

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 04 月 01 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590362
 研究課題名（和文）
 非機能的変異二量体 S19 リボソーム蛋白質産生マウス作製
 研究課題名（英文）
 Establish of mutant S19 ribosomal protein dimer functional deficient mice
 研究代表者
 西浦 弘志（NISHIURA HIROSHI）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：90284760

研究成果の概要（和文）：

RP S19 単量体機能は保持し、RP S19 多量体機能が欠損したノックインホモマウスは、僅かではあるが有意差を持って骨髄細胞数、脾臓細胞数、末梢血中の赤血球数が減少していました。さらに、好塩基性赤芽球の割合を調べるために骨髄細胞と脾臓細胞を CD71・TER119 で染色し FACS で解析すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの好塩基性赤芽球の割合も減少していました。また、溶血性貧血等をフェニルヒドラジンで誘導し赤血球数の回復動態を観察すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの赤血球数の回復動態も減少していました。現在、日本の DBA 患者に RP S19 多量体が関与するかを臨床の先生にお願いして骨髄液、末梢血、尿などの資料を使用できるかを検討しています。その後、RP S19 多量体による造血島形成作用を介した赤芽球の品質管理機構の発表をする予定です。

研究成果の概要（英文）：

In contrast to wild-type mice, numbers of bone marrow cells, spleen cells, and peripheral erythrocytes were slightly but significantly decreased in RP S19 oligomer functional deficient (Knock-In) mice. Moreover, a ratio of basophilic erythroblasts in Knock-In mice was also decreased based on the CD71/TER119 expression values in FACS analysis. When a recovering time of erythrocytes is measured in hemagglutinin-induced hemolytic anemia mice, the time was extended by Knock-In mice. Now, we start to examine whether RP S19 oligomers are contributed with DBA. After that, we are to propose a maintenance system of erythrocytes via RP S19 oligomer-dependent erythroblast island formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：S19 リボソームタンパク質、ダイヤモンドブラックファン貧血症、C5a 受容体、モデルマウス、ケモタキシス、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

現在、骨髄で造血幹細胞が赤血球に分化するまでに、赤血球系幹細胞-前赤芽球という増殖期に続き赤芽球-網赤血球という成熟期が想定されている。増殖期では、腎臓由来 EPO 依存性増殖作用および未知の抗アポトーシス作用による分化細胞の維持が、成熟期では、オートファジー作用による分化細胞内小器官の排除と未知のアポトーシス作用による分化細胞内核の放出が、観察されている。

RP S19 遺伝子異常が、先天性赤芽球癆 DAB 患者 25%に発見された。留学先を含めた世界レベルでの研究より、単量体 RP S19 のリボソーム形成能(リボソーム内機能)という新しい抗アポトーシス作用が発見された。従って、増殖期の抗アポトーシス作用不全による分化細胞へのアポトーシス作用が、成熟期の赤芽球激滅の原因とされた。この理論は、他のリボソーム蛋白質異常においても赤血球数減少が再現されたこと、DAB 患者血液幹細胞に正常 RP S19 遺伝子が導入されたことで赤血球数増加が再現されたこと、等により支持された。従って、根本的医学治療法としては、現実的な骨髄移植か CD34 陽性血液幹細胞移植および安全性が確立されていない遺伝子治療等が選択肢に挙げられる。

2. 研究の目的

我々は、リボソーム低形成が観察されない DAB 患者の存在および成熟期における未知のアポトーシス作用不全が成熟期赤芽球激滅の原因との予測を基に二量体 RP S19 の役割(リボソーム外機能)を検討してきた。近年、総てのアポトーシス細胞が放出する二量体 RP S19 は、総てのアポトーシス細胞上に発現する C5a レセプターを介して、自細胞アポトーシス作用を増幅していることを発見した。従って、アポトーシス増幅という部分的アポトーシス作用による脱核現象を想定し、鉄剤ヘミン誘導性には脱核以前の前赤芽球までの分化に留まる慢性白血球細胞 K562 に、RP S19 二量体および可視化のための緑蛍光物質 GFP を過剰産生させた。驚くことに、K562 は脱核し成熟赤血球様細胞にまで分化誘導された。この結果は、リボソーム低形成が観察されない DAB 患者の存在を説明できるものと考えている。

以上を総合すると、マウス赤血球形成における単量体 RP S19 の抗アポトーシス作用による

増殖期分化細胞の維持と二量体 RP S19 のアポトーシス増幅作用による成熟期分化細胞の脱核が見えてきた。この理論が正しければ、RP S19 ノックアウトマウスが胎生致死であったことは、増殖期分化細胞へのアポトーシス作用が想定される。一方、非機能性変異二量体 RP S19 産生をマウスに導入すると、正常機能性変異単量体 RP S19 により増殖期分化細胞は維持されるので胎生致死は免れ、脱核不全による赤芽球激滅の再現が期待できる。この仮説を証明するために、非機能性変異二量体 RP S19 産生マウス作成の計画を立案する。

3. 研究の方法

RP S19 単量体機能は保持し、RP S19 多量体機能が欠損したノックインホモマウスは、僅かではあるが有意差を持って骨髄細胞数、脾臓細胞数、末梢血中の赤血球数が減少していました。さらに、好塩基性赤芽球の割合を調べるために骨髄細胞と脾臓細胞を CD71・TER119 で染色し FACS で解析すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの好塩基性赤芽球の割合も減少していました。また、溶血性貧血等をフェニルヒドラジンで誘導し赤血球数の回復動態を観察すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの赤血球数の回復動態も減少していました。現在、日本の DBA 患者に RP S19 多量体が関与するかを臨床の先生にお願いして骨髄液、末梢血、尿などの資料を使用できるかを検討しています。その後、RP S19 多量体による造血島形成作用を介した赤芽球の品質管理が不足することによる貧血症の発表をする予定です。

4. 研究成果

RP S19 単量体機能は保持し、RP S19 多量体機能が欠損したノックインホモマウスは、僅かではあるが有意差を持って骨髄細胞数、脾臓細胞数、末梢血中の赤血球数が減少していました。さらに、好塩基性赤芽球の割合を調べるために骨髄細胞と脾臓細胞を CD71・TER119 で染色し FACS で解析すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの好塩基性赤芽球の割合も減少していました。また、溶血性貧血等をフェニルヒドラジンで誘導し赤血球数の回復動態を観察すると、コントロールマウスに比べてノックインマウスの赤血球数の回復動態も減少していました。現在、日本

の DBA 患者に RP S19 多量体が関与するかを臨床の先生にお願いして骨髓液、末梢血、尿などの資料を使用できるかを検討しています。その後、RP S19 多量体による造血島形成作用を介した赤芽球の品質管理が不足することによる貧血症の発表をする予定です。

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 14 件)

1. (査読有) Nishiura H, Zhao R, Yamamoto T. Dual functions of the C5a receptor as a connector for the K562 erythroblast-like cell-THP-1 macrophage-like cell island and as a sensor for the differentiation of the K562 erythroblast-like cell during hemin-induced erythropoiesis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:187080. (2012)

2. (査読有) Taniguchi K, Nishiura H, Ota Y, Yamamoto T. Roles of the ribosomal protein S19 dimer and chemically induced apoptotic cells as a tumor vaccine in syngeneic mouse transplantation models. *J Immunother*. 34: 16-27. (2011)

3. (査読有) Nishiura H, Tanase S, Tsujita K, Sugiyama S, Ogawa H, Nakagaki T, Semba U, Yamamoto T. Maintenance of ribosomal protein S19 in plasma by complex formation with prothrombin. *Eur J Haematol*. 86: 436-441. (2011)

4. (査読有) Nishiura H, Zhao R, Yamamoto T. The role of the ribosomal protein S19 C-terminus in altering the chemotaxis of leucocytes by causing functional differences in the C5a receptor response. *J Biochem*. 150: 271-277. (2011)

5. (査読有) Taniguchi K, Nishiura H, Yamamoto T. Requirement of the acquired immune system in successful cancer chemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) in a syngeneic mouse tumor transplantation model. *J Immunother*. 34: 480-489. (2011)

6. (査読有) Xie P, Nishiura H, Semba U, Chen J, Zhao R, Kuniyasu A, Yamamoto T. Inhibitory effects of C4a on

chemoattractant and secretagogue functions of the other anaphylatoxins via Gi protein-adenylyl cyclase inhibition pathway in mast cells. *Int Immunopharmacol*. 12: 158-168. (2011)

7. (査読有) Semba U, Chen J, Ota Y, Jia N, Arima H, Nishiura H, Yamamoto T. A Plasma Protein Indistinguishable from Ribosomal Protein S19: Conversion to a Monocyte Chemotactic Factor by a Factor XIIIa-Catalyzed Reaction on Activated Platelet Membrane Phosphatidylserine in Association with Blood Coagulation. *Am J Pathol*. 176: 1542-1551. (2010)

8. (査読有) Jia N, Semba U, Nishiura H, Kuniyasu A, Nsiama KT, Nishino N, Yamamoto T. Inter-conversion between pure chemotactic ligands and chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution. *J Leukocyte Biol*. 87: 965-975. (2010)

9. (査読有) Nishiura H, Tokita K, Li Y, Harada K, Woodruff TM, Taylor SM, Nsiama TK, Nishino N, Yamamoto T. The role of the ribosomal protein S19 C-terminus in Gi protein-dependent alternative activation of p38 MAP kinase via the C5a receptor in HMC-1 cells. *Apoptosis*. 15: 966-981. (2010)

10. (査読有) Nishiura H, Chen J, Ota Y, Semba U, Higuchi H, Nakashima T, Yamamoto T. Base of molecular mimicry between human ribosomal protein S19 dimer and human C5a anaphylatoxin. *Int Immunopharmacol*. 10: 1541-1547. (2010)

11. (査読有) Ota Y, Chen J, Shin M, Nishiura H, Tokita K, Shinohara M, Yamamoto T. Role of ribosomal protein S19-like plasma protein in blood coagulum resorption. *Exp Mol Pathol*. 90: 19-28. (2010)

[学会発表] (計 20 件)

1. 西浦弘志. 補体 C5a 受容体触媒細胞内シグナル伝達におけるフォスホオリパーゼ A2 の役割. 第 23 回フォーラムインドーゲン. 熊本ホテルキャッスル, 日本. 11 月 16-17 日. (2012)

2. 西浦弘志. 補体 C5a 受容体・ribosomal protein S19 多量体機構による急性炎症反応の終止機構. 第 36 回九州生化学シンポジウム. 宮崎, 日本. 09 月 06-08 日. (2012)

3. Nishiura H. Extra-Ribosomal Functions of Ribosomal Protein S19: Increment of Neutrophil Influx in Gln137Glu Mutant Ribosomal Protein S19 Knocked-In C57BL/6J Heterozygous Mice. The Global COE Liaison Laboratory Meeting. Kumamoto university, Japan. February 15. (2012)

4. 西浦弘志. 白血球生物学から見た急性炎症反応の終止機構. 第 57 回日本病理学会秋期特別総会. 日本教育会館 東京, 日本. 11 月 17-18 日. (2011)

5. Nishiura H. The role of the ribosomal protein S19 C-terminus in altering the chemotaxis of leukocytes by causing functional differences in the C5a receptor response. 5th International Complement Therapeutics Conference. Rhodes, Greece. Abstract 25. June 22-27. (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

①名称: リボソームタンパク質 S19 のリボソーム外機能特異的不全マウスの作成とその製薬への応用

発明者: 西浦弘志・山本 哲郎

権利者: 西浦弘志・山本 哲郎・齊藤 英樹

種類: 特許

番号: 特願 2012-000000

出願年月日: 平成 24 年 05 月 01 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

①名称: 血球成熟促進活性を有する物質のスクリーニング方法

発明者: 西浦弘志・山本 哲郎

権利者: 西浦弘志・山本 哲郎・齊藤 英樹

種類: 特許

番号: 特願 2010-112556

出願年月日: 平成 23 年 05 月 01 日

国内外の別: 国内

②名称:

発明者: 血球成熟促進活性を有する物質のスクリーニング方法

発明者: 西浦弘志・山本 哲郎

権利者: 西浦弘志・山本 哲郎・齊藤 英樹

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/061057

出願年月日: 平成 23 年 07 月 01 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西浦 弘志 (NISHIURA HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 90284760

(2) 研究分担者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・生命資源・研究支援センター・

准教授

研究者番号: 90211705