

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670451

研究課題名(和文)末梢血循環核酸を解析する個体老化評価パネルの開発

研究課題名(英文)Evaluation of aging by using cell-free nucleic acid

研究代表者

金倉 謙 (KANAKURA, YUZURU)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20177489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt関連分子soluble Frizzled-related protein (sFRP)-5を過剰発現するマウスを作製した。このマウスでは、骨髄中の共通リンパ球前駆細胞以降の分化が障害される結果、末梢血や脾臓のBリンパ球が著明に減少していた。クロマチン構造調節分子Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1)ローカスの片アレルにTomato遺伝子を導入したレポーターマウスを作製した。造血幹細胞は、Satb1-Tomato陽性・陰性に細分化でき、Tomato陽性分画細胞では造血幹細胞特性が減弱するとともにリンパ球産生能が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：We established transgenic chimera mice to produce soluble Frizzled-related protein (sFRP)-5 under the immunoglobulin-kappa promoter. Overexpression of sFRP-5 inhibited B lymphocyte differentiation after the level of common lymphoid progenitors, leading to massive decrease of B lymphocytes in spleen. On the other hand, sFRP-5 deficient mice showed significant decrease of hematopoietic stem cells (HSC) when the mice were stimulated by estrogen. We established reporter mice, which monitor Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) gene expression. HSC contained two populations divided by SATB1-positivity, and the SATB1-positive cells had less HSC characters and more lymphocyte production than SATB1-negative cells.

Therefore, we successfully clarified in vivo roles of sFRP-5 and SATB1 in the lymphocyte production. Our results provide useful information to understand HSC aging.

研究分野：血液内科

キーワード：老化 造血幹細胞 分化 Wnt クロマチン

### 1. 研究開始当初の背景

細胞老化は、テロメア短縮など必然的な変化(プログラムされたもの)の関与が知られるものの、DNA やミトコンドリアの損傷なども関係することが知られている。また、加齢に伴う細胞機能障害にはエピジェネティック修飾による遺伝子発現異常が深く関与することも報告されている。リンパ造血組織における細胞老化に関しても、加齢に伴う造血幹細胞の変化として(1) 高齢者の骨髄内には CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> の表面形質を示す造血幹細胞分画比率が増加する (2) 造血幹細胞の細胞増殖能が低下する (3) 造血幹細胞からリンパ球への初期分化が障害されている、などが知られている。老化造血幹細胞のリンパ球分化障害は、高齢者における繰り返す誤嚥性肺炎およびワクチン効果不全・自己反応性クローン高出現などの一因と考えられている。我々は、リンパ球初期分化に関わる分子メカニズムの解明を目指して研究を進めてきた。特に、クロマチン構造調節分子 Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1)や Wnt 関連分子 soluble Frizzled-related protein (sFRP)に着目している。

### 2. 研究の目的

造血幹細胞老化を1つのモデルとして、細胞老化と関連する分子の同定を試みる。特に、sFRP による環境変化が造血幹細胞老化に及ぼす影響や造血細胞における SATB1 発現調節機序を明らかにすることで細胞老化に関わる分子メカニズムの解明に取り組む。さらに、血清中に存在する DNA, RNA, miRNA を材料とした個体レベルにおける老化評価パネルの作製に取り組む。

### 3. 研究の方法

(1) Wnt/decornin による環境変化が老化に及ぼすメカニズムの解析

Wnt 関連分子 (Wnt3a, sFRP-1, sFRP-5, Dkk, WIF)に関して、成獣マウスのみ対象蛋白を発現するトランスジェニックキメラマウスを作製する。若年マウス/加齢マウスから造血幹細胞を採取し、培養時の B リンパ球産生能や移植時の骨髄再構築能の変化を解析する。

(2) SATB1 レポーターマウスを用いた SATB1 発現細胞の解析

SATB1 ローカスの片アレルに赤色蛍光蛋白質 RFP をノックインした SATB1-RFP レポーターマウスを作製し、SATB1 陽性細胞の発生部位を解析する。また、SATB1-RFP マウスを用いて、造血幹細胞・Lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP)・common lymphoid progenitor (CLP)各分画における SATB1-RFP 発現変化を若年/老齢マウス間で比較を行なう。

(3) 末梢血の解析に基づく個体老化評価パネルの作製

血清から精製した DNA や RNA を材料として、

効果関連候補分子の発現を解析する。

### 4. 研究成果

老化に伴うリンパ球産生抑制への関与を *in vitro* 実験系で提唱してきた sFRP と SATB1 について生体内での役割を明らかにすることができた。

(1) Wnt 関連分子 sFRP

sFRP-5 を免疫グロブリン kappa 鎖プロモーター下流で発現する(成熟 B リンパ球が産生する)トランスジェニックキメラマウスを作製した。このマウスでは、sFRP-5 過剰により、末梢血中(図1)・脾臓(図2)の B リンパ球は著明に減少した。骨髄中の B リンパ球前駆細胞では、共通リンパ球前駆細胞以降の分化段階の細胞が著明に減少していた。

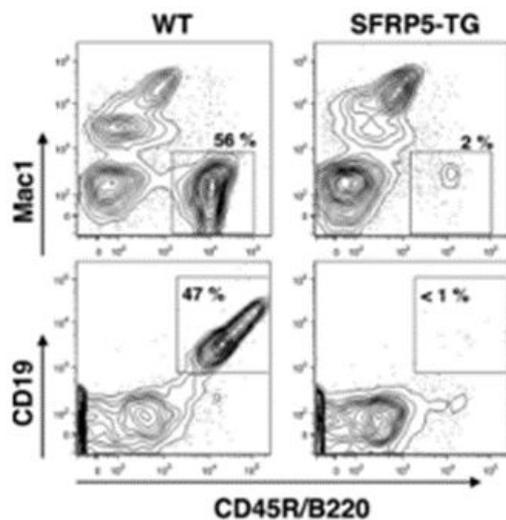


図1 sFRP-5トランスジェニックマウスの末梢血血球数

5~7週齢マウスの末梢血を解析した。

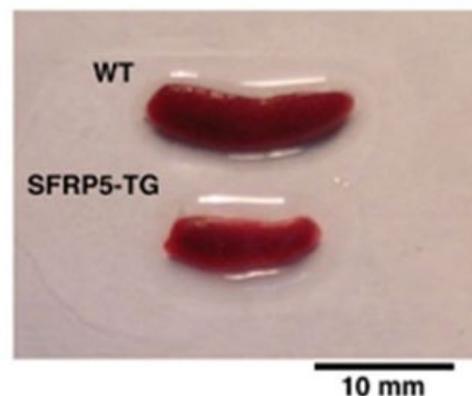


図2 sFRP-5トランスジェニックマウスにおける脾臓サイズの縮小

sFRP-5 欠損マウスでは、特にエストロゲン存在下において、造血幹細胞と造血前駆細胞分画が著明に減少していた(図3)。以上より、sFRP-5 は造血幹細胞レベルには必須であるが、高濃度の sFRP-5 は B リンパ球産生を抑制することが明らかになった。

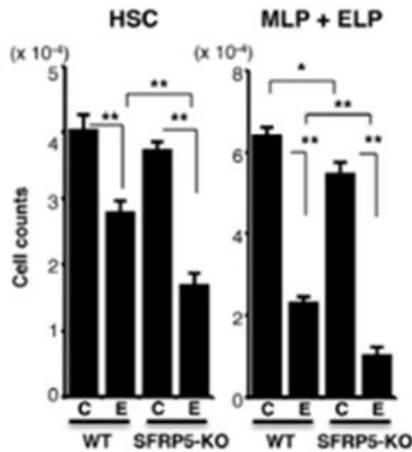


図3 sFRP-5欠損マウスにおけるエストロゲン存在下(E)での造血幹/前駆細胞数

## (2) クロマチン構造調節分子 SATB1

Satb1 locus の片アレルに赤色蛍光タンパク質(Tomato)を導入した ES 細胞を作製し、キメラマウスを作製した(図4)。このマウスの細胞は SATB1 発現を Tomato 発現として捉えることができる。造血幹細胞は、Satb1-Tomato 陽性・陰性分画に細分化でき、cell-sorting により各々の分画を高純度で回収できた。Tomato 陽性分画細胞では造血幹細胞特性が減弱するとともにリンパ球産生能が亢進していた。現在、各分画の遺伝子発現・分化能力などの性質を、RNA-seq・分化誘導培養・放射線照射マウスへの移植実験等により比較検討中である。また、リンパ球分化に伴う SATB1 発現を解析した。B リンパ球系への分化について蛍光パターンを解析したところ、造血幹細胞から共通リンパ球前駆細胞までは段階的に Satb1-Tomato の蛍光レベルが上昇し、その後骨髄内分化の進行と並行して一旦 WT マウスと同レベルまで低下した蛍光強度が、特定の分化段階において再上昇する特徴的な変動パターンを示すことが判明した。

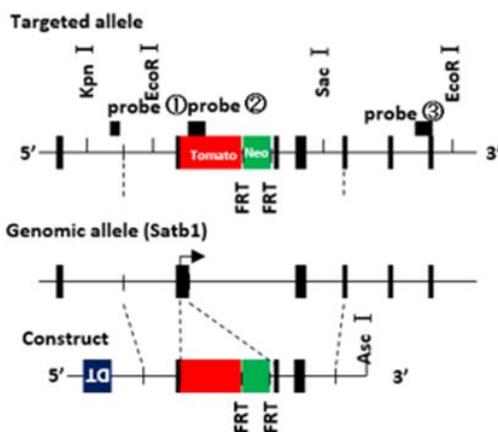


図4 Satb1-Tomatoレポーターマウス

条件付きノックアウトマウスを Tie2 プロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配し、造血細胞特異的な SATB1 欠損状態を誘導したマウスを作製した(図5)。そのマウスの血球においては、SATB1 の発現がほぼ完全にノックアウトできていることが genomic PCR、western blotting 両方により確認できており、このマウスを解析することにより、従来は不可能であった成獣マウスにおける解析が可能になると考えられる。

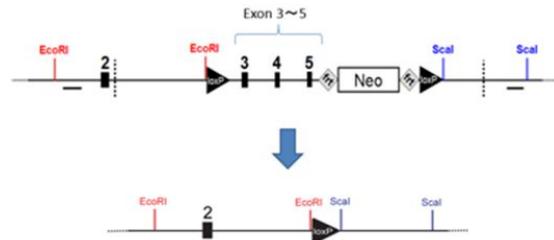


図5 Satb1コンディショナルノックアウトマウス

(3) ヒト血清を用いた老化関連遺伝子発現 ヒト血清を用いて老化関連遺伝子発現を解析することを目的として、予備的検討ではあるが、血清中の cell-free nucleic acid(DNA, RNA)の精製および PCR に成功しており、予定している解析実験系を確立できた。今後、候補分子の発現量を解析していく。

## 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 6 件)

Yokota T, Kanakura Y. Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int J Hematol* 100:238-245, 2014 doi: 10.1007/s12185-014-1602-2、査読: 有  
横田貴史, 金倉 讓, リンパ球への分化と転写制御、臨床免疫・アレルギー科 62:227-232, 2014、査読: 無

Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Orirani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. The Satb1 Protein Directs Hematopoietic Stem Cell Differentiation toward Lymphoid Lineages. *Immunity* 38:1105-1115, 2013 doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.014、査読: 有

Yokota T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Ichii M, Orirani K, Kanakura Y. Complementary regulation of early B-lymphoid differentiation by genetic and epigenetic mechanisms. *Int J*

Hematol 98:382-389, 2013 doi:  
10.1007/s12185-013-1424-7、査読：有  
織谷健司、B リンパ球初期分化制御機構  
とその破綻. 臨床免疫・アレルギー科  
59:603-610,2013、査読：無  
織谷健司、老化に伴うリンパ球産生障害.  
臨床免疫・アレルギー科  
60:535-541,2013、査読：無

齊藤 則充(SAITOH, Norimitsu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・  
特任助教(常勤)  
研究者番号：30597399  
(平成26年8月まで分担者として参画)

〔学会発表〕(計 3 件)

Doi Y, Yokota T, Tanimura A, Saitoh N,  
Ichii M, Ezo S, Shibayama H, Oritani  
K, Kanakura Y、Functional analysis of  
a chromatin-remodeling protein in  
early lymphoid differentiation、第76  
回日本血液学会学術集会、2014.11.1、大  
阪国際会議場(大阪府、大阪市)

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi  
T, Doi Y, Ichii M, Tomizuka K, Yamawaki  
K, Shimono A, Kanakura Y、SFRP5  
inhibits early B-lymphopoiesis and  
modulates estrogen-induced changes in  
the immune system、第75回日本血液学  
会学術集会、2013.10.11、ロイトン札幌・  
さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北  
海道、札幌市)

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi  
T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Okuzaki  
D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M,  
Shimono A, Morii E, Kincade PW,  
Kanakura Y、SFRP5 inhibits early stages  
of B-cell differentiation and  
modulates estrogen-related changes in  
the immune system、The American Society  
of Hematology 55th Annual Meeting、  
2013.12.3、New Orleans, LA, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金倉 讓 (KANAKURA, Yuzuru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70324762

一井 倫子 (ICHI, Michiko)  
大阪大学・大学院医学系研究科・  
寄附講座助教  
研究者番号：30633010