互作用を検討した。

## (2) WASP-WIP 複合体としての機能解析

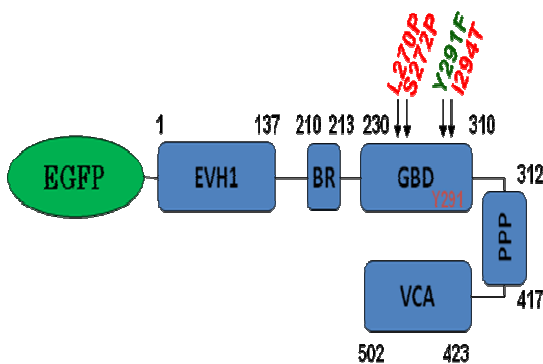
WASP 活性化後におこる WASP 蛋白質分解のメカニズムを T 細胞株を用いて検討した。まず、in vitro transcription translation 法により精製準備済である WASP 蛋白質を用いて、WASP が in vitro において、calpain、ユビキチン化の基質となるかを検討した。次に、in vivo において calpain 阻害剤、proteasome 阻害剤にて T 細胞を培養し、T 細胞受容体刺激後の WASP の断片化が calpain 阻害剤により阻害されるか、proteasome 阻害剤により WASP 蛋白質分解が阻害されるかを検証し、T 細胞内で WASP が calpain, ubiquitin-proteasome 系の基質となるかを検討した。ユビキチン化が証明された場合、T 細胞受容体シグナル伝達系を負に制御する Cbl ubiquitin ligase family を介してユビキチン化を受ける可能性を予想した。Cbl-b, c-Cbl ノックアウトマウス T 細胞、同 ubiquitin ligase family の RNAi (RNA interference) の系を T 細胞株を用いて、WASP ユビキチン化や安定化を野生細胞

株と比較することにより検討した。次に、WASP リン酸化（活性化）および恒常的活性化変異、WASP-WIP 複合体の形成が WASP 断片化、ユビキチン化、蛋白質半減期に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) WASP の細胞核内での新しい機能解析、WASP 恒常的活性化変異による X 染色体連鎖性好中球減少症 (XLN) および骨髓異形成症候群 (MDS) の分子病態解析

GFP を付加した恒常的活性化変異型 WASP、野生型 WASP 遺伝子発現ベクターを、内因性 WASP を発現していない骨髓球系細胞株 K562 の恒



常的発現株を樹立した。その 1 次構造を図 1 に示す。

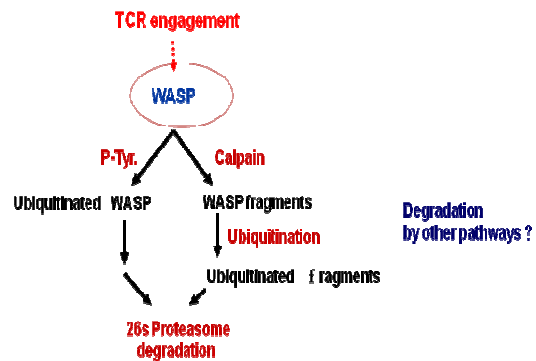
図 1. 恒常的活性化変異 WASP 発現ベクターの 1 次構造

恒常的活性化変異 WASP はチロシンキナーゼによるチロシンリン酸化が亢進し、ポドゾーム形成が亢進し機能的にも活性化していることを確認した。マイクロアレイ法にて、遺伝子発現プロファイルを骨髓球系細胞の分化、アポトーシスに關与する遺伝子群の転写に絞って網羅的に検索したところ、WASP 活性化が細胞核内で骨髓球系細胞分化に重要な複数の遺伝子発現調節に関わっていることがわかった。また、Cos7 細胞を用いた実験から、恒常的活性化変異 WASP はチロシンリン酸化の亢進とともに、細胞内局在がより細胞核に移行し、転写調節に重要な分子群と結合していることもわかった。その論旨を図 1 に示す。現在論文投稿中である。

この成果により、WASP が細胞核内で血球分化に重要な役割を果たしている可能性が示され、今後好中球減少症の病態、ひいては WAS 患者でみられる悪性腫瘍合併の分子メカニ

ズムへ発展できる点で興味深い。

(2) WASP-WIP 複合体としての機能解析  
常染色体性、Type-2 WAS としての WIP 欠損症の疾患概念を提唱するために、WAS 様の臨床所見や経過がありながら WASP 遺伝子に変異を認めない症例を対象に、国内検体の解析を継続して行っている。WIP 欠損症の分子病態の理解のために、WASP 蛋白質活性化後の蛋白質分解のメカニズムを主に T 細胞株を用いて解析したところ、蛋白質分解酵素やユビキチン-プロテアゾーム系が関与し、その WASP 蛋白質分解機構における WIP の重要性を発



見した。WASP 蛋白質分解機構の論旨を図 2 に示す。現在論文投稿準備中である。

図 2. T 細胞における WASP 蛋白質分解機構

この成果により、T 細胞における WASP 蛋白質分解機構が明らかになり、臨床的になぜ WASP ミスセンス変異が WIP 結合領域に集中しているかの理由を示すことができた。また、新病型である WIP 欠損症の分子病態を理解する上で世界的にも貢献できる重要な知見を得ることができた。

#### 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 4 件)

①Watanabe Y, Sasahara Y, Tsuchiya S, ほか10名 (9番目)、Vincristine-resistant Kasabach-Meritt phenomenon successfully treated with low-dose irradiation. Int. J. Hematol., 93, 126-128, 2011、査読有

②管野潤子、笹原洋二、土屋滋、ほか 8 名 (6 番目)、4 度の造血幹細胞移植を施行した重症再生不良性貧血に 1 例における内分泌学的合併症. 日本小児血液学会雑誌、24(1)、

47-51、2010、査読有

③Horino S, Sasahara Y, Tsuchiya S, ほか10名 (8番目)、Refractory chronic immune thrombocytopenic purpura in a child with acute lymphoblastic leukemia. Int. J. Hematol.、90、483-485、2009、査読有

④Morinishi Y, Sasahara Y, Nonoyama S, ほか 31 名 (18 番目)、Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using Guthrie cards. J. Pediatr.、155(6)、829-833、2009、査読有

[学会発表] (計 10 件)

①笹原洋二、土屋滋、他、ITP との鑑別に重要な WAS/XLT の分子病態における WIP の役割、第 52 回日本小児血液学会、平成 22 年 12 月 17 日、大阪

②笹原洋二、Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態からみた感染症と WIP の役割、第 42 回日本小児感染症学会、平成 22 年 11 月 27 日、仙台

③笹原洋二、土屋滋、他、Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態の多様性と WIP 欠損症発見の試み、第 72 回日本血液学会、平成 22 年 9 月 26 日、横浜

④笹原洋二、土屋滋、他、骨髄非破壊的前処置にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症 6 症例の検討、第 72 回日本血液学会、平成 22 年 9 月 25 日、横浜

⑤笹原洋二、土屋滋、他、骨髄非破壊的前処置にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症 6 症例の検討、第 113 回日本小児科学会学術集会、平成 22 年 4 月 24 日、盛岡

⑥力石 健、笹原洋二、他、悪性リンパ腫を合併した Wiskott-Aldrich 症候群患者に対する RIST による骨髄移植の経験、第 32 回日本造血細胞移植学会総会、平成 22 年 2 月 20 日、浜松

⑦ Yoji Sasahara、Role of WIP in Wiskott-Aldrich syndrome、The 2<sup>nd</sup> Symposium for PID in Asia、平成 22 年 2 月 4 日、千葉、かずさ DNA 研究所

⑧Yoji Sasahara、WIP is a chaperone for WASP、50<sup>th</sup> American Society of Hematology (第50回米国血液学会) Annual Meeting、平成20年12月6日、サンフランシスコ (米国)

⑨笹原洋二、Meet the expert: Waltzing with WASP、第50回日本小児血

液学会、平成20年11月16日、幕張  
⑩笹原洋二、土屋滋、他、WASP 異常症の多様性とその分子病態の解明に向けて、第 50 回日本小児血液学会、平成 20 年 11 月 15 日、幕張

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹原 洋二 (SASAHARA YOJI)

東北大学・病院・講師

研究者番号 : 60372314

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者