

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：84203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15117

研究課題名(和文) fsnマウスを用いた赤血球分化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of erythroid differentiation using fsn mice

研究代表者

木下 和生 (Kinoshita, Kazuo)

滋賀県立成人病センター(研究所)・遺伝子研究部門・専門研究員

研究者番号：50293874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球が骨髄で作られる過程で細胞核を捨て去ることを脱核という。赤血球を工業的に生産する上で障害となっている脱核効率の低さを克服するためには、脱核の分子機構の理解が不可欠である。赤血球の分化と脱核に異常を有する flaky skin (fsn) マウスの原因遺伝子 Ttc7 の機能解析を通して、脱核の謎に迫る研究を行った。fsn マウスの骨髄において赤血球分化が異常であることを明らかにした。fsn マウスの胎児から長期間培養可能な赤血球の幹細胞を単離し、培養条件で脱核することを確認した。Ttc7 に結合するタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Developing erythrocytes undergo a process of enucleation, which expells the nucleus out of the cell. To overcome a problem of inefficient enucleation of erythroblasts under the culture condition, which is a major hurdle against establishing an industry-scale erythrocyte production, elucidation of molecular mechanism of enucleation may be required. We performed experiments to analyze function of Ttc7 gene, which is the causative gene of flaky skin (fsn) mice, a mutant strain with abnormal erythrocyte differentiation and enucleation. We found that erythroid differentiation is abnormal in the bone marrow of fsn mice. We could isolate and maintain extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) from the fetal liver of fsn mice, which could enucleate under culture as efficiently as the wild-type ESRE. We identified proteins that bind with Ttc7 protein.

研究分野：生化学

キーワード：赤血球 脱核

1. 研究開始当初の背景

輸血用赤血球は社会の高齢化に伴い需要が増加し、輸血後の感染症を回避することへの要求も高まりつつある。献血に依存しない赤血球の供給体制を確立することは世界的な要請といえる。現在 ES 細胞や iPS 細胞から有核の赤芽球細胞を誘導することは可能になったが、さらに脱核を経て赤血球へと効率よく分化させることは実現できていない。この問題を解決するには脱核機構の解明が必要と思われる。赤血球の脱核は脊椎動物の中でも哺乳類に限られるので、数少ない進化的変更により生じたと考えられる。申請者は脱核に障害のあるマウス系統を文献的に調査し、flaky skin (fsn) マウスに着目した [1]。fsn マウスの原因遺伝子は *Ttc7* 遺伝子であることが 2005 年に報告されたが [2]、その遺伝子産物の機能は未解明のままである。*Ttc7* には tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインのみが存在する。TPR ドメインはタンパク間の相互作用に関わるドメインであり、その存在から機能を類推することができない。*Ttc7* を起点とした脱核制御機構の解明は、将来、赤血球を培養条件で生産する技術の確立に役立つと考えられる。またヒト *TTC7A* は消化管閉鎖を伴う免疫不全の原因遺伝子であり [3, 4]、上皮や免疫細胞での機能もあると考えられる。

2. 研究の目的

赤血球の分化における脱核の分子機構が分かっていないことが赤血球を培養条件で作りに出すことを困難にしている。脱核と対照的に細胞質を捨て去る現象が精子形成過程に存在するが、核と細胞質が分離する点では脱核と同じである。申請者は赤血球の脱核と精子形成の両方に異常がある変異マウス flaky skin (fsn) に着目し、その原因遺伝子 *Ttc7* の機能を明らかにすることで、赤血球脱核の機構を解明する。献血によらない輸血用赤血球供給体制に貢献する。

3. 研究の方法

(1) fsn マウスは貧血を呈し、有核赤血球が末梢血に存在する以外に大小不同、多染性、変形などの赤血球の異常形態が報告されている。この赤血球の異常が骨髄における造血の異常に由来するか調べるために、骨髄の細胞をフローサイトメトリーで解析する。

(2) fsn マウスの骨髄から赤血球の幹細胞 extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) を樹立し、培養条件化で脱核を誘導し、脱核の異常が認められるかフローサイトメトリーで解析する。

(3) *Ttc7* に結合するタンパクを免疫沈降により同定する。

4. 研究成果

(1) fsn マウスの赤血球の分化にどのような異常があるか骨髄細胞をフローサイトメーター (Ter119 抗体 + CD71 抗体 + SYTO59 三重染色) により調べた。その結果、通常網状赤血球の段階で認められる CD71 の急速な発現低下が認められず、中等度の発現を示す細胞集団が増加していることが認められた (図 1)。このパターンは正常マウスの胎児肝臓における造血細胞と類似しているため、fsn マウスでは成体型造血に欠陥があり、胎児型造血が再動員されている可能性が考えられた。

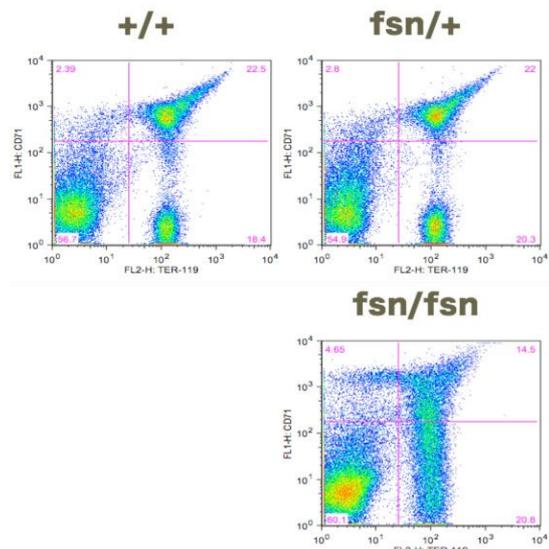


図 1 fsn マウスの骨髄のフローサイトメトリー解析 +/+ : 野生型, fsn/+ : ヘテロ接合体, fsn/fsn : ホモ接合体。横軸: Ter119、縦軸: CD71。fsn/fsn では Ter119 陽性の分画に CD71 弱陽性が増加し、CD71 の発現低下に障害があることがわかる。

(2) マウス胎生 12.5 日の胎児肝臓より長期間培養可能な赤血球幹細胞 extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) [5] を樹立した (図 2)。

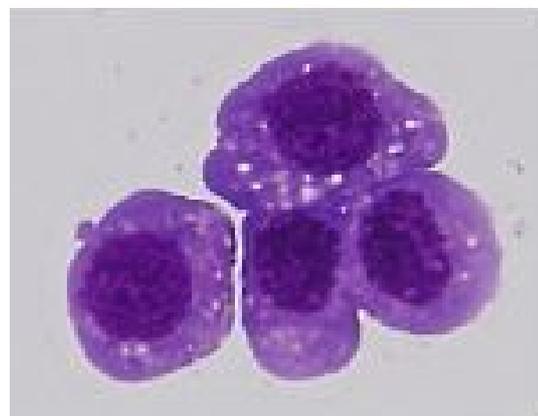


図 2 ESRE (May Giemsa 染色)

1年以上継代培養可能で、表面抗原の解析から CFU-E に近い前赤芽球であることがわかった。脱核誘導培地で培養すると3日間で20%の細胞が脱核することを確認した。ESREは凍結保存に耐え、1年間継代培養しても最終分化を経て脱核する能力を維持していた。ESREは遺伝子導入とクローニングが可能であり、赤芽球最終分化を研究する上で有用な細胞であると言える。

ESREは生存にSCFとEpoを必要とするが、我々はこれらの遺伝子を導入することで、培地中へのサイトカイン添加が不要となることを示した。また任意の遺伝子を安定導入する際に、同時にSCFまたはEpo遺伝子を連結しておけば、SCFまたはEpoを含まない培地で培養することで、遺伝子導入細胞だけを選択することが可能であった。この手法は細胞のサイトカイン依存性を応用した遺伝子導入法と言える。

Ttc7を欠損するfsnマウスの胎生12.5日の胎児肝臓よりESREを樹立した。fsn/fsn ESREは野生型同様の増殖速度で分裂した。昨年度作成した抗Ttc7モノクローナル抗体でウェスタンブロットを行った結果、fsn/fsn ESREにはTtc7タンパク質は存在しないか、あっても正常に比べて極めて少量しか存在しないことが確認できた。脱核誘導条件で培養すると野生型同様の効率で脱核したことから、脱核はTtc7タンパク質がなくても起こることが判明した。Ttc7とパラログをなすTtc7Bに対するポリクローナル抗体を作成し、ESREにおける発現を検討したところ、fsn/fsn ESREでは野生型と同レベルのTtc7Bタンパクが存在することがわかった。fsn/fsn ESREが脱核できるのはTtc7BによってTtc7欠損が補償されている可能性がある。今後、ESREでTtc7とTtc7Bの両方を発現抑制した上で脱核を誘導してみる予定である。

(3) Ttc7の機能を明らかにするため、Ttc7に結合するタンパク質を同定する実験を行った。HeLa細胞にTtc7タンパクを強制発現させ、抗体を用いてTtc7と相互作用するタンパク質を精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離したバンドを質量分析器で解析した結果、Ttc7に結合する新規のタンパクを同定できた。このタンパクをRNAiまたはCRISPR/Cas9による遺伝子破壊により発現抑制し、脱核に対する影響を調べていきたい。

<引用文献>

[1] Beamer, W. G., Pelsue, S. C., Shultz, L. D., Sundberg, J. P., and Barker, J. E.: "The flaky skin (fsn) mutation in mice: map location and description of the anemia" *Blood* 86: 3220-6, 1995.

[2] White, R. A., McNulty, S. G., Nsumu, N. N., Boydston, L. A., Brewer, B. P., and Shimizu, K.: "Positional cloning of the Ttc7 gene required for normal iron homeostasis and mutated in hea and fsn anemia mice" *Genomics* 85: 330-7, 2005.

[3] Chen, R., Giliani, S., Lanzi, G., Mias, G. I., Lonardi, S., Dobbs, K., Manis, J., Im, H., Gallagher, J. E., Phanstiel, D. H., Euskirchen, G., Lacroute, P., Bettinger, K., Moratto, D., Weinacht, K., Montin, D., Gallo, E., Mangili, G., Porta, F., Notarangelo, L. D., Pedretti, S., Al-Herz, W., Alfahdli, W., Comeau, A. M., Traister, R. S., Pai, S. Y., Carella, G., Facchetti, F., Nadeau, K. C., Snyder, M., and Notarangelo, L. D.: "Whole-exome sequencing identifies tetratricopeptide repeat domain 7A (TTC7A) mutations for combined immunodeficiency with intestinal atresias" *J Allergy Clin Immunol* 132: 656-664 e17, 2013.

[4] Samuels, M. E., Majewski, J., Alirezaie, N., Fernandez, I., Casals, F., Patey, N., Decaluwe, H., Gosselin, I., Haddad, E., Hodgkinson, A., Idaghdour, Y., Marchand, V., Michaud, J. L., Rodrigue, M. A., Desjardins, S., Dubois, S., Le Deist, F., Awadalla, P., Raymond, V., and Maranda, B.: "Exome sequencing identifies mutations in the gene TTC7A in French-Canadian cases with hereditary multiple intestinal atresia" *J Med Genet* 50: 324-9, 2013.

[5] England, S. J., McGrath, K. E., Frame, J. M., and Palis, J.: "Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus" *Blood* 117: 2708-17, 2011.

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

[雑誌論文](計 0 件)

なし

[学会発表](計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shigamed.jp/divisions/gene.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA, Kazuo)

滋賀県立成人病センター研究所・専門研究員

研究者番号：50293874

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

植村 宗弘 (UEMURA, Munehiro)

滋賀県立成人病センター研究所・主任主査

研究者番号：30568390

(4)研究協力者

なし