

平成22年 6月15日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790685

研究課題名 (和文) オーファン受容体 Tie1 のリガンド同定と血液学的機能解析

研究課題名 (英文) Ligand screening and functional analysis of Tie1

研究代表者

百瀬 暖佳 (MOMOSE HARUKA)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：70415488

研究成果の概要 (和文) : 造血幹細胞は全ての血球細胞への多分化能と自己複製能を保持した細胞であり、生涯に渡って血球細胞を供給し続ける。造血幹細胞の維持は血液システムの維持にとって極めて重要であるが、その機能を制御する分子機構についてはあまり理解が進んでいない。本研究では、造血幹細胞に高く発現している受容体型チロシンキナーゼ Tie1 に着目し、オーファン受容体であり未解明な部分が多い Tie1 の機能解明を目指して、リガンドの同定を試み、いくつかの候補分子を見出した。

研究成果の概要 (英文) : Hematopoietic stem cells (HSCs) are clonogenic cells which possess self-renewal capacity and pluripotency for the maintenance and the repair of whole blood system. The regulation of HSCs is very important for blood homeostasis, however, the precise molecular mechanisms regulating HSCs remain elusive. In this work, I focused on Tie1, a receptor tyrosine kinase which is expressed in HSCs. I had searched ligands of this orphan receptor to understand the function of Tie1. Several candidates were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000		3,200,000

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：血液免疫学

造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、全ての血球細胞へ分化する

多分化能と、未分化性を保持したまま増殖を続ける自己複製能を持った幹細胞であり、生

涯に渡って血球細胞を供給し続ける。胎児期に AGM 領域で発生した造血幹細胞は、胎児の肝臓を経て、出生の前後に骨髄へ到達する。その後、造血幹細胞は骨髄内に留まり、骨髄が成体における造血の場となる。

造血幹細胞は骨髄内の幹細胞ニッチに局在して存在する。ニッチには骨芽細胞で構成される osteoblastic niche、脈管を形成する細胞で構成される vascular niche などがあるが、いずれのニッチにおいても、ニッチ細胞と造血幹細胞との細胞間相互作用が、造血幹細胞の機能を維持するために不可欠とされている。造血幹細胞の機能を維持する細胞間相互作用の分子メカニズム一つとして、ニッチ細胞から供給される Angiopoietin-1 を介した造血幹細胞の Tie2 活性化が知られている。

2. 研究の目的

本研究では、Tie2 と同じファミリーに属しながら機能解明がほとんど進んでいないオーファン受容体、Tie1 に着目した。これまで構造上、および発現パターンの類似性から、Tie1 と Tie2 は同様の機能を担うと考えられてきたが、Tie1 ノックアウトマウスと Tie2 および Angiopoietin-1 ノックアウトマウスでは、胎生死亡時期や表現型が若干異なっている (*Nature*, 376, 70-74, 1995, *Cell*, 87, 1171-1180, 1996)。ノックアウトマウスの表現型に相違がみられることは、Tie1 が Tie2 とは異なる機能を持つこと、Angiopoietin-1 以外に Tie1 の生理的リガンドが存在する可能性を示唆するものである。本研究課題では、Tie1 の生理的リガンドの同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) シグナルシーケンストラップ法を用いたリガンド探索

Tie1 の細胞外ドメイン融合蛋白質 Tie1-Fc を用い、改良型シグナルシーケンストラップ法によりリガンドのスクリーニングを行った (*Nat. Immunol.*, 4, 457-463, 2003 参照)。フローサイトメトリーの原理を用いて、リガンド発現細胞由来の cDNA ライブラリーを導入した細胞集団より、リガンド候補分子を発現しているクローンを分取した。得られたクローンから cDNA を回収してシーケンシングを行うことにより、リガンド候補分子の同定を試みた。

(2) 銀染色と質量分析

hTERT 細胞のライセートから Tie1-Fc により

免疫沈降を行った後、SDS-PAGE でたん白質を分離し、ゲルの銀染色を行った。得られたバンドを切り出し、質量分析を行ってバンドの同定を試みた。

(3) 結合実験

Tie1-Fc を用いて、スクリーニングにより得られたリガンド候補分子を免疫沈降し、ウェスタンブロット法にて結合の有無の確認を行った。

4. 研究成果

(1) OP9 細胞を用いたリガンド探索 (シグナルシーケンストラップ法)

OP9 細胞は血液細胞支持能力があることで知られ、Tie2 のリガンドである Angiopoietin-1 を発現している。従って、OP9 が Tie1 のリガンドも発現している可能性を考えて、FACS 解析により検討したところ、Tie1-Fc と OP9 細胞との結合が確認されたため (Fig. 1)、OP9 細胞の cDNA ライブラリーを用いてリガンドスクリーニングをおこなった。その結果、1 回目のスクリーニングではポジティブな細胞集団が得られたものの、スクリーニングの回数を重ねる毎にポジティブ集団は減少し、最終的にポジティブクローンを得るに至らなかった。

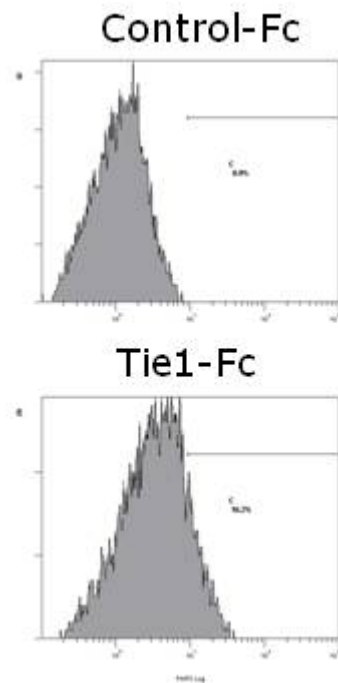


Fig. 1 OP9 細胞に対する Tie1-Fc の結合能

当初の解析で、OP9 細胞への Tie1-Fc 蛋白質の結合能が高くはなかったことから (Fig. 1)、

OP9細胞に発現しているリガンド量が少ないことが、ポジティブクローンを得られなかった原因の一つと考えられた。

(2) hTERT細胞を用いたリガンド探索 (シグナルシーケンストラップ法)

Tie1リガンドスクリーニングの材料として、Tie1-Fcとより強く相互作用する細胞を探索し、OP9細胞同様に血液細胞支持能力があるhTERT細胞を用いることとした (Fig. 2)。hTERTのcDNAライブラリーを用いて再度スクリーニングを行った結果、スクリーニング回数を重ねる毎にポジティブ集団の割合が増加し、その中から複数のポジティブクローンを得ることに成功した。それぞれのポジティブクローンからhTERT由来のcDNAを回収し、シーケンシングを行ったところ、2種類のTie1リガンド候補分子を同定した。

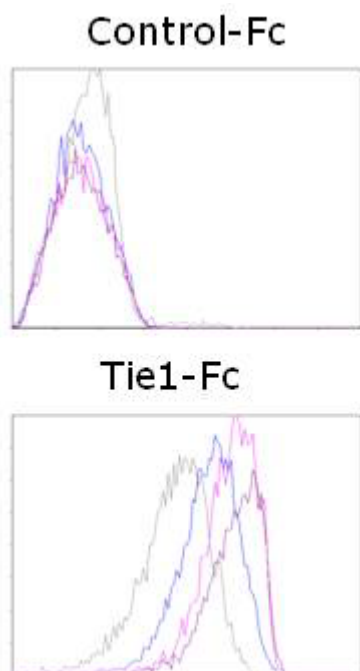


Fig. 2 hTERT細胞に対するTie1-Fcの結合能

(3) hTERT細胞を用いたリガンド探索 (免疫沈降法)

(2)と並行して、Tie1-Fcに結合する分子をhTERT細胞のライセートから免疫沈降により精製し、質量分析にかけたところ、別のリガンド候補分子が同定された (Fig. 3、矢印)。

(4) リガンド候補分子とTie1-Fcの結合同定した全てのリガンド候補分子について結合実験を行ったが、*in vitro*におけるTie1と

の明確な結合能は今のところ見出されていない。Tie1とリガンドとの結合は、弱い可能性に流動的である可能性がある。クロスリンカー等を活用したTie1とリガンド候補分子との結合実験、リガンド候補分子によるTie1の活性化能を検討する添加実験等の必要性が考えられた。



Fig. 3 hTERT細胞内のTie1-Fc結合蛋白質

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Masumi A, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Mizukami T, Takizawa K, Momose H ら、Interferon regulatory factor-2 induces megakaryopoiesis in mouse bone marrow hematopoietic cells, FEBS Letters, 査読有、583 巻、2009、3493-3500

② Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H ら、Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/ lymphoma, Blood, 査読有、114 巻、2009、2709-2720

③ Tanemura S, Momose H ら、Blockage by SP600125 of Fce Receptor-mediated degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway, Journal of Biochemistry, 査読有、145 巻、2009、345-354

[学会発表] (計3件)

① 百瀬暖佳、Tie2/Angiopoiein-1 シグナルを介した造血幹細胞の自律的制御機構の解析、第71回日本血液学会学術集会、2009

年 10 月 25 日、京都

- ②百瀬暖佳、Tie2/Angiopoietin-1 シグナルを介した造血幹細胞の増殖制御、第 81 回日本生化学会大会/第 31 回日本分子生物学会合同学会、2008 年 12 月 10 日、神戸
- ③ 百瀬暖佳、造血幹細胞における Tie2/Angiopoietin-1 シグナルの解析、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 12 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百瀬 暖佳 (MOMOSE HARUKA)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：70415488