

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390196

研究課題名（和文） Notch遺伝子の転写後調節による造血幹細胞の自己複製およびT細胞分化機構の解明

研究課題名（英文） The role of post-transcriptional control of Notch1 gene in self-renewal and T-cell differentiation of hematopoietic stem cells

研究代表者

水野 晋一（MIZUNO SHINICHI）

九州大学・先端医療イノベーションセンター・准教授

研究者番号：40569430

研究成果の概要（和文）：

本研究では、造血幹細胞の自己複製とT細胞分化とを決定づけるメカニズムを明らかにするため、Notch1遺伝子の転写後調節（Post-transcriptional control）機構の解析を行った。われわれは造血幹細胞において、T細胞分化に必須であるNotch1遺伝子が強い転写後抑制を受けることを見出し、その責任領域はNotch1-3' UTRに存在するATTTAモチーフであることを明らかにした。さらにこの転写抑制にはたらくRNA結合タンパク（RBP）の同定に成功した。一方、造血幹細胞を胸腺組織へ直接注入するとこの転写後抑制が速やかに解除されることを見出し、胸腺環境において転写後抑制を解除するシグナル探索を行っている。また、Notch1-3' UTRの遺伝子改変マウスの作成および転写後調節の制御ベクターを開発し、造血幹細胞におけるNotch1遺伝子転写後調節の生物学的意義を解析することを可能とした。同時に、造血幹細胞システムでの遺伝子転写後調節の役割を解明するため、さらに複数の新規転写後抑制遺伝子を同定している。これらの成果は、造血系における転写後調節の持つ役割・意義の解明に役立つとともに、本研究テーマにとどまらず造血系における骨髄ニッチ（niche）や、がん幹細胞（Cancer stem cell）と転移の問題などに共通したメカニズムの解明へつながっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

The control of gene expression is a fundamental process of organism and is regulated at various levels. The regulation of gene expression can be divided into two categories of transcriptional control and post-transcriptional control, and there have been increasing evidences of the importance of post-transcriptional gene regulation recently. In this study, we found that the expression of Notch1 is post-transcriptionally regulated in hematopoietic stem cells, and the ATTTA motif of Notch1-3' UTR is responsible for translational suppression. Interestingly, the suppression of Notch1 translation is rapidly released in thymus. We are now investigating the environmental factors in thymus that can affect the regulation of Notch1 gene. Furthermore, we developed a novel method that can detect the genes whose expression is regulated post-transcriptionally in target cells, and found out several candidate genes, other than Notch1, in hematopoietic stem cells. This study will enable us to understand the role of Notch1 gene in self-renewal and T-cell differentiation of hematopoietic stem cells, based on modulating the translation or stability of mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			

年度			
総計	8,600,000	2,580,000	11,180,000

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

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子は、ゲノムから mRNA に転写され、その mRNA がタンパクに翻訳されることで機能を発揮する。近年、mRNA からタンパク翻訳への段階において遺伝子発現が制御される「転写後調節 (post-transcriptional control)」の重要な役割が次々と明らかにされている。すでに転写因子レポーター・マウスの研究から、造血幹細胞における転写因子の遺伝子転写は必ずしも分化方向を規定しておらず、また複数の転写因子が単一造血幹細胞に同時に発現していることから、造血幹細胞の分化決定には遺伝子転写に加え転写後調節が重要な役割を果たしている可能性が推測されていた。

しかし、転写後調節の機構には RNA 結合タンパク、microRNA、mRNA 立体構造など多彩なメカニズムがあり、個々の遺伝子における機能的解析には制限があり、網羅的な解析は困難であった。

そこで、新たに後述のレトロウイルス・センサーベクター系を確立し、造血幹細胞において発現している遺伝子群において転写後調節を受ける遺伝子をスクリーニングすることで、その機能解析を行うことを可能とし、造血幹細胞における転写後調節の持つ役割・意義の解明を行った。

### 2. 研究の目的

新規レトロウイルス・センサーベクター系の導入により、造血幹細胞で Notch1 遺伝子が強い転写後抑制を受けていることを見出し、造血幹細胞の自己複製および T 細胞分化において重要な役割を果たしていると予想した。本研究は、造血幹細胞の分化制御における Notch1 遺伝子の転写後調節の役割を分子機構レベルで解明し、さらに転写後調節を受ける遺伝子を網羅的に同定し各遺伝子を機能解析することから、造血系における転写後調節の持つ役割・意義を幅広く明らかにしてゆくことが目的である。

一方、造血幹細胞での Notch1 遺伝子の転写後抑制が、胸腺組織で速やかに解除されることを見出しており、このメカニズムを研究することから、胸腺への造血幹細胞の直接ホーミングによる T 細胞分化という新しい分化経路 (commitment) の解明につながることを期待される。この現象は、環境からのシグナルによる細胞の転写後調節の変化が、短時

間でのタンパク発現変化につながり、結果として細胞運命を決定することと一般化することができ、このメカニズムの研究は、本研究テーマにとどまらず、造血系における骨髄ニッチ (niche) や、がん幹細胞 (Cancer stem cell) と転移の問題などに共通したメカニズムを見出せる可能性が期待される。

そこで、(1) マウス造血幹細胞における Notch1 遺伝子転写後調節およびそれに基づく T 細胞分化の分子機構の解明を行い、次に (2) ヒト白血病症例における Notch1 遺伝子転写後調節の役割の解明を行う。さらに造血幹細胞での転写後調節の意義を一般化するため (3) 新規の転写後調節遺伝子の同定を行い、造血幹細胞における遺伝子転写後調節の果たす役割の幅広い解明を行う。

実験にはレトロウイルス・センサーベクター系および新たに誘導性に 3' UTR 置換を可能とする遺伝子改変マウスを作成し、Notch1 遺伝子転写後調節の生物学的意義の詳細な解析を行う。

### 3. 研究の方法

転写後調節を機能的に解析する方法として、レトロウイルス・センサーベクター系を導入する。これは、目的とする転写因子およびレセプター遺伝子の転写後調節領域 3' UTR をレトロウイルスベクターの GFP 遺伝子下流に挿入することで、機能的解析を可能とする方法である。もし当該領域に転写後調節機能があれば、GFP 蛍光強度を指標としてその機能を評価することができる。さらに、遺伝子導入効率などの要因を除き転写後調節の効果を明確に解析するため、両方向性プロモーター (bi-directional promoter) を導入したベクターを導入する。

また、転写後調節を人為的に制御可能とする Seal 法ベクターを開発するとともに、in vivo での解析を可能とする誘導性 3' UTR 置換遺伝子改変マウスを作成し、Notch1 遺伝子転写後調節の詳細な解析を行い、生物学的意義を明らかにする。

胸腺環境のシグナル探索には、(i) 胸腺上皮細胞培養、(ii) マウス胎仔胸腺器官培養の 2 通りの方法を導入し、造血幹細胞との共培養条件下で主に中和抗体によるスクリーニングにより責任分子の探索を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス造血幹細胞における Notch1 遺伝子転写後調節機構の解明

造血幹細胞における遺伝子の転写後調節を探索するため、レトロウイルス・センサーベクター系を構築した。造血幹細胞で発現している転写因子遺伝子あるいはレセプター遺伝子の3'UTR領域を順次検討したところ、Notch1 遺伝子3' UTR 挿入により GFP 発現が抑制された。分化方向の決定した造血前駆細胞や胸腺細胞への導入では GFP は抑制されず、Notch1-3' UTR は造血幹細胞でのみ特異的に転写後抑制作用を示すことを見出した。さらに、造血幹細胞・各種前駆細胞および胸腺細胞を定量的PCRおよびWestern blot でNotch1 発現を解析したところ、造血幹細胞においてNotch1 遺伝子の mRNA の転写発現は確認されるが、Notch1 タンパクはほとんど検出されず、Notch1 遺伝子が造血幹細胞で転写後抑制を受けていることを明らかにした。一方、3' UTR 領域の断片解析を行うことで責任配列を120bp まで絞り、その配列に連続的に塩基変異を導入することで最終的に3' UTR に存在する ATTTA モチーフが転写後調節の責任領域であることを解明した。この ATTTA モチーフは典型的な RNA 結合蛋白モチーフであり、造血幹細胞では RNA 結合蛋白により Notch1 遺伝子が抑制されていることを示し、さらに RNA 免疫沈降法によりその RNA 結合蛋白を同定することに成功した。

#### (2) 胸腺環境での Notch1 遺伝子の転写後抑制解除機構の解明

センサー・レトロウイルスを導入した造血幹細胞の検討では、T 細胞分化を誘導する OP9-Delta 上で培養を行っても7日間以上経過しなければ転写後抑制は解除されない。しかし、胸腺組織にこの造血幹細胞を直接注入すると6時間後より GFP が発現する。骨髄への直接注入ではこの現象は認められず、胸腺環境からの何らかのシグナルを受けることで Notch1 の転写後抑制が速やかに解除されることを見出した。胸腺環境の何らかのシグナルが、造血幹細胞の Notch1 遺伝子転写後抑制を速やかに解除し、このことが T 細胞への分化プログラム開始につながると考えられる。本結果は、造血幹細胞が前駆細胞を経ず、直接に T 細胞分化へ経路決定する可能性を強く示唆している。

一方、胸腺で転写後抑制解除を行う分子機構を明らかにすることで、未知の点の多い T 細胞分化経路および決定機構について新しい発見が得られることが期待される。そこで、胸腺環境における Notch1 の転写後抑制解除のメカニズムを解明するため、主に中和抗体を用いた試験管内での責任分子のスクリーニングを行っているが、現時点では胸腺環境の責任分子の同定には至っていない。転写後

抑制解除の責任分子探索をさらに継続し、どのようなシグナルが Notch1 遺伝子の転写後抑制解除に作用するかを探索していく。

#### (3) 白血病症例における Notch1 転写後調節領域の遺伝子変異探索

Notch1 遺伝子の ATTTA モチーフを含む領域はヒトとマウスで高度に保存されている。一方、ヒト T 細胞性急性白血病 (T-ALL) では高率に Notch1 遺伝子コード領域に変異が存在しており、もし Notch1-3' UTR の ATTTA 配列に変異・欠失が存在すれば、Notch1 遺伝子活性化そして白血病に関与する可能性があり、「RNA 結合タンパクによる転写後調節と腫瘍」という新たな知見が得られるであろう。そこで、ヒト疾患との関連として T 細胞性白血病 (T-ALL) における Notch1-3' UTR 領域の遺伝子解析を施行している。しかし、現時点では未だ変異・欠失等の遺伝子異常は Notch1-3' UTR 領域に見出していない。さらに探索疾患範囲を広げ、T リンパ系疾患において Notch1 転写後調節領域の解析を継続していく。

#### (4) Notch1 転写後抑制制御を可能とする新規ベクターおよび遺伝子改変マウス

Notch1 遺伝子の転写後抑制の生物学的意義を明らかにするには、転写後調節を人為的に制御するツールが必要である。そこで、まず新規ベクターとして、anti-sense RNA により RBP の結合モチーフを「Seal (封印)」し、mRNA への RBP 結合を阻害し転写後調節を制御可能とするベクターを開発した。この Seal ベクターをレトロウイルスにより導入することで、持続的な転写抑制解除を行うことを可能とした。造血幹細胞に本ベクターを導入し Notch1-3' UTR を seal することで T 細胞への分化が増強されることを明らかにすることができ、さらに新規に同定された転写後調節遺伝子 (後述 (5)) の機能解析も本ベクターの応用で可能であった。

造血幹細胞の自己複製と T 細胞分化とを決定づけるメカニズムの解明のためには、Notch1-3' UTR による転写後調節が分化に果たす役割を正確に「in vivo で評価」する必要がある。遺伝子改変マウスの作成および解析が必須である。そのため、Cre 遺伝子により誘導性に 3' UTR 置換を行う遺伝子改変マウスを作成し、in vivo での解析を開始している。Tamoxifen 誘導性 Cre 発現マウスとクロスし 3' UTR 責任部位を欠失させたところ、末梢血 T 細胞が増加することを観察しており、引き続き本マウスの骨髄および胸腺の詳細な解析を行うことにより、Notch1 遺伝子転写後抑制のもつ役割を解明できると期待している。

(5) 新規の転写後調節遺伝子同定による造血幹細胞における転写後調節の役割解明

造血幹細胞においてNotch1 遺伝子が3'UTR に存在する ATTA モチーフを介して転写後抑制を受けることから、ATTA モチーフを持つ遺伝子は同様の転写後調節を受けることが予想される。また、転写後調節にはmicroRNA や mRNA 構造など多様な機構により調節されており、Notch1 遺伝子にとどまらず多数の遺伝子が造血幹細胞で転写後調節を受けている可能性がある。

そこで、レトロウイルス・センサーベクターを用いて造血幹細胞において転写後調節を受ける遺伝子を網羅的に機能探索した。具体的には、両方向性プロモーターを持つレトロウイルス・センサーベクターの GFP 下流に、造血幹細胞からの断片化した cDNA ライブラリーを挿入し、YFP 発現を遺伝子導入マーカーとして同時に GFP 発現が抑制されている細胞集団をソーティングし、転写後調節にはたらく機能配列を濃縮し同定した。

この方法により、多数の候補遺伝子断片を同定することに成功しており、さらに転写後調節を確認し得たものとして、HPRT 遺伝子、GATA3 遺伝子、c-fos 遺伝子を見出している。HPRT 遺伝子は、プリン代謝酵素であり小児急性白血病の薬剤であるメルカプトプリンの抗がん活性に関係し、白血病治療において重要な意義を持っている。HPRT の転写後調節の治療的意義についてさらに解析を進めている。また、GATA3 遺伝子は T 細胞分化に重要な遺伝子であり、造血幹細胞での転写後抑制は分化制御にはたらいていると考えられる。現在、同定された多数の候補遺伝子においても機能解析を進めており、新しい概念として「被転写後調節遺伝子トランスクリプトーム」という制御分野を確立し、新たな側面から造血幹細胞の制御機構を解明していく。

## 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 3 件)

Morishige S, Oku E, Mizuno S, Okamura T. (15名、2番目、11番目). A case of 8p11 myeloproliferative syndrome with BCR-FGFR1 gene fusion presenting with trilineage acute leukemia/lymphoma, successfully treated by cord blood transplantation. Acta Haematol. 査読有. 129. 2013. 83-89  
doi: 10.1159/000341289

Nakamura T, Oku E, Mizuno S, Okamura T. (16名、2番目、12番目). Unrelated cord blood transplantation for patients

with adult T-cell leukemia/lymphoma: experience at a single institute. Int J Hematol. 査読有. 96. 2012. 657-663  
doi: 10.1007/s12185-012-1177-8

Imamura R, Mouri F, Oku E, Okamura T. (14名、5番目) Successful treatment of small cell variant anaplastic large cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, and review of the literature. Int J Hematol 査読有. 97. 2013. 139-143  
doi: 10.1007/s12185-012-1242-3

[学会発表] (計 2 件)

水野晋一、癌融合遺伝子の新規探索法-新しい遺伝子検査法-、BioJapan 2012、2011年10月10日、パシフィコ横浜

水野晋一、新しい遺伝子検査法-がん融合遺伝子の新規探索法-、BioJapan 2011、2011年10月7日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産]

○出願状況 (計 4 件)

名称: METHOD FOR EXCUSIVE SELECTION OF CIRCULARIZED DNA FROM MONOMOLECULAR DAN WHEN CIRCULARIZING DNA MOLECULES  
発明者: MIZUNO Shinichi, OZAWA Hidetoshi, NAGAFUJI Koji, OKAMURA Takashi  
権利者: KURUME UNIVERSITY  
種類: PATENT  
番号: PCT/JP2012/071492  
出願年月日: 2012/08/24  
国内外の別: 国外

名称: METHOD FOR PRODUCING CIRCULAR DNA FORMED FROM SINGLE-MOLECULE DNA  
発明者: MIZUNO Shinichi, NAGAFUJI Koji, OKAMURA Takashi  
権利者: KURUME UNIVERSITY  
種類: PATENT  
番号: PCT/JP2011/068856  
出願年月日: 2011/08/22  
国内外の別: 国外

名称: DNA 分子の環状化において単分子による環状化 DNA のみを選別する方法  
発明者: 水野晋一、小澤秀俊、長藤宏司、岡村孝  
権利者: 久留米大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-189280  
出願年月日: 2011/08/31  
国内外の別: 国内

名称：単分子 DNA から形成される環状 DNA の  
作成方法

発明者：水野晋一、小澤秀俊、岡村孝

権利者：久留米大学

種類：特許

番号：特願 2010-196719

出願年月日：2010/09/02

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 晋一 (MIZUNO SHINICHI)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・准教授

研究者番号：40569430

### (3) 連携研究者

奥 英二郎 (OKU EIJIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10569429