

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670145

研究課題名(和文) 温度感受性SV40ラージT抗原を用いたマウス不死化赤芽球系前駆細胞株の樹立

研究課題名(英文) Establishment of the mouse immortalized erythroid precursor cell line using a temperature-sensitive SV40 large T antigen

研究代表者

青戸 守 (Aoto, Mamoru)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50372727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円、(間接経費) 270,000円

研究成果の概要(和文)：マウス不死化赤芽球系前駆細胞の作製にあたって予備実験としてマウス赤芽球系前駆細胞にヒトBclxLを発現させる条件を検討した。当初の予定通り、ヒトBclxL発現プラスミドをマウス赤芽球系前駆細胞に電気穿孔法にて導入したところ、ヒトBclxLタンパク質の発現量が低いことが分かった。発現プラスミドのプロモーターをCMVプロモーターからEF-1alphaプロモーターに変更したところヒトBclxLタンパク質の発現量は有意に上昇した。マウス赤芽球系前駆細胞での遺伝子発現にはEF-1alphaプロモーターが有効であることが分かった

研究成果の概要(英文)：I examined a condition to produce human BclxL to mouse erythroid progenitor cells as a preliminary experiment about the production of the mouse immortalized erythroid progenitor cells. When the human BclxL expression plasmid was introduced into mouse erythroid progenitor cells by electroporation, it was revealed that expression of the human BclxL protein was very low. Then, when the promoter of the expression plasmid was changed into the EF-1alpha promoter instead of the CMV promoter, the expression level of human BclxL protein increased significantly.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達 赤血球分化

## 1. 研究開始当初の背景

赤血球の分化過程は、細胞や核のサイズの減少、ヘモグロビンの蓄積、クロマチンの凝縮、脱核といったダイナミックな形態的・生化学的变化によって特徴づけられている。これらの分子メカニズムについては良い実験系がなかったことから長らく不明なままであったが、近年、マウス胎児肝臓由来初代培養赤芽球を用いた実験系が開発され、転写因子やヒストン脱アセチル化酵素、miRNA、long non-coding RNA が関与していることが報告されている。また、「脱核」に関しては、アクチンリングが脱核途中の赤芽球において観察され、低分子量 G タンパク質 Rac シグナル系がそれを制御していることや脱核には PI3-kinase による赤芽球の分極化が必要であることが報告されている。最近、申請者は、マウス赤芽球の *in vitro* 脱核系を用いて、血漿タンパク質 Transferrin (Tf) とその受容体 Transferrin Receptor 1 (TfR1) が脱核誘導シグナルとして機能すること、その下流でチロシンキナーゼが機能していることを世界に先駆けて見出した(未発表データ)。Tf はこれまで知られてきた鉄イオンの運搬体としてだけでなく、赤芽球に脱核を誘導するシグナル分子として機能する可能性が示唆された。これまでに、赤芽球の脱核における Tf-TfR1 シグナルの関与を研究した例は申請者の知りうる限り無く、この発見はその先駆けとなる。

赤血球分化に関してはこれまで初代培養細胞を出発材料として用いる事による量的な制限のため微量タンパク質を同定するような研究はなされていない。本研究において、未分化な状態から脱核までの過程を完遂す

ることのできる赤芽球系前駆細胞株が樹立されることにより初代培養細胞の量的制限が克服され、分化に影響を与える低分子化合物と相互作用するタンパク質や分化に伴いリン酸化などの修飾が変化するタンパク質の同定が可能となる。このことは赤血球分化メカニズムのさらなる解明につながるものと予想される。

## 2. 研究の目的

申請者は Tf-TfR1 シグナルの下流で働くチロシンキナーゼの同定を可能とするためにマウス不死化赤芽球系前駆細胞を作製することを考えた。本申請では温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックマウス胚の肝臓より単離した赤芽球系前駆細胞より不死化赤芽球系前駆細胞株を樹立する。得られた不死化赤芽球系前駆細胞株を大量培養したものを出発材料とすることによって、これまで不可能であった微量タンパク質の同定やプロテオーム解析などが可能となる。

## 3. 研究の方法

(1) 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックマウス (tsA58 TG マウス) 胚からの赤芽球系前駆細胞の単離

胎生 14.5 日目のマウス胎児肝からの未分化赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) と分化赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) の単離は Flygare らの方法に準ずる。

tsA58 TG マウスと C57BL6/J マウスを交配した妊娠マウスを購入する。

各胎児から肝臓及び尾の一部を摘出し、氷上においた 2% fetal calf serum (FCS) /PBS 中で保存する。肝臓からは赤芽球系前駆細胞

を単離し、尾は PCR によるジェノタイピングに用いる。

摘出した胎児肝を個別にナイロンメッシュ上ですりつぶし、それぞれ細胞懸濁液を作製する。

lineage 抗原パネル (CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, Ter-119) に対するビオチン標識抗体のカクテルと Anti-Biotin MicroBeads で細胞を磁気標識し、lineage ポジティブ細胞を除去する。その結果、lineage ネガティブ細胞である赤芽球系前駆細胞 (BFU-E 及び CFU-E) を精製することができる。PCR によるジェノタイピングが終了するまで、コンプリート培地 (2U/ml recombinant human erythropoietin (rhEPO), 100ng/ml recombinant murine stem cell factor (rmSCF), 40 ng/ml recombinant human insulin-like growth factor-1 (rhIGF-1), 1 $\mu$ M dexamethasone (DEX), 100 $\mu$ M monothioglycerol (MTG) を含む無血清培地 (StemPro-34, invitrogen) に懸濁し、氷上で静置する。

ジェノタイピングの結果、tsA58 TG マウス胎児肝由来と分かった細胞懸濁液を一つにまとめ、tsA58 TG 赤芽球系前駆細胞懸濁液とする。

#### (2) 単離した赤芽球系前駆細胞への BclxL 発現ベクターの導入

BclxL 発現ベクターの導入には電気穿孔法を用いる。電気穿孔後、細胞を回収し、コンプリート培地中で 16 時間培養する (33 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。

#### (3) コロニーの形成及び単離

BclxL 発現ベクターの導入から 16 時間後、100ng/ml rmSCF, 40 ng/ml rhIGF-1, 1 $\mu$ M DEX, 100 $\mu$ M MTG を含む無血清培地 (StemPro-34) へと培地交換する (33 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。2 週間から 3 週間後、形成されたコロニーを位相差顕微鏡下で単離し、増殖させた後、一部を液体窒素中で保存する。

#### (4) 得られた細胞株の選別

フローサイトメーター (FCM) を用いて赤芽球系前駆細胞マーカー (CD117, CD71) の発現を評価する。CD117+且つ CD71 low 細胞を未分化赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) 株とし、CD117+且つ CD71 high 細胞を分化赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) 株と判断する。

成熟赤芽球マーカー (Ter-119) ミエロイド前駆細胞マーカー (Mac-1, GR-1) リンパ球マーカー (B220) 幹細胞マーカー (CD34, Sca-1) が発現していないことを確認する。

doubling time やサイトカイン要求性などの基本的な性質について調べる。

#### (5) 単離した赤芽球系前駆細胞株の最終分化能の検討

得られた細胞株を 20% FCS, 10U/ml rhEPO, 100 $\mu$ M MTG を含む IMDM 中で 48 時間から 72 時間培養する (39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。

24 時間ごとに細胞を回収し、total RNA を抽出する。赤芽球分化マーカー (GATA1, FoxO3, Klf1,  $\alpha$  and  $\beta$ -globin) の発現を quantitative RT-PCR 法により評価する。

24 時間ごとに成熟赤芽球マーカー (Ter-119) の発現を FCM により解析し、赤芽球の成熟度を評価する。同時に膜透過性 DNA 結合蛍光色素 SYTO16 染色を行うことによ

り成熟赤芽球 (SYT016 medium) 脱核した核 (SYT016 high) 網赤血球 (SYT016 low) の割合を評価する

#### 4. 研究成果

マウス不死化赤芽球系前駆細胞の作製にあたって予備実験としてマウス赤芽球系前駆細胞にヒト BclxL を発現させる条件を検討した。当初の予定通り、ヒト BclxL 発現プラスミドをマウス赤芽球系前駆細胞に電気穿孔法にて導入したところ、ヒト BclxL タンパク質の発現量が低いことが分かった。発現プラスミドのプロモーターを CMV プロモーターから EF-1 $\alpha$  プロモーターに変更したところヒト BclxL タンパク質の発現量は有意に上昇した。マウス赤芽球系前駆細胞での遺伝子発現には EF-1 $\alpha$  プロモーターが有効であることが分かった。

#### 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 3件)

1. 河野竜馬、恩地裕史、鈴木洋司、大久保信孝、満田憲昭、青戸守

The exposure of phosphatidylserine on the surface of mouse erythroblast.

第91回日本生理学会大会

2014年3月16日~2014年3月18日

鹿児島

2. 青戸守、恩地裕史、河野竜馬、鈴木洋司、大久保信孝、辻本賀英、満田憲昭

Transferrin-Transferrin receptor 1 signaling is required for mouse erythroblast enucleation through the mechanism independent of iron uptake.

第37回日本分子生物学会年会

2013年11月25日~2013年11月27日

神戸

3. 満田憲昭、恩地裕史、河野竜馬、青戸守  
赤芽球の脱核におけるトランスフェリン-トランスフェリン受容体1シグナルの役割

第65回日本生理学会中国四国地方会

2013年11月2日~2013年11月3日

岡山

[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

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

青戸 守 (Aoto, Mamoru)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 50372727

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし