

平成23年3月31日現在

機関番号：82609
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790928
 研究課題名（和文） 造血幹細胞特異的 S76 遺伝子の機能解析と相互作用分子の同定・造血支持能の解析
 研究課題名（英文） The identification of interacting protein with HSC specific S76 protein and analyses of hematopoietic supporting ability of S76

研究代表者
 峯畑 健一（MINEHATA KENICHI）
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
 研究者番号：50362538

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞特異的遺伝子 S76 と相互作用するたんぱく質として Calnexin および GRP78 を同定した。また、血液細胞・血管内皮細胞特異的 S76 遺伝子欠損マウスの作成を行った。

研究成果の概要（英文）：

We identified Calnexin and GRP78 as the interacting proteins with HSC specific S76 protein and established S76 loxP knockout mice to establish tie2-Cre/ S76 loxP mice for the analyses of hematopoietic activities in BM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：骨髄幹細胞・ストローマ細胞・造血幹細胞ニッチェ

1. 研究開始当初の背景

HSCs が造血幹細胞ニッチェとどのように相互作用し、その性質を維持しているかを解明することは、血液学の大きな課題である。それ故、HSCs に関する研究の歴史は長く、その同定法や分化に関する知識が多く蓄積されてきた。近年、造血幹細胞ニッチェには、

osteoblastic ニッチェと vascular ニッチェの二種類が骨髄内に存在し、HSCs の維持・分化に関与していることが報告された。ニッチェに存在する骨髄ストローマ細胞には、ケモカインである SDF-1 や接着因子である N-cadherin などの相互作用分子が発現しており、造血幹細胞の維持に関与していること

が報告されている。しかしながら、造血幹細胞側の遺伝子で骨髄ストローマ細胞に相互作用する分子に関しての検索はあまり行われていないのが実情である。

Stem cell)が含まれており、その増殖・分化が腫瘍の悪性度に関与していること、骨髄異形成症候群(MDS)の発症にストローマ細胞が関与していることが明らかとされた。ストローマ細胞と造血幹細胞の相互作用は白血病発症維持にも重要な役割を果たしていることから、益々、その相互作用を明らかにすることが大切であると考えられる。

HSCsは造血幹細胞ニッチェに局在し、ゆっくりとした細胞周期で生存し、その多分化能を維持している。一方、無限に増殖し、その stemness を維持することができる胚性幹細胞(ES細胞)は、血液細胞の元となる血液・血管共通前駆細胞(hemangioblast)を経由して血液細胞を産生することができる。ところが、血液細胞を産生するES細胞由来のhemangioblastは、HSCsとは違い骨髄再構築能がない。これは、ES細胞由来hemangioblastからできた血液細胞は、HSCsの持つ自己複製能、多分化能、あるいは放射線照射したマウスへの正着能のいずれかを持っていないことを示唆している。

我々はこの点に注目し、骨髄再構築能の有無の原因となる遺伝子を同定するために、骨髄再構築能を持つ成体の骨髄のHSCs(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻ cells)と骨髄再構築能を持たないES細胞由来のhemangioblast(Flk1⁺SCL⁺ cells)の遺伝子発現の違いを検討した。そして、HSCsに発現しており、ES細胞由来のhemangioblastに発現していない遺伝子の一つとして、膜蛋白質であるS76遺伝子を同定することに成功した。

2. 研究の目的

骨髄造血幹細胞の移植は現在広く臨床応

用されており、白血病疾患の治療において非常に大きな役割を果たしている。しかしながら、造血幹細胞がどのような機構で骨髄ストローマ細胞に生着し、幹細胞としての性質を維持するかは、長年の研究成果が蓄積されているものの、その全容は明らかとされていない。

本研究では、造血幹細胞特異的に発現している遺伝子であるS76遺伝子が造血幹細胞の骨髄生着に関与するか、またどのように関与しているかを明らかとすることで、造血幹細胞と骨髄ストローマ細胞との相互作用を明らかとすることが目的である。

3. 研究の方法

(a) S76遺伝子の発現抑制実験から、HSCs上のS76遺伝子産物はストローマ細胞上に発現する膜分子と相互作用する可能性が予想される。このため、HSCsの高い支持能を持つOP9細胞株を用いて、以下の実験を行うこととする。

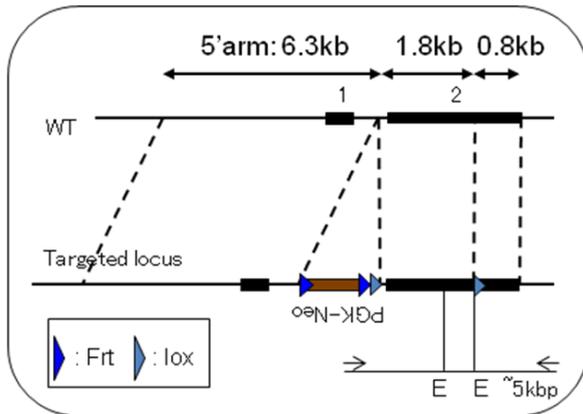
S76遺伝子をFlagタグしたDNAをCOS7細胞に強制発現する。次にHSCsを維持できるストローマ細胞であるOP9細胞を準備し、それぞれの細胞溶解液を混合したものを抗Flag抗体によって免疫沈降する。現時点において、我々はS76の発現特異的に確認される分子を銀染色により確認している。平成21年度は、飛行時間型質量分析装置(TOF-MS法)によって、現在得られている分子のアミノ酸配列を決定した。

(b) S76(-/-)マウスは胎生7.5~8.0日以前で致死のため、造血発生やHSCs維持についての解析を行うことができない。この問題を解決するため、コンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。

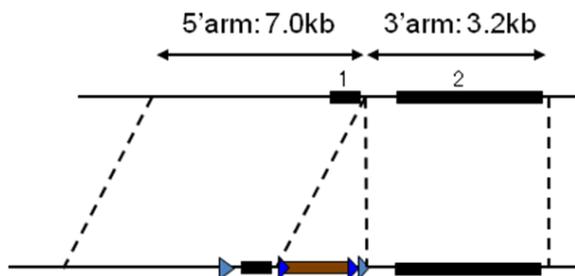
本研究では二種類のターゲティングベクタ

一 (Type I and II) を作成し、そのうちのひとつについて、ES 細胞の作成までを行っている。

Type I



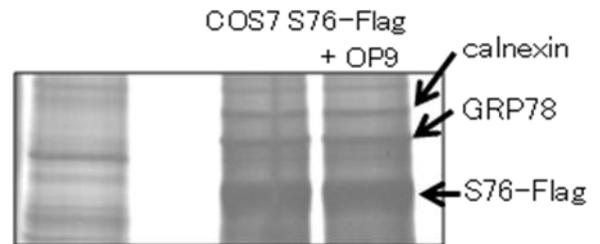
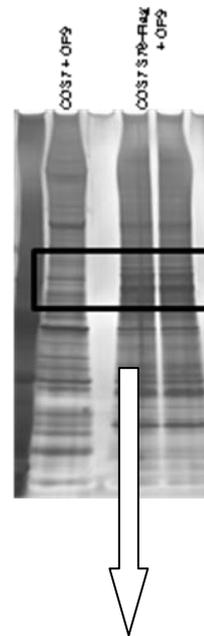
Type II



4. 研究成果

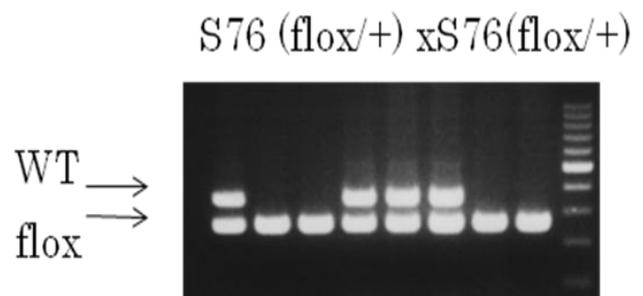
(a) 申請者は S76 タンパク質と相互作用する分子を同定するために、COS7 細胞で Flag タグした S76 タンパク質を作製した。

次に、造血支持能力が高いことで知られている OP9 ストローマ細胞のライセートと混合することで S76 タンパク質に相互作用させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、S76 タンパク質と特異的に相互作用する分子を二つ同定した。質量分析装置を用いて解析を行ったところ、Calnexin および、GRP78 タンパク質であることがわかった。



現在これらのタンパク質と実際に相互作用するかを *in vitro*, *in vivo* において検討しているところである。

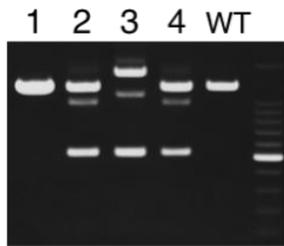
(b) *in vivo*におけるS76遺伝子の機能を解析するために、S76コンディショナルノックアウトマウスの作成を行っている。2種類のターゲティングベクターを作製し、ES細胞での組み換えに成功した。このうち一つのES細胞で、キメラマウスの作成を行い、Germ line transmissionに成功している。現在は、Flpトランスジェニックマウスとの掛け合わせにより、薬剤耐性遺伝子を抜いたマ



ウスを得ることができた。

また、現在Tie2-Creトランスジェニックマウスとの掛け合わせを行い、Tie2Cre+S76(flox/+)マウスの作成に成功した。

S76^(flox/+) x S76^(flox/+)Tie2Cre⁺



今後は、Tie2Cre+S76(flox/flox)マウスの骨髄での解析を行うとともに、Mx1-Creトランスジェニックマウスと掛け合わせすることで、成体での造血細胞のみで遺伝子欠損を行い、造血能への影響を検討する予定としている。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯畑 健一 (MINEHATA KENICGI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床
医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：50362538

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし