

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14861

研究課題名(和文) TSP02による時期特異的小胞体コレステロール蓄積と赤芽球の成熟制御

研究課題名(英文) Regulation of erythroblast maturation by TSP02 through cholesterol accumulation in the endoplasmic reticulum

研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成熟異常を呈する犬のHK赤血球表現型は、コレステロール代謝への関与が想定されるTSP02遺伝子の変異により生じる。本研究では、細胞形態、細胞表面抗原、ヘモグロビン合成、細胞周期、遺伝子発現等に焦点を置き、後期赤芽球の成熟・脱核とTSP02の関係を犬骨髄由来赤芽球、赤芽球系培養細胞を用いて解析した。その結果、TSP02が、後期赤芽球におけるコレステロール代謝の変動を介して細胞増殖、細胞周期、ヘモグロビン合成や脱核の時期を調節し得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We previously found that the HK dog red cell phenotype is caused by some mutations in the TSP02 (translocator protein 2) gene. We here analyzed the role of TSP02 in the terminal maturation of erythroid cells. We showed that deletion of TSP02 or its cholesterol-binding motif in erythroid lineage cells (late erythroblasts) resulted in retardation or decreases in cell growth, cell cycle, exclusion of large non-condensed nuclei upon enucleation, and hemoglobin synthesis, resembling HK dog red cell phenotype. These findings suggest that TSP02 regulates terminal maturation of late erythroblasts through its function in cholesterol metabolism.

研究分野：分子医学

キーワード：赤血球 赤芽球 成熟 脱核 コレステロール TSP02

1. 研究開始当初の背景

犬 HK 型赤血球は未成熟な赤血球の性質を呈する表現型であり、常染色体性劣性に遺伝する。代表者らは、2012 年にその原因遺伝子として *TSP02* 遺伝子を同定した。*TSP02* は、コレステロール輸送体とされる *TSP0* のアナログとして 2009 年に見出されたものである。*TSP0* (translocator protein) は、コレステロールやベンゾジアゼピン、ヘム等を結合する 18 kDa の膜内在性蛋白質であり、様々な組織のミトコンドリア内膜に分布しており、コレステロールの輸送や代謝、ステロイドホルモン合成、ミトコンドリア代謝、アポトーシス、細胞分裂などへの関与、あるいは癌や内分泌 / 神経疾患への関与が指摘されてきた。*TSP02* は、コピキタスな *TSP0* とは異なり後期赤芽球に特異的な発現を示すが、*TSP0* と同様にコレステロール結合モチーフを有することから、やはりコレステロール代謝における機能が想定されている。しかし、その状態は全く不明である。

赤芽球から赤血球への成熟では、膜骨格形成等の細胞膜構造の変化、細胞内小器官の崩壊、核の濃縮・脱核という一連の劇的な変化が生じる。過去 10 年間、特に赤血球膜構成の変化や脱核には、コレステロールの供給 / 膜小胞の輸送が不可欠である証拠が示されてきたが、実際にこれに関わる仕組みは全く不明であった。*TSP02* 遺伝子の変異を原因とする HK 型赤血球が未成熟な表現型を留めたままであることは、*TSP02* の機能 (主にはコレステロールの細胞内輸送 / 代謝) が赤芽球系細胞の成熟、あるいは脱核過程に明確な影響、役割をもつことを示唆している。この仮説は赤芽球系細胞の成熟や脱核にコレステロール代謝が関わるという従来の知見に合致している。

本研究遂行によって、犬など食肉目動物の HK/LK 型赤血球表現型の分子機構はもちろん、赤芽球系細胞成熟、特に後期赤芽球以降の成熟赤血球の生成や脱核を生じる仕組みの解明が期待でき、コレステロール代謝の生理 / 疾患に新しい視点が拡がることを期待できる。

2. 研究の目的

TSP02 が、小胞体(ER)蓄積など、後期赤芽球におけるコレステロールの細胞内輸送 / 代謝の変化を生じ、これを通して赤芽球系細胞の成熟・脱核を調節するという仮説を実証し、HK/LK 赤血球表現型の発現機序、広くは赤芽球系細胞成熟の分子機構を明らかにするとともに、コレステロール代謝の新たな生体機能と仕組みを提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 赤芽球系細胞成熟・脱核との関連の解析: HK 型と LK 型、各犬の骨髓由来赤芽球、ならびにその培養細胞の成熟、脱核時期を細

胞形態、細胞表面抗原、ヘモグロビン(Hb)合成、細胞周期、ならびに赤芽球系細胞特異的な遺伝子発現との関連で解析した。また、*TSP02* の赤芽球系細胞の成熟と脱核に対する影響を明らかにするために、ヒト K562 細胞に *TSP02* 遺伝子を導入、ならびにマウス ES 細胞由来赤芽球系細胞 MEDEP BRC5 細胞では CRIPRER/Cas9 法によって *Tspo2* 遺伝子を改変して、*TSP02* WT、あるいは変異体を発現した細胞(MEDEP)を作製し、同様の解析を行った。(2) コレステロール代謝との関連の解析: 上記の各細胞におけるコレステロールの細胞内分布・動態、あるいは含量を、ナイルレッド、Filipin、NBD-コレステロール等を用いて解析・測定した。

4. 研究成果

(1) HK 型 / LK 型赤芽球の成熟と核サイズ: HK 型赤血球は、種々の点で網状赤血球のように未成熟な性質を備えたまま形態上は成熟赤血球となっている。従来の知見から、HK/LK 型の違いは前期、あるいは後期赤芽球系細胞の成熟段階で生じることが想定される。そこで、骨髓細胞に 2 段階液体培養法を適用し、赤芽球系細胞を培養して、その成熟過程の形態変化を検討した。培養後 3 日～8 日で骨髓由来赤芽球細胞は成熟し、脱核が認められた。脱核時の核形態には HK と LK とで著しい相違が見られた (Fig. 1)。即ち、HK 型の核は LK 型に比べて濃縮が不十分であり、そのサイズ (塗抹標本上での面積) は、HK 型が LK 型の約 2 倍であった。また、骨髓塗抹標本で、HK 型の 2 核の赤芽球数は 27/1,000 細胞で LK 型の約 5 倍と著しく多数であった (Fig. 1)。

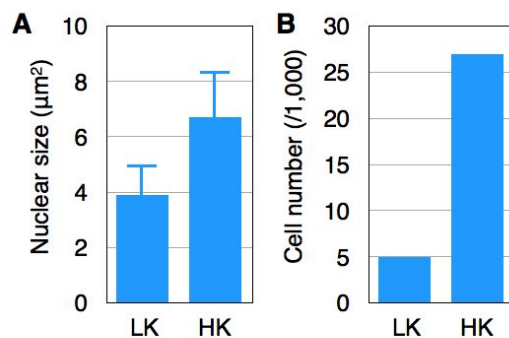


Fig. 1 Nuclear size upon enucleation in erythroid cell culture (A) and the number of binucleated cells in the bone marrow (B)

(2) MEDEP 細胞の成熟と核サイズ、ヘム含量、Hb 合成: MEDEP 細胞は、SCF 除去 / EPO 添加により、Control、*TSP02* Knockout (KO)、*TSP02* のコレステロール結合モチーフを除去した CRAC (CRAC) のいずれも、ほぼ脱核までの成熟過程を呈した。脱核が観察された KO 細胞と CRAC 細胞の核では、HK 型赤芽球と同様に、核の濃縮が遅れ、そのサイズは Control 細胞の脱核後の核の約 1.5～2 倍であった。

フローサイトメトリーで後期赤芽球マーカーである TER119 と CD71 の発現量を特定したところ、Control、KO ともに初めは TER119^{low}/CD71^{high} の状態であったが、培養 24 時間～48 時間には Control、KO ともに上記の後期赤芽球への形態変化に合致して TER119^{high}/CD71^{high} となった。しかし KO 細胞の TER119 発現量は Control 細胞の約 50% であり、成熟の何らかの異常/遅れが示唆された。

また、培養 24、48、72 時間後のいずれにおいても、Hb 量は KO と CRAC が Control の 50%～70% と低値であった。また、ヘム含量も KO と CRAC は Control の 30%～40% であった (Fig. 2)。関連して、Control 細胞の α -グロビン、 β -グロビンの mRNA は 24 時間後に最大となったが、KO 細胞では増加が認められたものの、24 時間後における mRNA 量は Control の 20%～30% であった。同じく、後期赤芽球で発現するマーカー遺伝子 *A/a*s2 と *Ae*1 の mRNA 量も KO は Control の 10% 程度であった。一方で、前期赤芽球マーカー遺伝子 *Gata*1、*Gata*2 の発現量に KO と Control の違いはなかった。

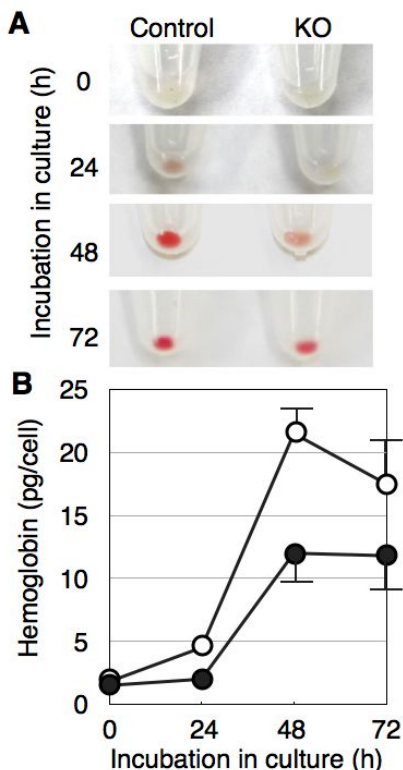


Fig. 2 Hemoglobin synthesis in MEDEP cells

これらは、TSP02 の欠如、あるいは TSP02 の CRAC モチーフの欠如、即ちコレステロール代謝機能の障害 (もしくはヘム代謝の障害) が、TSP02 の発現する後期赤芽球以降の様々な特異的な遺伝子発現と成熟を阻害していることを示唆している。

(3) MEDEP 細胞の細胞周期: KO 細胞では、2 核、ならびに分裂像を呈する赤芽球が Control 細胞に比べ有意に高い値 (2～3 倍) を示す一方、細胞増殖は Control に比べて明

らかに遅かった (Fig. 3)。この結果は、TSP02 の機能が、赤芽球成熟期間における正常な細胞周期と細胞増殖に必須であることを示している。

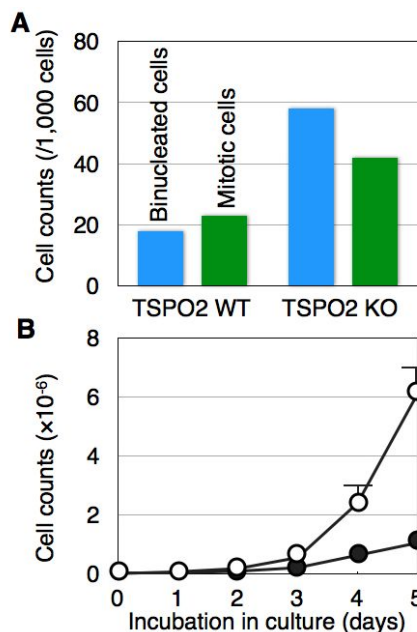


Fig. 3 Binucleated and mitotic cells observed in wild-type (WT) and *Tspo2*-knockout (KO) MEDEP cells (A) and their growth curve (B)

(4) K562 細胞に TSP02 WT、あるいは変異型の TSP02 を導入したところ、ナイルレッドによる脂肪滴染色で WT では、Control、あるいは変異型 TSP02 に比べ細胞質の脂肪滴の数とサイズが低値を示した。同様に、Filipin による染色でも、変異型 TSP02 では細胞質でのコレステロール蓄積が認められるのに対し、WT TSP02 ではコレステロールの集積像は見られなかった。しかし、コレステロール総量の測定では、これらの細胞間に有意な違いは認められなかった。

(5) 以上の知見から、TSP02 は、後期赤芽球の成熟段階における特異的な遺伝子発現と細胞増殖の維持を通して、その成熟と脱核時期を制御していることが示唆された。ただし、そのトリガーがコレステロール代謝の異常なのか、あるいは例えばヘム代謝の異常なのかは現時点では不明である。本研究では KO と CRAC で多くの観点から同様の知見が得られたが、CRAC については実際にこの変異型蛋白質が細胞に発現しているか否かが (抗マウス抗体作製が間に合わず) 不明である。現在、これについて、TSP0 では認められるというヘムとの相互作用を TSP02 が有しているか否かを検討中であり、これらを合わせて論文公表を予定する。また、*Tspo2* ノックアウトマウスを作製中であり、その赤芽球系細胞の表現型解析を行う予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

URL:

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/lmm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・(連合)大学院獣医学研究・
教授

研究者番号: 00183179

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山崎 淳平 (YAMAZAKI, Jumpei)

北海道大学・(連合)大学院獣医学研究院・
助教

研究者番号: 20732902

(4) 研究協力者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学・(連合)大学院獣医学研究科・
准教授

研究者番号: 50283974