

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03138

研究課題名(和文) コレステロール結合膜蛋白質TSP02が赤芽球造血に果たす役割の分子機序

研究課題名(英文) Mechanism for the roles of cholesterol-binding membrane protein TSP02 in terminal erythroid differentiation

研究代表者

稲葉 睦 (Inaba, Mutsumi)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：00183179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：後期赤芽球に発現するコレステロール結合膜内性タンパク質TSP02の赤芽球産生におけるTSP02の役割を、マウスモデルを用いて検討した。TSP02をノックアウトしたマウスの赤芽球と赤芽球系培養細胞はいずれも細胞周期の異常により細胞分裂、増殖、ならびに赤芽球系成熟の異常を生じ、正常な赤血球産生が障害された。TSP02欠損赤芽球は細胞内コレステロール動態の異常を示し、リソソームやゴルジ装置に検出されるTSP02の導入はその改善を生じる一方、細胞外高コレステロール処理では改善を生じなかった。TSP02は細胞内コレステロール分布の制御を介して効率的赤芽球産生を支えることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、貧血患者における低コレステロール血症やコレステロール過剰と赤血球産生異常の関係など、赤芽球系造血におけるコレステロール代謝の重要性が報告されているが、赤血球産生過程でコレステロールがどのように関わるのか、その機作や実態は不明である。本研究成果は、TSP02という膜タンパク質が赤芽球の細胞内コレステロールを制御して赤芽球系終末分化における生理的な細胞増殖と成熟を支え、効率的な赤血球産生を可能にすることを示したものであり、生理的赤血球産生機序の解明、貧血等疾患の的確な診断・治療、人口赤血球産生の効率化、さらにコレステロールに関する適正な医療情報等に大きな学術的・社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The roles of TSP02, a transmembrane cholesterol-binding protein expressed in late erythroblasts, were examined using Tspo2 knockout mouse models. Bone marrow-derived TSP02-deficient erythroid cells, as well as Tspo2-knockout MEDEP cells, showed impaired cytokinesis and morphological defects associated with a cell-cycle arrest, resulting in decreased cell proliferation and delays in erythroid maturation with a consequent reduction in red cell production. TSP02-deficient erythroid cells exhibited an increased release of incorporated cholesterol. The expression of HA-tagged TSP02 that found in the Golgi apparatus and lysosomes, by transient expression and gene editing, rescued such defects, whereas the supplementation of exogenous cholesterol had no effect. These findings imply that TSP02 is essential for coordination of maturation and proliferation of erythroblasts during normal erythropoiesis and that TSP02 regulates intracellular distribution of cholesterol in late erythroblasts.

研究分野：獣医学、生化学、血液学

キーワード：赤芽球造血 赤血球 赤芽球 コレステロール コレステロール結合蛋白質 貧血

1. 研究開始当初の背景

貧血は、ヒト、動物を問わず多様な疾患に併発する最も普遍的かつ罹患率の高い病態である。原因の如何を問わず、健康の維持には貧血病態の的確な診断と治療が必要である。健康な個体における赤血球生産を支える、いわゆる「赤芽球造血 erythropoiesis」は、形態による同定が可能になる前赤芽球以降の後期赤芽球から充分な数の成熟赤血球を生み出す、生物に不可欠な過程である。ここでは細胞分裂、分化、抗アポトーシス等の厳密な制御により赤芽球の分化・成熟と増殖とが絶妙に協調・同時進行する。近年、この赤芽球造血の過程で生じる様々な特徴的变化、例えば核の濃縮と脱核、小器官の排除、細胞膜の再構成等、個々の現象のメカニズムが明らかにされている。さらに、大規模なゲノム解析からは、例えばサイクリン D3 の遺伝的多様性が赤血球サイズの個人差を決めることも明らかにされている。これらの基礎知見は、多様な貧血病態の把握、変化に富む造血状態の正確な評価、さらには治療に必要な機能的赤血球の体外生産法確立などに直結する重要な情報である。しかし、大量の赤血球を遅滞なく産生する仕組みは、骨髄の造血微細環境等を含めて多彩、かつなお未知である。これは赤血球の効率的体外生産を現実的に阻む大きな要因ともなっている。

犬の赤血球には個体によって HK 型(高 K⁺低 Na⁺)と LK 型(低 K⁺高 Na⁺)がある。HK 型と LK 型は赤血球膜の Na,K-ATPase の存否に依存し、LK 型は赤芽球成熟過程でこれを消失するが、HK 型には高活性で Na,K-ATPase が残存する。HK 型赤血球は他の膜蛋白質、解糖系酵素、エネルギー代謝等でも前駆細胞の性状を保った幼若な“成熟赤血球”である。すなわち、常染色体性劣性に遺伝する HK 型形質の原因遺伝子は、赤芽球造血の制御に関わるはずである。申請者らはゲノム一塩基多型解析により TSP02 (translocator protein 2) 遺伝子が HK 型の原因遺伝子であることを突き止めた。TSP02 は、体細胞のミトコンドリアに普遍的に存在するコレステロール輸送体 TSP0 の遺伝子重複産物として見いだされ、後期赤芽球に特異的なコレステロール結合蛋白質である。では、コレステロールは造血とどのような関係があるのか？コレステロールの著増による網状赤血球からの小器官排除の阻害、赤芽球脱核に際しての核周囲脂質ラフトの形成、慢性貧血患者における高頻度の低コレステロール血症など従来知見は、赤芽球造血におけるコレステロールの重要性を示唆している。しかし、後期赤芽球造血でコレステロールがなぜ重要なのか、そして TSP02 はどのような役割をもつか、これらは一切不明である。

2. 研究の目的

こうした学術背景と自身の知見を背景に、本研究では「コレステロールはどのような仕組みで赤芽球造血を支えるのか？TSP02 はどのような役割をもつか？」を具体的な学術的「問い」と設定し、TSP02 がコレステロールの細胞内貯蔵コレステロールの動態を調節することによって赤芽球の細胞分裂・細胞周期進行を支えることの実証し、その作用機序の一端の解明を目的とする。

具体的には、マウスモデル (*Tspo2*^{-/-}マウス、*Tspo2*^{-/-}赤芽球系 MEDEP 細胞) を用いて、

- 1) TSP02 がコレステロールの細胞内動態、あるいは代謝の制御を介して赤芽球分化・増殖を効率化することを実証する、さらに
- 2) TSP02 と細胞内コレステロールの細胞内動態、ならびに TSP02 によるコレステロール動員の分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Tspo2*^{-/-}マウスの骨髄由来赤芽球、ならびに *Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞の赤芽球終末分化過程における細胞増殖と成熟(ヘモグロビン合成、分化マーカーを指標とする)を正常細胞と比較検討し、TSP02 機能異常が赤芽球造血に与える影響とその仕組みを明らかにする。また、その異常が真に TSP02 の欠失に起因することを、*Tspo2*の導入・発現による回復で実証する。

(2) *Tspo2*^{-/-}マウスの赤芽球、ならびに *Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞に対する細胞外コレステロール供給変動の影響を探り、赤芽球病態が細胞内要因によることを実証する。

(3) マウス骨髄赤芽球、ならびに MEDEP 細胞における TSP02 の発現を解析する手段を確立する。TSP02 の発現動態解析には、TSP02 蛋白質の検出・追跡が不可欠である。従来を試みで特異性のある抗マウス TSP02 抗体を得ることが困難であるいは MEDEP 細胞を用いて、TSP02 の細胞内分布・動態を解析する。

4. 研究成果

(1) TSP02 欠損赤芽球における増殖・成熟の異常

TSP02 欠損マウス(*Tspo2*^{-/-}マウス)の赤血球数、ヘモグロビン濃度は、正常マウスに比べ有意に低値を示したが、その貧血は軽度で代償性であった。しかし、その骨髄では二核の赤芽球の増加や脱核の際の核の未成熟が明らかであり、多染性/正染性赤芽球の割合が増加するなど、成熟と細胞周期遅延が認め

られた(図1)。TSP02を欠損する MEDEP 細胞(*Tspo2*^{-/-}MEDEP)も二核細胞の増加、細胞増殖/細胞質分裂の異常、赤芽球系成熟(ヘモグロビン合成、CD44やCD71等の発現動態)の遅延等、生体赤芽球同様に赤芽球系成熟と細胞周期の明確な異常を呈した(図2)。これらの結果は、TSP02の異常

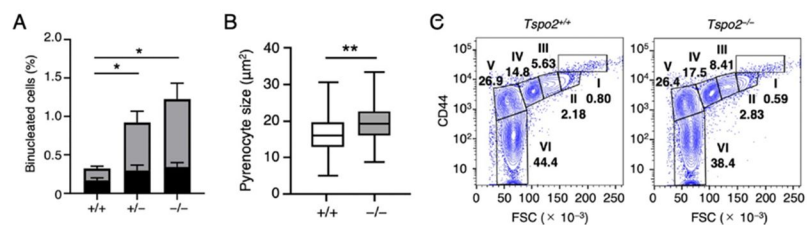


図1. *Tspo2*^{-/-}マウスにおける赤芽球の異常。*Tspo2*^{-/-}マウスでは二核/多核赤芽球の増加(A)、脱核時の核サイズの増加(B)ならびに多染性/正染性赤芽球の割合増加(C)が認められた。

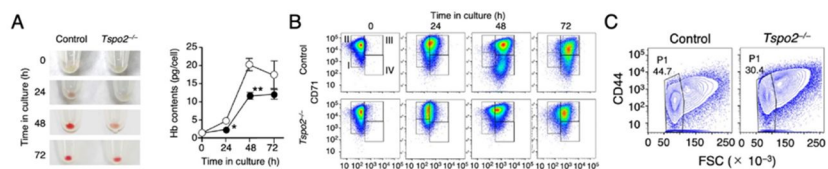


図2. *Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞における赤芽球系成熟の異常。EPOを添加して赤芽球系成熟を誘導した *Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞は明らかなヘモグロビン合成の遅延(A)、CD71/TER119分化マーカー(B)とCD44分化マーカー(C)発現の異常を呈した。

が赤芽球の細胞周期と成熟の異常を介して正常な赤血球産生を障害すること、すなわち TSP02 が生理的、効率的赤血球産生に不可欠な役割をもつことを示している。

(2) TSP02 とコレステロールの関係

Tspo2^{-/-} MEDEP 細胞では遊離/エステル型コレステロールの減少が認められた。*Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞は正常 MEDEP 細胞と有意差のない NBD-コレステロール取り込みを示した。一方、取り込ませた NBD-コレステロールの減少/流出は *Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞が有意に大きな値を示した(図3)。この結果は、TSP02 が細胞内コレステロールの動態を制御する可能性を示すものである。細胞外からのコレステロール供給(~50 µM)は、細胞の増殖や成熟を改善せず、むしろ、*Tspo2*^{-/-}細胞では細胞増殖がさらに抑制された。TSP02 欠損が細胞質分裂に必要な膜コレステロールの供給を低下させて赤芽球病態を生じることを仮定し、*Tspo2*^{-/-}マウスに高コレステロール食を与え、赤

芽球系造血に及ぼす影響を野生型 (WT) マウスと比較検討した。高コレステロール食を与えた *Tspo2*^{-/-} マウスは WT、*Tspo2*^{-/-}、いずれのマウスでも正常食に比べて貧血傾向を示し、骨髄赤芽球系細胞では好塩基性赤芽球や網状赤血球の増加等、造血亢進がみられたが、WT マウスとの有意差は認められなかった。

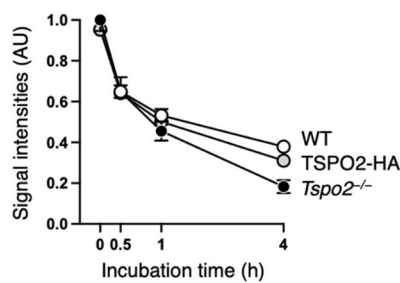


図3. MEDEP 細胞からの NBD-コレステロールの放出。正常 MEDEP 細胞 (WT)、*Tspo2*^{-/-} MEDEP 細胞 (*Tspo2*^{-/-})、TSP02-HA を導入した *Tspo2*^{-/-} 細胞 (TSP02-HA) に NBD-コレステロールを取り込ませ、その後 4 時間までのインキュベーションの後に細胞に残存する NBD-コレステロールを測定した。

これらは、細胞外コレステロールの供給では細胞の正常な増殖や分裂を改善できないことを示しており、TSP02 の機能が細胞内でのコレステロール動態・代謝にあることが推定された。なお、WT、*Tspo2*^{-/-} とともに血漿ビリルビン濃度と赤血球膜コレステロール含量の増加がみられたことから、赤血球膜が物理的に脆弱化して溶血を生じ、代償的な造血亢進が生じたものと考えられる。

(3) マウス赤芽球系細胞における TSP02 の検出・解析

TSP02-HA を発現する遺伝子組換えマウスを作出し、その骨髄赤芽球系細胞における TSP02-HA 発現状況を免疫染色等で検討した。ヘテロ接合型、ホモ接合型、いずれの個体でも TSP02-HA のシグナルは微弱ながら検出可能であり、フローサイトメトリーでは赤芽球終末分化・成熟過程の多染性赤芽球～正染性赤芽球の時期に発現増加が観察された。HA シグナルは主にゴルジ装置やリソソームと一致、あるいはその近傍に認められた。エンドソームマーカーとも近接した分布が観られ、これら複数小器官の間でのコレステロール転送に働く可能性が考えられる。MEDEP 細胞の TSP02 遺伝子を TSP02-HA に組み替えた場合、あるいはこれを一過性発現させた場合にも同様の細胞内分布が認められた。一方で末梢血赤血球には検出されず、小器官消失にともないほぼ失われることが示唆された。一過性発現の場合を除き、TSP02-HA のシグナルは比較的弱く、正常細胞での細胞内局在等解析には野生株との比較が常時必要であることが判明した。

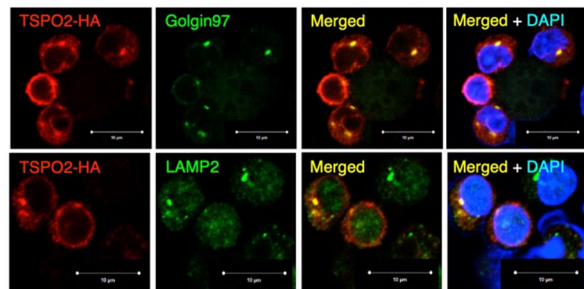


図4. TSP02-HA を導入した SEDEP 細胞における TSP02-HA を抗 HA 抗体で検出し (TSP02-HA) 小器官マーカーの分布と比較すると、ゴルジ装置、リソソームのマーカー (Golgin-97 と LAMP2) の分布との一致が認められた。

MEDEP 細胞に TSP02-HA を導入・発現させると、Golgin、LAMP2、NPC1 等との共在からゴルジ装置、リソソームに分布することが示された。同時に calnexin や Rab5, 7, 11 等 core Rabs との近接から、各種エンドソーム、小胞体の近傍に位置することも示された。さらに clathrin や catalase とも近接した分布が観察された。*Tspo2* 遺伝子を *Tspo2*-HA に変換した MEDEP 細胞でも同様の結果が得られた。

(4) マウス赤芽球系細胞におけるコレステロール動態

主にマウス ES 細胞由来赤芽球系培養細胞 (MEDEP) の正常 (WT) 細胞、*Tspo2*^{-/-} 細胞、ならびに *Tspo2*^{-/-} 細胞に TSP02-HA を導入した細胞 (*Tspo2*^{-/-}-HA) を用いてコレステロールの取り込み、細胞内遊離コレステロール / エステル型コレステロール (CEs) の分布を解析した。その結果、*Tspo2*^{-/-} 細胞は遊離型コレステロールを WT と同程度取り込めるが、それを小胞体 ER で CEs に変換し脂肪滴に貯蔵する割合が低く、多くは細胞外に失われること、TSP02-HA の発現でこの異常は解消

すること、高コレステロール給餌マウスの血清（主に HDL 由来の CEs が高濃度）は WT と同程度の CEs 蓄積を生じることが明らかになった。これらのデータは TSP02 が MEDEP 細胞内遊離型コレステロール/CEs の動態制御に関わることを実証し、細胞膜から小胞体に至る経路でコレステロールの輸送 / 転送に関わることを示唆している。

これらの結果から、TSP02 が主にゴルジ装置やリソソームに分布し、小胞体をゴールとして、各種輸送小胞やペルオキシソーム、小胞体との間のコレステロール輸送に関与することが推定され、その輸送機作は小胞輸送、もしくは小胞接触による転送が考えられた。近年、NPC1 や NPC2 等による細胞内コレステロールの輸送の機序、さらに SNAREs が関わる細胞内小器官間のコレステロール転送が報告されており、TSP02 が従来知られていない機作でコレステロールの細胞内輸送に関与することを示すものである。TSP02 は、こうした作用を介してコレステロール合成能を失った後期赤芽球のコレステロール需要を賄い効率的な赤血球生産を支えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kiatpakdee Benjaporn, Sato Kota, Otsuka Yayoi, Arashiki Nobuto, Chen Yuqi, Tsumita Takuya, Otsu Wataru, Yamamoto Akito, Kawata Reo, Yamazaki Jumpei, Sugimoto Yoshikazu, Takada Kensuke, Mohandas Narla, Inaba Mutsumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Cholesterol-binding protein TSP02 coordinates maturation and proliferation of terminally differentiating erythroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8048 ~ 8063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011679	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 該当する
1. 著者名 Cai Zimeng, Ishibashi Taishin, Kozai Mina, Mita Hironobu, Wang Shangyi, Takada Kensuke, Inaba Mutsumi	4. 巻 99
2. 論文標題 ROR agonist hampers the proliferation and survival of postactivated CD8+ T cells through the downregulation of cholesterol synthesis related genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 288 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imcb.12406	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 Wang, S., Kozai, M., Mita, H., Cai, Z., Masum, M. A., Ichii, O., Takada, K., and Inaba, M.	4. 巻 144
2. 論文標題 REV-ERB agonist suppresses IL-17 production in T cells and improves psoriatic dermatitis in a mouse model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.112283	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 Chen, Y., Miyazono, K., Otsuka, Y., Kanamori, M., Yamashita, A., Arashiki, N., Matsumoto, T., Takada, K., Sato, K., Mohandas, N., and Inaba, M.	4. 巻 299
2. 論文標題 Membrane skeleton hyperstability due to a novel alternatively spliced 4.1R can account for ellipsoidal camelid red cells with decreased deformability.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102877	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Benjaporn Kiatpakdee, Kota Sato, Yayoi Otsuka, Nobuto Arashiki, Yuqi Chen, Takuya Tsumita, Wataru Otsu, Akito Yamamoto, Reo Kawata, Yoshikazu Sugimoto, Kensuke Takada ¹ , Narla Mohandas, Mutsumi Inaba
2. 発表標題 TSP02 coordinates maturation and proliferation of terminally differentiating erythroblasts
3. 学会等名 2020 “Virtual” Red Cell Club Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Inaba, M. and Messick, J. B.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Wiley-Blackwell	5. 総ページ数 10
3. 書名 Chapter 30: Erythrocyte membrane defects. In Schalm's Veterinary Hematology, 7th ed. (Brooks, M. B., Harr, K. E., Seelig, D. M., Wardrop, K. J., and Weiss, D. J. eds.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院獣医学研究院動物分子医学教室 http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/lmm/index.html

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	高田 健介 (Takada Kensuke) (40570073)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

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			
米国	New York Blood Center			