

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591528

研究課題名(和文) NOGマウスを用いたWIP欠損症およびWASP異常症の発症機構と分子病態の解明

研究課題名(英文) Study on molecular pathogenesis of X-linked neutropenia and WIP deficiency by using NOG mice and human myeloid cell line.

研究代表者

笹原 洋二 (Sasahara, Yoji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60372314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCD34陽性造血幹細胞への恒常的活性化変異WASPおよび変異WIP遺伝子導入とヒト化NOGマウスを用いた実験系による、X連鎖好中球減少症の発症機構およびWIP欠損症の発症機構の解析を進めたが、遺伝子導入効率が悪く中止せざるを得なかった。そのため、骨髄球系細胞株K562を用いた実験系に変更した。その結果、WASPIは一部細胞核内に局在すること、RNAポリメラーゼIIと複合体を形成して遺伝子転写制御因子として機能すること、骨髄球系細胞の分化に重要な遺伝子発現調節に関与し、特にG-CSF受容体やRUNX1の転写を制御することを見出し、X連鎖好中球減少症発症機序の重要な要因であることを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Rare gain-of-function mutations in the WASP gene are known to result in X-linked neutropenia (XLN). We first tried transduction of mutant WASP and WIP genes into CD34 positive human hematopoietic stem cells. However, transduction efficiency was very low. Therefore we next performed experiments by using myeloid cell line K562. We reported that a part of WASP localized in the nucleus and a tendency of activating WASP mutants to localize in the nucleus more than WT. We found that WASP could form a complex with RNA polymerase II. To determine whether gene transcription was affected by WASP mutants in myeloid cells, we performed microarray analysis and found different expression profiles between WT and L270P WASP-transfected K562 cells. Among the genes affected, granulocyte colony-stimulating factor receptor(G-CSFR) and Runx1 were included. Therefore, our results suggested that open conformation of WASP would contribute to the outcome of myeloid cell differentiation and pathogenesis of XLN.

研究分野：小児血液腫瘍学、原発性免疫不全症

キーワード：WASP WIP 原発性免疫不全症 ヒト化マウス NOGマウス

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫不全マウスにヒト造血細胞・免疫担当細胞を移植することにより、造血・免疫系を解析する研究が精力的に推進されている。その際のレシピエント免疫不全マウスとして脚光を浴びているのが、東北大学にて世界に先駆けて遺伝子が単離され、独自に作製された IL-2R c-KO マウスより開発された NOD/Shi-scid/IL-2R c KO マウス (NOG マウス) である。当研究室では、東北大学免疫学分野との共同研究により、既に正常ヒト CD34 陽性造血幹細胞を NOG マウスに移植することにより、ヒトの造血・免疫系の構築がマウス内で再現できることを報告した (Watanabe Y, et al, Int. J. Immunol., 2010)。

研究代表者は大学院生時より X 染色体連鎖性原発性免疫不全症である Wiskott-Aldrich 症候群 (WASP 異常症) の研究に従事してきた。特に WASP 結合蛋白質 (WASP-interacting protein: WIP) については、機能解析やノックアウトマウスの表現型の解析から、WIP 独自の機能と共に、WIP は WASP 蛋白質の安定性に重要な役割を果たすことを報告した (Sasahara Y, et al, Mol. Cell, 2002; Sasahara Y, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2007, 他)。その後、平成 20-22 年度基盤 C の研究成果により、T 細胞における WASP 蛋白質分解の分子機構と WIP の重要性を示した解析結果をまとめ (Watanabe Y and Sasahara Y, et al, J. Allergy Clin. Immunol., 2013)、新規 WAS 病型 (WIP 欠損症) の分子病態の理解に貢献している。

最近、恒常的活性化変異 WASP は X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked neutropenia: XLN) の原因となることが報告された (Devriendt K, et al, Nat. Genetics, 27(3), 313-317, 2001)。しかし、恒常的活性化変異 WASP においてなぜヒト骨髓球系に分化異常が生じ、XLN を発症するのには完全には解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで研究成果をより深め、臨床に還元できる研究内容に発展させるために、ヒト CD34 陽性造血幹細胞への WIP, WASP 変異遺伝子の導入とヒト化 NOG マウスおよびヒト骨髓球系細胞株を用いた実験系により、以下の点を解明することを目的とした。

(1) 変異 WIP 導入による新規 WAS 病型 (WIP 欠損症) の発症機構と分子病態の解析

(2) 恒常的活性化変異 WASP による X 染色体連鎖性好中球減少症の発症機構の解析

特に、ヒト造血系での骨髓球系分化異常の解析とその要因を解明する。

3. 研究の方法

(1) 変異 WASP および WIP 遺伝子のヒト CD34 陽性造血幹細胞への導入

レトロウイルスベクター (含 IRES-GFP) にヒト正常 WASP を挿入した発現ベクターは作

製済であった。このベクターには発現細胞を sorting するために GFP が付加されている。この WASP 部位をヒト変異 WASP, WIP cDNA に置換し、変異 WASP, WIP 発現ベクターを構築する。臍帯血バンクより、研究用として入手可能なヒト臍帯血より分離した CD34 陽性造血幹細胞を IL-6、SCF、TPO、Flt3L 存在下に 48 時間培養後、作製したウイルスベクターを感染させる。

(2) ヒト骨髓球系細胞株 K562 を用いた恒常的活性化変異 WASP による X 染色体連鎖性好中球減少症の発症機構の解析

恒常的活性化変異 WASP 発現ベクターを構築する。特に、X 連鎖性好中球減少症の病態解析として重要な骨髓球系の分化異常を中心に解析した。発症機構モデル系として、WASP を発現していないヒト骨髓球系細胞株 K562 を用いた。

4. 研究成果

(1) 変異 WASP および WIP 遺伝子のヒト CD34 陽性造血幹細胞への導入

ヒト CD34 陽性造血幹細胞への恒常的活性化変異 WASP および変異 WIP 遺伝子導入とヒト化 NOG マウスを用いた実験系による、X 連鎖性好中球減少症の発症機構および WIP 欠損症の発症機構の解析を進めた。レトロウイルスベクター系の実験系を用いて行ったが、当初の予測よりも遺伝子導入効率が極めて悪く、その後の実験への進展と解析が不可能であった。そのため、以降の研究は骨髓球系細胞株 K562 を用いた実験系に変更することとした。

(2) 骨髓球系細胞株 K562 を用いた恒常的活性化変異 WASP による X 染色体連鎖性好中球減少症の発症機構の解析

骨髓球系細胞株 K562 を用いた実験では、研究目的を達し得る結果を得ることができた。解析の結果から、以下の成果を得ることができた。

WASP は野生型、恒常的活性化変異型ともに一部細胞核内に局在すること、その割合は恒常的活性化変異型の方が有意に多かったこと (図 1)。この結果は、Cos7 細胞および K567 細胞の両細胞株で同様の結果であった。

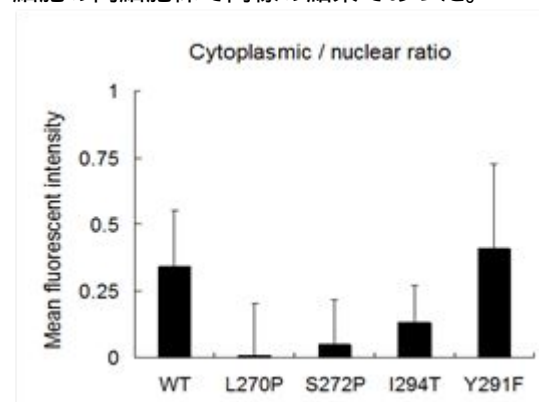


図 1 野生型および恒常的活性化変異 WASP の細胞内局在比率

恒常的活性化 WASP は、Cos7 細胞において発現させると、Src チロシンキナーゼによるチロシンリン酸化を野生型よりも強く受ける。そのために、アクチン重合化定量を指標とした活性化も亢進していた (図 2)。

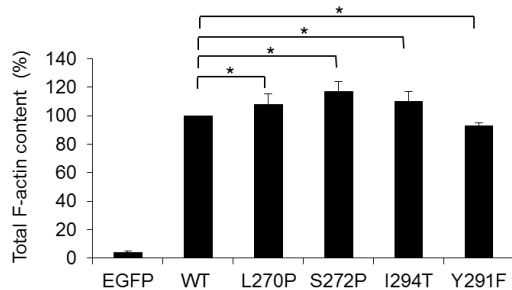


図 2 Cos7 細胞において恒常的活性化変異 WASP は野生型よりもアクチン重合化を亢進させる

WASP は細胞核内にて RNA ポリメラーゼ II と共局在し、複合体を形成して遺伝子転写制御因子として機能すること (図 3)。

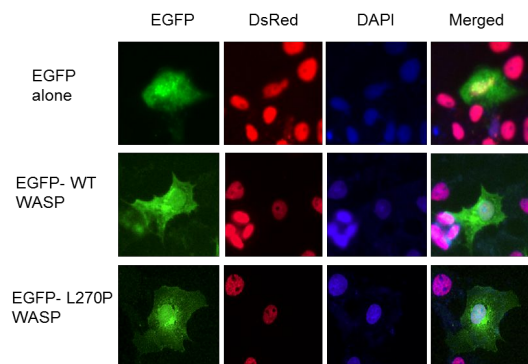


図 3 WASP と RNA ポリメラーゼ II は細胞核内にて共局在する

骨髄球系細胞の分化に重要な遺伝子発現調節に関与すること、遺伝子発現調節を受ける遺伝子群のうち特に G-CSF 受容体と RUNX1 遺伝子において転写量が制御されていることを見出し、これらが X 連鎖好中球減少症発症機序の重要な要因であることを提唱した (図 4)。

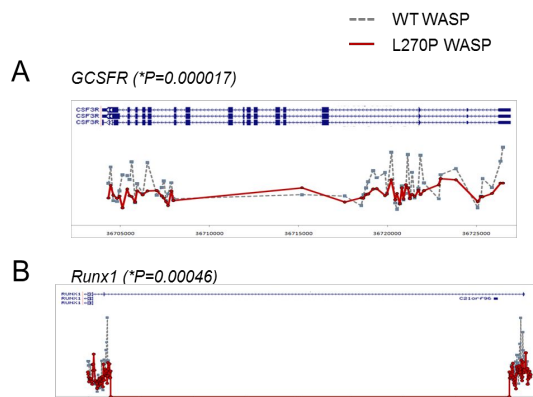


図 4 ChIP on Chip 法による WASP による G-CSFR と RUNX1 遺伝子発現調節機構の解析

これらの結果を英文論文としてまとめ、投稿し受理された (Looi CY and Sasahara Y, et al, Int. Immunol., 2014)。

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 8 件)

1. Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaiki I, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S. Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. Int. Immunol., 査読有, 26(6), 341-352, 2014.
DOI:10.1093/intimm/dtx072.

2. Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Suresh K, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Libermann T, Geha RS. Binding of WASP/N-WASP interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. Mol. Cell Biol., 査読有, 34(14), 2600-2610, 2014.
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sasahara+Y>

3. Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. Neuromuscul. Disord., 査読有, 24(12), 1068-1072, 2014.
DOI:10.1016/j.nmd.2014.07.008.

4. 笹原洋二. 総説 先天性血小板減少症の診断と分子病態. 小児科, 査読無, 55(1), 105-114, 2014.

5. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Kinoshita A, Nakadate H, Kanazawa T, Oozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Nonoyama S, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatr. Blood & Cancer, 査読有, 60(5), 836-841, 2013.
DOI:10.1002/pbc.24359.

6. Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N,

Massaad MJ, Looi CY, Kumaki S, Kure S, Geha RS, Tsuchiya S. T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. J. Allergy Clin. Immunol., 査読有,132, 648-655, 2013.
DOI:10.1016/j.jaci.2013.03.046.

7. 笹原洋二、大内芽里、今泉益栄. 総説：小型および正常サイズの血小板を有する先天性血小板減少症の診断と分子病態における最近の知見. 日本小児血液・がん学会雑誌、査読有,50(2),186-191, 2013.

8. 笹原洋二. 免疫不全を伴う特徴的な症候群 その1 - Wiskott-Aldrich 症候群、高 IgE 症候群. 小児科診療、査読無, 76(3), 407-412, 2013.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 笹原洋二. 招待講演：ITP と鑑別が必要な先天性血小板減少症・免疫不全症。第 15 回若葉小児科臨床研究会、2015 年 2 月 21 日、生田会館、兵庫県・神戸市。

2. 笹原洋二. 教育講演：ITP と鑑別が必要な血小板疾患。第 56 回日本小児血液・がん学会学術総会、2014 年 11 月 28 日-30 日、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市。

3. Sasahara Y, Watanabe Y, Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation in T cells. 6th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. 2014 年 10 月 29 日、プラハ (チェコ共和国)。

4. 笹原洋二. シンポジウム：小児免疫不全症の現状と展望：原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植。第 55 回日本小児血液・がん学会学術総会、2013 年 11 月 30 日、福岡ヒルトンホテル、福岡県・福岡市。

5. Sasahara Y, Watanabe Y, Looi CY, Tsuchiya S, Kure S. Functional roles of WIP in Wiskott-Aldrich syndrome. 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. 2012 年 5 月 17 日、ソウル (大韓民国)。

6. Sasahara Y, Watanabe Y, Looi CY, Tsuchiya S. Mechanisms of ubiquitination and degradation of Wiskott-Aldrich syndrome protein in T cells. 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research/Pediatric Academic Society 2011, joint meeting. 2011 年 4 月 30 日、デンバー (アメリカ合衆国)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹原 洋二 (SASAHARA Yoji)
東北大学・大学院医学系研究科小児病態学
分野・准教授
研究者番号：60372314

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし