

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670188

研究課題名(和文)新規貧血モデルマウスの解析を通じた脱核・赤芽球分化機構の理解とその制御法の確立

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms underlying erythroid differentiation and enucleation by using a novel mouse model of anemia and establishment of strategies to control their regulatory system

研究代表者

岡本 一男 (Okamoto, Kazuo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00436643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新たな血液供給システムとして臍帯血造血幹細胞やiPS細胞を用いた生体外での赤血球分化誘導技術の開発が近年重視されている。そのため、赤血球分化に関わる分子機構の全容を理解することが重要な課題である。本研究では、赤血球形成過程で高く発現するカルシウム結合タンパク質CaBPに着目し、造血細胞特異的CaBP遺伝子欠損マウスを作製・解析することで、赤血球分化におけるCaBPの生理的意義を明らかにした。さらにCaBPによる赤血球分化制御の分子メカニズムを検討し、新たな赤血球分化制御機構を見出した。本研究は、血液再生医療技術の開発基盤に重要な知見を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The necessity of developing the technology of the ex vivo derivation of red blood cells from the cord blood hematopoietic stem cells or iPS cells as an alternative blood supply system has been recently emphasized. It is thus important to get a full picture of the molecular mechanisms underlying red blood cell differentiation in detail. In this study, I focused on a calcium-binding protein, CaBP, which is highly expressed during red blood cell differentiation, and tried to elucidate its physiological role in red blood cells by newly generating the hematopoietic lineage-specific CaBP-deficient mice. Furthermore, I determined the molecular mechanisms of CaBP-mediated regulation of erythroid differentiation. This study may provide the molecular basis for a novel regenerative medical technology for ex vivo manufacture of blood cell products.

研究分野：骨免疫学

キーワード：赤血球 遺伝子改変マウス 貧血

1. 研究開始当初の背景

近年ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) やヒト臍帯血造血幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた再生医療の実現化が重要視される中、こうした多能性/全能性幹細胞を生体外にて個々の造血系細胞へと分化誘導できる培養系を構築することが、血液疾患患者への治療法確立に向けて急務とされている。そのためには、造血幹細胞から各種の免疫細胞の系列への運命決定の過程を解明することが要である。

上記の多能性/全能性幹細胞を用いた医療の中でも、赤血球については、血液型さえ合致すれば必ずしも自己由来である必要がないため、早期の臨床応用が期待されている。しかしながら、赤血球への分化誘導は非常に困難とされている。ヒト ES 細胞、臍帯血造血幹細胞、末梢血中 CD34 陽性幹細胞、ヒト iPS 細胞、これらの細胞全てにおいて、*in vitro* で誘導できる脱核の効率はいまだ低いのが現状である。従って脱核を含めた赤血球分化全般の分子機構に関して理解を深めることは、血液再生医療技術の発展に向けて大変重要な課題である。

申請者は、カルシウム結合タンパク質の一つ (Calcium binding protein: CaBP と称する) が、赤血球形成過程で高く発現が認められることを見出した。しかしながら、これまで CaBP の遺伝子欠損マウスは報告されておらず、赤血球形成のみならず造血細胞系統全般においても、その生理学的意義が明らかにされていない。

2. 研究の目的

本課題では、造血系特異的に CaBP 遺伝子を欠損させたマウスを作製し解析することで、赤血球分化における CaBP の生理的意義を明らかにし、CaBP による赤血球分化制御の分子メカニズムを解明すること、を目指した。

3. 研究の方法

CaBP 遺伝子のエクソン領域が Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟まれた、CaBP floxed マウスを作製し、造血細胞系統で Cre が発現する Cre トランスジェニックマウスと交配させ、造血系特異的に CaBP 遺伝子欠損マウスを作製する。当該マウスにおける赤血球解析を行い、赤血球分化過程における CaBP の生理的意義を明らかにする。さらに、当該モデルマウス由来の前赤芽球及び赤芽球細胞株を用いて、*in vitro* 培養系での CaBP の機能解析および網羅的トランスクリプトーム解析から CaBP が制御する分化制御シグナル経路を検討する。

4. 研究成果

I. 造血細胞特異的 CaBP 遺伝子コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作製および解析
CaBP 遺伝子のエクソン領域が Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟まれた、CaBP floxed マウス

を作製した。まず β -actin Cre トランスジェニック (TG) マウスとの交配により、全身性に片アレルのみ遺伝子欠損させた CaBP^{+/−} マウスを作製した。この CaBP^{+/−} マウスを Vav-iCre (iCre: codon-improved Cre recombinase; Anjana Rao 教授/Harvard Medical School より供与) TG マウスと掛け合わせ、CaBP^{+/−} Vav-iCre マウスを作製した。Vav-iCre マウスは、造血細胞・血管内皮細胞特異的に Cre が発現する TG マウスである。したがって、CaBP^{+/−} Vav-iCre マウスと CaBP^{flx/flx} マウスを交配させることで得られる「CaBP^{flx/−} Vav-iCre マウス」は、造血細胞・血管内皮細胞特異的に CaBP 遺伝子が欠損された CKO マウスとなる。大変興味深いことに、当該 CaBP CKO マウス (CaBP^{flx/−} Vav-iCre マウス) はメンデルの法則に従い出生するものの、生後直後 (0 日齢) で死亡することが認められた。皮膚の明らかな蒼白化が認められ、重度の貧血を呈していることが示唆された。そこで胎仔期における造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスを解析すると、胎生期 E13.5~E14.5 までは造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスは外見上の異常が認められないが、E18.5 齢では皮膚の蒼白化が観察され、胎生期後期より貧血症状を呈するものと示唆された。

II. 造血細胞特異的 CaBP 遺伝子 CKO マウスにおける赤血球解析

生後 0 日齢 (P0) の造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスより血液を採取し、血液一般検査により白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数を解析した。造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスでは、赤血球数の低下、ヘモグロビン量の低下、ヘマトクリット値の低下が認められたが、血小板数には同腹コントロールマウスと差異が認められなかった。さらに血液塗抹標本を作製し、メイギムザ染色による細胞診を行ったところ、赤血球数が著しく減少していることに加え、有核赤芽球が異常に多く認められた。

そこで次に、フローサイトメーターを用いた各種血液細胞・免疫細胞マーカー (CD45, CD71, Ter119, c-kit, CD3 ϵ , B220, CD11b) の発現解析を実施した。造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスの末梢血では、Ter119 陽性 CD71 陽性赤芽球が異常に集積していることが判明した。一方で、CD3 ϵ 陽性 T リンパ球集団、B220 陽性 B リンパ球集団、CD11b 陽性骨髄・単球系細胞集団の割合に関しては、有意な差異が認められなかった。以上より、造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスの出生直後の死亡要因は、重症な貧血に起因するものと示唆された。

III. 成体マウスの骨髄造血における CaBP の重要性

次に、CaBP が胎生期の赤血球形成だけでな

く、成体の骨髓造血においても重要であるか、検討を行った。estrogen receptor と Cre の融合タンパク質を全身性に発現する Cre-ER TG マウス (Jackson laboratory より供与) を、CaBP floxed マウスと交配させることで、Tamoxifen 投与により成体で任意の時期に遺伝子欠損を誘導できる時期特異的 CKO マウスを作製した。3 週齢マウスに Tamoxifen を腹腔注射し、7 週後に末梢血、脾臓、骨髓を解析したところ、有意な貧血は認められなかった。そこで CD45 陽性の造血・免疫系細胞を精製し、Tamoxifen 誘導による Cre 組換えを PCR にて検討したところ、組換え効率が低く、CaBP 遺伝子欠損が誘導されていないことが確認できた。Cre-ER TG マウスを用いた方法では、成体マウスで CaBP 遺伝子を時期特異的に欠損させることが困難であると判断し、次に胎仔肝細胞を用いたキメラマウスの解析を試みた。造血細胞特異的 CaBP 欠損マウスの胎仔肝細胞を用いたキメラマウスを作製し、移入後 7 週目の末梢血を解析したところ、赤血球数の低下、ヘモグロビン量の低下、ヘマトクリット値の著明な低下が認められた。また骨髓及び脾臓には未熟な Ter119 陽性 CD71 陽性赤芽球が多く観察され、赤血球形成に障害が生じていることが確認できた。以上より、成体においても CaBP が赤血球形成に重要であることが明らかとなった。

IV. 前赤芽球を用いた *in vitro* 赤血球分化培養系による検討

前赤芽球を用いた *in vitro* 分化培養系が近年確立されている (Chen *et al.*, *PNAS*, 2009)。当手法に倣い、造血細胞特異的 CaBP 欠損マウス (CaBP^{lox/-} Vav-iCre⁺) ならびに同腹コントロールマウス (CaBP^{lox/+} Vav-iCre⁺) の胎仔肝由来前赤芽球を単離精製し、*in vitro* 分化培養実験を実施した。分化誘導後の細胞集団における c-kit, CD71, Ter119 発現、ならびに細胞の生存率を、フローサイトメトリーにより検討した。当結果と II で認められた *in vivo* の表現型を照合し、CaBP が関与する赤血球分化ステージを特定した。さらに RNA を単離精製し、網羅的トランスクリプトームを実施した。赤芽球分化に関わる種々の分化誘導因子存在下の条件で検討し、CaBP 遺伝子欠損によって生じる赤芽球内の遺伝子発現変動を見出した。以上の結果から、CaBP 下流で発現調節を受ける遺伝子群を抽出し、CaBP が関与する細胞内シグナル伝達経路を検討した。

V. 赤血球分化に必須の CaBP 機能ドメインの特定

マウス赤白血病細胞 (murine erythroleukemia cell :MEL 細胞) を用いて、*in vitro* 赤血球分化培養を実施した。野生型 CaBP 遺伝子 retroviral vector により過剰発現させ、赤血球分化および脱核効率に対する効果を検討した。さらに CRISPR/Cas9 システムにより CaBP 欠損細胞株を樹立した。当該細胞株ならびに胎仔肝由来の

赤芽球前駆細胞を用いた *in vitro* 培養系において、CaBP の各種ドメイン欠損変異体を retroviral vector により過剰発現させ、赤血球分化を検討した。その結果、CaBP の N 末端側の領域が、赤芽球分化制御に重要であることが明らかとなった。

以上より、CaBP は胎生期及び成体マウスにおいて赤血球形成に非常に重要なカルシウム結合タンパク質であり、赤芽球分化を制御するという生理的役割を担っていることが明らかとなった。

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 4 件)

Takako Negishi-Koga, Hans-Jürgen Gober, Eriko Sumiya, Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro Sawa, Ayako Suematsu, Tomomi Suda, Kojiro Sato, Toshiyuki Takai and Hiroshi Takayanagi

Immune complexes regulate bone metabolism through FcRγ signaling

Nature Communications, 6: 6637, 2015

DOI: 10.1038/ncomms.7637 査読有り

Yasunori Omata, Tetsuro Yasui, Jun Hirose, Naohiro Izawa, Yuuki Imai, Takumi Matsumoto, Hironari Masuda, Naoto Tokuyama, Shuichi Tsutsumi, Takanori Fujita, Hisataka Yasuda, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, Koichi Matsuo, Taku Saito, Yuhō Kadono, Hiroyuki Aburatani and Sakae Tanaka

Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis

J Bone Miner Res, 30:869-877, 2015

DOI: 10.1002/jbmr.2418 査読有り

Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima, Masatsugu Oh-hora, Tatsuhiko Kodama, Sakae Tanaka, Jeffrey A. Bluestone and Hiroshi Takayanagi

Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis.

Nature Medicine, 20: 62-8, 2014

DOI: 10.1038/nm.3432 査読有り

Jun-ichi Furusawa, Kazuyo Moro, Yasutaka Motomura, Kazuo Okamoto, Jinfang Zhu, Hiroshi Takayanagi, Masato Kubo and Shigeo Koyasu

Critical Role of p38 and GATA3 in Natural Helper Cell Function.

The Journal of Immunology, 191: 1818-26, 2013

DOI: 10.4049/jimmunol.1300379 査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

岡本 一男、林 幹人、中島 友紀、高柳 広
EF-hand タンパク質を介した破骨細胞分化
と赤血球生成制御

第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7
月 1 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

小野 岳人、岡本 一男、高柳 広 大腿骨
損傷後の骨再生における IL-17 産生 T 細胞
の役割

第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7
月 1 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

小松 紀子、岡本 一男、澤 新一郎、中島 友
紀、田中 栄、高柳 広 Fxop3 陽性 T 細胞
から分化した Th17 細胞の自己免疫性関節
炎における重要性

第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7
月 2 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

Guerrini Matteo、岡本 一男、中島 友紀、
高柳 広 T 細胞上の RANKL は、実験的自
己免疫性脳脊髄炎における T 細胞の中枢神
経組織浸潤に関わる

第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7
月 2 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

寺島 明日香、岡本 一男、中島 友紀、高
柳 広 骨細胞除去マウスの免疫細胞への
影響

第 1 回日本骨免疫会議、2014 年 7 月 4 日、
万国津梁館 (沖縄県・名護市)

Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro
Sawa, Tomoki Nakashima, Masatsugu Oh-hora,
Tatsuhiko Kodama, Sakae Tanaka, Jeffrey A.
Bluestone and Hiroshi Takayanagi Pathogenic
conversion of Fxop3⁺ T cells into Th17 cells in
autoimmune arthritis

5th International Conference on
Osteoimmunology: Interactions of the Immune
and Skeletal Systems, 2014.6.17, Kos (Greece)

Matteo Guerrini, Kazuo Okamoto, Tomoki
Nakashima and Hiroshi Takayanagi
RANKL licenses T lymphocytes to enter into
the central nervous system in experimental
autoimmune encephalomyelitis

5th International Conference on
Osteoimmunology: Interactions of the
Immune and Skeletal Systems, 2014.6.17,
Kos (Greece)

Kazuo Okamoto, Mikihito Hayashi, Tomoki
Nakashima and Hiroshi Takayanagi
Regulation of erythropoiesis by an EF-hand
protein identified as a regulator of
osteoclastogenesis

5th International Conference on
Osteoimmunology: Interactions of the
Immune and Skeletal Systems, 2014.6.17,
Kos (Greece)

Matteo Guerrini, 岡本 一男、中島 友紀、高
柳 広 RANKL expressed by T lymphocyte
is needed for development of experimental
autoimmune encephalomyelitis

第 42 会日本免疫学会学術集会、2013 年
12 月 12 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)

岡本 一男 骨免疫学的視点からみたTh17
細胞の機能

日本小児リウマチ学会、2013年10月12日、ラ
フレ埼玉 (埼玉県・さいたま市)

Matteo Guerrini, 岡本 一男、中島 友紀、
高柳 広 T細胞が発現するRANKLは実
験的自己免疫性脳脊髄炎の病態形成に
重要である

第 34 回日本炎症・再生医学会、2013 年 7
月 2 日、国立京都国際会館 (京都府・京
都市)

〔図書〕(計 2 件)

岡本一男、高柳広 骨の研究最前線『骨
免疫学』HORMONE FRONTIER IN
GYNECOLOGY 2013 年、第 79 号、20
巻、p247-p254

岡本一男、高柳広 T細胞と骨破壊・骨
形成 THE BONE『骨代謝調節の新た
な展開』2013 年、27 巻、p415-p421

〔その他〕

ホームページ等

東京大学 大学院医学系研究科 免疫学
研究室ホームページ:

<http://www.immunol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 一男 (KAZUO OKAMOTO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 00436643

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし