

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790972

研究課題名(和文)ES細胞ホモ変異体ライブラリーを用いた新規血球分化制御因子の検索

研究課題名(英文)Screening of a novel factor that regulates hematopoiesis using a homozygous mutant ES cell library

研究代表者

徳永 正浩(TOKUNAGA, MASAHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90597410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは複数のホモ変異ES細胞株を、血球分化を支持するストローマ細胞株であるOP9と共培養することによって、血球の分化に異常をきたす変異細胞株のスクリーニングを行った。結果としてある遺伝子(未発表)のホモ変異ES細胞株において血球分化が著しく障害されていることを見いだした。この遺伝子は新規の遺伝子であり、現在のところその機能や表現型に関する報告が全くなされていない。そこで代表者らは、この遺伝子のin vivoにおける機能を解析するためにノックアウトマウスを作製した。ホモ欠損マウスは胎生6.5日までに致死であり、この遺伝子は発生の初期段階にて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to screen for a mutant whose hematopoietic differentiation is disturbed, we co-cultured several homozygous mutant ES clones with OP9, a stromal cell line supporting hematopoietic differentiation. As a result, we found out that in one mutant clone, this differentiation was severely disturbed. The responsible gene of this mutant is a novel, uncharacterized gene (unpublished data). Then, we generated a knockout mouse of this gene. Intriguingly, null mutant mice were embryonic lethal by E6.5, demonstrating that this gene plays essential roles in early development. Further investigation of this gene may give a new insight in hematopoietic development.

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：血球分化 ES細胞 スクリーニング ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトを初めとして多くの哺乳動物における全ゲノム配列の決定や、次世代シーケンサーの急速な進歩に伴い、われわれのゲノムに関する知見は劇的に進歩している。ヒトやマウスにおいてタンパク質をコードする遺伝子の同定が急速に進んでおり、その数は2万以上と云われている (Pruitt et al., *Genome Res.* 2009)。一方、これらの遺伝子の大部分は機能不明であるかアミノ酸配列から推測されているに過ぎない。事実、ノックアウトマウスを用いた手法により、現在7229個の遺伝子の機能が報告されているが (White et al., *Cell* 2013)、その他多くの遺伝子の機能は未知のまま残されている。その役割を一つ一つ明らかにすることが今後急務となると考えられる。

哺乳類において骨髄 niche に存在する造血幹細胞は、自己複製によって生涯にわたり自身を枯渇することなく維持する一方、毎日莫大な数の成熟血球を末梢血や組織に送り出している。造血システムの特筆すべき点は、7系統からなる血球 (赤血球・好中球・好酸球・好塩基球・単球/マクロファージ・リンパ球・血小板) を必要に応じてバランスよく生成することである。近年、血球分化経路の理解 (Akashi et al., *Nature.* 2000) と相まって、このメカニズムに関して転写因子を中心に多くの知見が集積されてきている。

しかし、血球の分化方向の決定は単一分子により行われるわけではなく、多くの分子が時には同時に、時には時間差を以て協調することによって複雑に制御されている。従って造血システムには未だにその機能が知られていない多くの分子が関わっていると考えられた。本研究課題においては、これら新規の分子を同定することを第一の目的とした。

血球発生の道筋に関わる新たな知見は、再生医療などに応用可能で、医学の進歩に大きく貢献すると思われる。

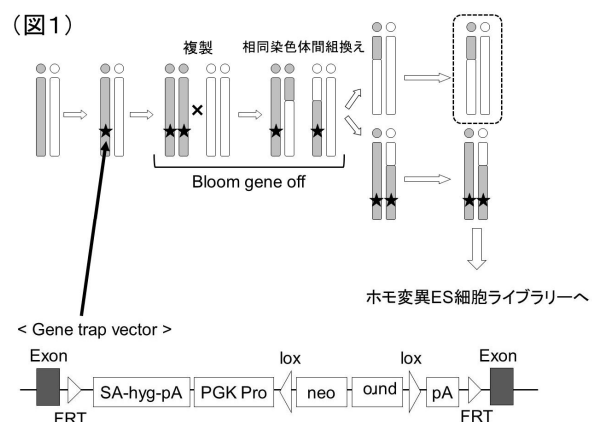
## 2. 研究の目的

研究代表者が所属する研究室は長きにわたりマウス ES 細胞を用いた研究に従事し (Kokubu et al., *Nat Genet.* 2009, Yusa et al., *Nature.* 2004) 最近マウス ES 細胞において多数の遺伝子を効率良く破壊する方法を独自に開発した (Horie et al., *Nat Methods.* 2011)。1個の遺伝子が両アレル同時にノックアウトされたマウス ES ホモ変異体200種類からなるライブラリーを有している。本研究課題においてはこの変異 ES 細胞株を血球分化を支持するストローマ細胞株である OP9 と共培養することによって、血球分化への影響をスクリーニングする。この実験系は ES 細胞から成熟血球までの分化過程を培養皿内で再現可能である。血球の分化・成熟に異常をきたす ES 細胞株における変異遺伝子が、血球分化・成熟において重要な機能を有するものとして同定される。

## 3. 研究の方法

### (1) ホモ変異 ES 細胞ライブラリー

(図1)

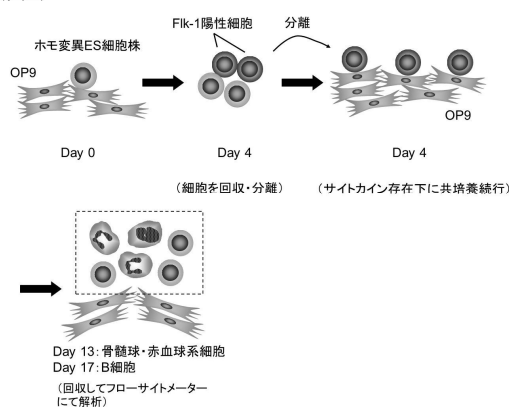


従来、哺乳動物の細胞は二倍体のため片方のアレルに変異を導入しても、もう片方のアレルによって補完されてしまい、劣性遺伝子のスクリーニングは下等動物に比して困難であった。

研究代表者の所属する研究室は、この問題を解決するために、Tet-Off システムによる Bloom 遺伝子の制御を利用してホモ変異 ES 細胞ライブラリーを作製した。図 1 に示すように、gene trap vector を用いてゲノムワイドに遺伝子領域に変異を導入後、まず vector 挿入部位を同定した。次に、Bloom 遺伝子は相同染色体間組換えを抑制する遺伝子で、これを Tet-Off システムにて一過性に抑制することにより通常の 1000 倍の頻度で相同染色体間組み替えを起こさせ、ホモ変異体を作製することが可能である。このようにして得られたホモ変異 ES クローンに次に述べる分化誘導に使用した。

#### (2)OP9 との共培養系を用いた血球分化

(図2)



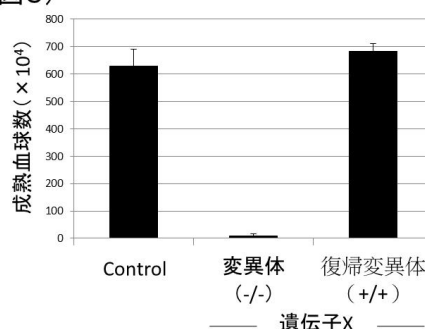
血液細胞への分化には図 2 に示すように、OP9 との共培養系を用いる (Nakano et al., Science. 1994, Ogawa et al., Blood. 1999) 共培養開始 96~100 時間後に細胞を回収し、抗 Flk-1 抗体で染色して陽性細胞を FACS で分離する。分離した細胞を新たに OP9 と共培養して成熟血球を得る。サイトカインとして、成体型赤血球および骨髓球系細胞 (好中球・マクロファージなど) の誘導には SCF 50

ng/ml, IL-3 20 ng/ml, EPO 3 U/ml を添加した。さらに B リンパ球への誘導には SCF + Flt3-Ligand + IL-7 にて誘導した。成体型赤血球および骨髓球系細胞の分化は Flk-1 陽性細胞分離後 9 日、B リンパ球の生成は 13 日後に評価した。評価法としてはフローサイトメトリーを用いて赤血球系マーカー (TER119, CD71)・骨髓球系マーカー (Mac1, Gr1) さらにリンパ球系マーカー (CD19, B220) の発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)血球分化に関与する新規遺伝子 X の同定

(図3)



ES 細胞ホモ変異体ライブラリーに属する変異 ES 細胞株をいくつかスクリーニングした結果、ある遺伝子 (未発表データのため以下遺伝子 X と表記) の変異株において、血球分化が著しく障害されていることを研究代表者は見出した。図 3 に示す通り、生体型赤血球および骨髓球系細胞を誘導する条件にて、Flk-1 陽性細胞分離後 9 日目の生成血球数は野生型細胞株の約 40 分の 1 まで低下した。B リンパ球を誘導する条件下においても同様の結果であった。

##### (2)復帰変異体(Revertant)の解析

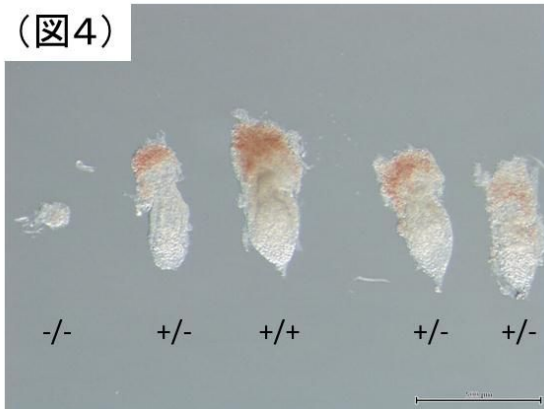
代表者の研究室において使用したシステムでは、gene trap vector の両端に FRT 配列が含まれており、これに挟まれた領域を Flp で抜くことにより容易に復帰変異体 (revertant) を作製することができる。復帰

変異体は血球分化に関して、野生型 ES 細胞株と同様であり（図 3） 遺伝子 X の変異が血球分化障害の原因であることが確認された。

### (3)ノックアウトマウスの作製とその解析

研究代表者らはこの遺伝子の *in vivo* における機能を解析するためにノックアウトマウスを作製した。スクリーニングに用いたものとは別の ES 細胞株をあらたにターゲティングし、この遺伝子の第 3 エクソンが欠損したノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスは胎生 5.5 日より胚の顕著な成長遅延を認め、胎生 5.5~6.5 の間で致死であった（図 4：胎生 6.5 日）。

(図4)



以上のことより、この遺伝子は胚の初期発生において極めて重要な機能を有していることが明らかとなった。ノックアウトマウスが胎生早期に致死であったことから、遺伝子 X が発生において造血系以外にも機能を有していることが推測される。今後この遺伝子の機能をより詳細に検討する予定であり、現在コンディショナルノックアウトマウスを作製し、血球系に特異的な表現型を観察する予定である。遺伝子 X は現時点でその機能に関する報告が皆無であり、またアミノ酸配列からも既知のドメインを有しない。この遺伝子のメカニズムを調べることは新たな生命現象やシグナル経路の発見に至る可能性がある。さらには、遺伝子 X にはヒトのホモログ

が存在し、同じく機能未知である。この遺伝子の研究はヒト血球の発生や病気の原因に関して新たな知見を与えてくれるかもしれない。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

徳永正浩、竹田潤二、マウス一倍体 ES 細胞を用いた GPI アンカー生合成に関わる遺伝子の網羅的検索

第 35 回日本分子生物学会年会（2012 年 12 月 13 日、福岡）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

徳永 正浩 (TOKUNAGA, Masahiro )

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90597410

### (2)研究協力者

堀江 恭二 (HORIE, Kyoji )

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

### (3)研究協力者

山西 絢子 (YAMANISHI, Ayako )

大阪大学・医学系研究科・特任研究員