

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17379

研究課題名（和文）血球分化障害をきたす機能未知の遺伝子の解析

研究課題名（英文）Analysis of a Novel Gene Essential for Hematopoiesis

研究代表者

中井 りつこ（Nakai, Ritsuko）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90836420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウスホモ変異ES細胞ライブラリを用いて、造血発生に重要な新規遺伝子を同定した。この遺伝子の血液細胞特異的欠損マウスを作製し解析したところ、胎生後期に貧血を呈し致死であった。胎生14.5日肝で赤芽球の減少を認め、造血幹/前駆細胞分画のコロニー形成能も著明に低下していた。この遺伝子の野生型マウスと血液細胞特異的欠損マウスの造血幹細胞分画を用いたRNA-Seqから、この遺伝子は、RNAスプライシングの異常を介して、造血幹細胞における血球分化に関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血器腫瘍の治療成績は直近20年でも大きな改善は見られず、特に高齢者における長期生存割合は未だ低い割合にとどまっている。この現実を踏まえ、正常造血の制御機構の解明を通して、造血器腫瘍に関わる未知の分子を同定し、その制御を介した新たな治療戦略の開発が必須であると考え、本研究に取り組んだ。本研究で同定した新規遺伝子の機能解析・分子機構については、ヒトのオルソログである分子を含めても、これまで世界的に全く解析されておらず、研究代表者らが主導的に研究を進める必要がある。今回の研究成果を踏まえ、今後、この新規遺伝子の制御を介した新たな造血器腫瘍制御の治療開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：We identified a novel gene essential for hematopoietic development by screening with our in-house bank of homozygous mutant embryonic stem cells. We generated the conditional knockout (cKO) mice to understand the specific roles of this gene in the hematopoietic system. They became anemic after E14.5, and died before birth. We then analyzed the E14.5 liver of the cKO fetuses. Flow cytometric analysis revealed that the number of erythroblasts was significantly decreased in the cKO livers. The methylcellulose assay revealed that this gene-deficient LSK cells produced fewer and smaller colonies compared with control cells. We found that this gene is involved in hematopoietic differentiation in HSCs via aberrant RNA splicing.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：新規遺伝子 造血 血球分化障害 核内遺伝子 変異胚性幹細胞株 RNAスプライシング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における造血システムは、造血幹細胞の維持と必要な成熟血球の供給という2つの目的を同時に果たすために、転写因子を初め、サイトカイン受容体、細胞周期制御因子、エピジェネティクスに関わる分子といった多彩な因子が精緻に関わっていることが分かっている。これらの因子が時相空間的に協調して働くためには、未だ知られていない重要な分子が存在すると考える。また、造血における複雑な制御機構の解明は、正常造血制御の破綻による白血病などの造血器腫瘍発症機構の解明につながる可能性を有する。現在の造血器腫瘍に対する治療成績は決して満足できるものではないことから、機能未知の分子の解明、および、その分子機構を基盤とした新たな腫瘍制御の開発は急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胚発生・血球分化に重要な新規遺伝子の分子機構を明らかにし、新たな視点からの白血病・造血器腫瘍に対する治療開発を展開することである。

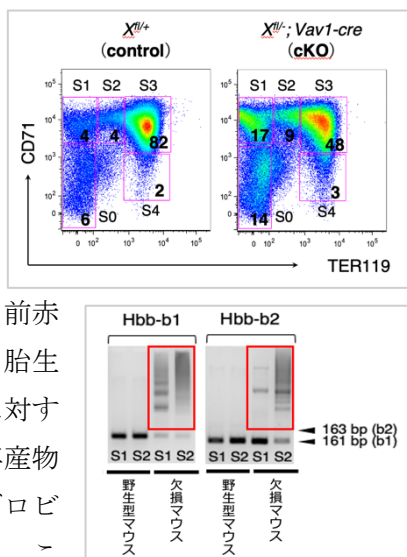
これまでの研究で、新規遺伝子が胚の発生および造血に重要な機能を担っていることは示されたが、その機能に関与する分子機構についての検討が不十分であった。胎生期造血における新規遺伝子の機能的意義を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 新規遺伝子の血液細胞特異的欠損マウスを用いて、この遺伝子の胎生期造血における役割を明らかにする。
- 2) 新規遺伝子の分子機構を明らかにするため、Public database を用いて物理的にアソシエイトする種々の蛋白を網羅的に調べる。
- 3) 新規遺伝子の野生型マウスと血液細胞特異的欠損マウスの造血幹細胞分画を用いた RNA-Seq を行う。

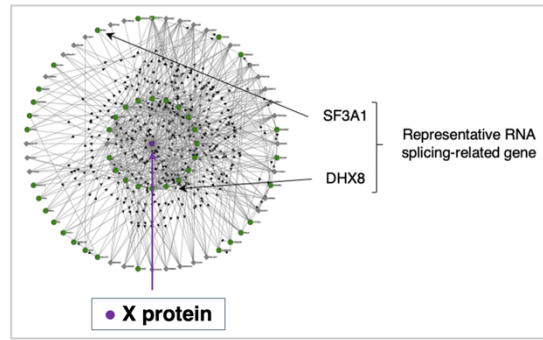
4. 研究成果

1) 血液細胞特異的欠損マウス胚は胎生 14.5 日以降に胎児肝の萎縮を認め、胎生 16.5 日には著明な貧血を呈し、胚全体の萎縮と皮下浮腫を認めた。胎生 14.5 日胎仔肝の造血幹/前駆細胞分画を用いたメチルセルロースアッセイでは、血液細胞特異的欠損マウス群で有意にコロニー形成能が低下していた。胎生 14.5 日胎仔肝における赤血球前駆細胞のフローサイトメトリー解析を行うと、血液細胞特異的欠損マウス群で幼弱な赤芽球の細胞集団(S0~S2)が増加(図上)しており、前赤芽球レベルで赤血球分化の停滞を認めることを見出した。胎生 14.5 日の胎仔肝造血細胞に、代表的なグロビン遺伝子に対する特定のプライマーを用いた RT-PCR を行い、遺伝子転写産物の評価を行ったところ、血液細胞特異的欠損マウス群でグロビン mRNA が異常に長い形で残っていることを見出し(図下)、こ

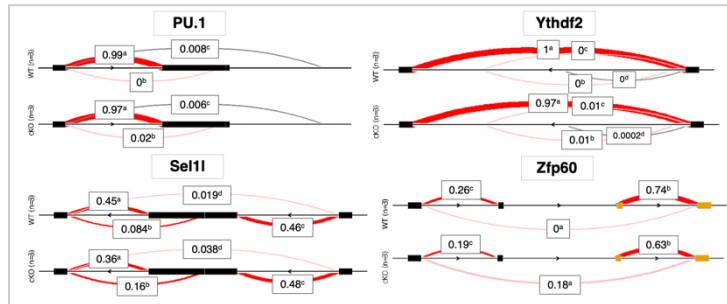


の遺伝子の欠失がグロビン pre-mRNA からのスプライシング異常を引き起こしている可能性が示唆された。

2) Public database (BioPlex 3.0) を用いて物理的にアソシエイトする種々の蛋白を網羅的に調べてみたところ、新規遺伝子は SF3A1 といった RNA スプライシングに関与するタンパクと強い相関を持つことがわかった。



3) この遺伝子の欠損が造血幹細胞/前駆細胞の遺伝子発現に与える影響を観察するため、胎生 14.5 日胎仔肝のマウス造血幹細胞分画を分取し、RNA-Seq を行い、遺伝子発現の変化と血液細胞特異的欠損マウス群での intron 由来の異常蛋白の有無 (RNA スプライシング異常の有無) について検索を行ったところ、血液細胞特異的欠損マウス群では、PU.1 といったような、造血幹細胞において成熟血球系への分化に重要な転写因子群のスプライシングパターンが変わっていることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井 りつこ、横田 貴史、数藤 孝雄、徳永 正浩、竹田潤二、保仙 直毅
2. 発表標題 変異胚性幹細胞株のスクリーニングにより同定した血球分化に重要な新規遺伝子の解析
3. 学会等名 第26回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Nakai, Tokunaga Masahiro, Takao Sudo, Naoki Hosen, Takafumi Yokota and Junji Takeda
2. 発表標題 Screening with Homozygous Mutant Embryonic Stem Cells to Identify a Novel Gene Essential for Hematopoiesis
3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------