

## 末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に 関する研究

所属 国立感染症研究所 免疫部  
研究者 葛西 正孝

研究要旨 遺伝子欠損マウスの異常を解析することによって、Translin遺伝子が幼若リンパ系細胞と骨髄系細胞の分化成熟機構に重要な機能を有していることを証明した。また、幼年期における造血では末梢血が深く関与していることを示す実験事実を始めて明らかにした。本研究成果は造血機構の解明と制御因子の発見につながり、最終的には移植治療の発展と医薬品の開発に発展する可能性を示唆している。

分担研究者

第一製薬(株)東京研究開発センター  
創薬第三研究所 高子 徹

### A. 研究目的

血液細胞は、骨髄中に存在する造血幹細胞という共通の母細胞から造られる。造血幹細胞は、自らを複製できる自己複製能と赤血球、白血球、血小板などの成熟血液細胞を造る能力を兼ね備えた細胞と定義されている。従来、造血幹細胞は概念的なものとして考えられていたが、その実体は単一の細胞ではなく、多能性幹細胞から前駆細胞に至るまで種々の分化段階にある細胞集団であることが次第に明らかにされている。しかし、造血幹細胞の自己複製と各分化段階への振り分けや前駆細胞の増殖に必要な分裂機構の詳細は不明であり、遺伝子治療を指向した将来の研究課題として残されている。

我々は、細胞分裂期の DNA 複製と染色体

分配に係わる DNA 結合蛋白、Translin (TSN) 遺伝子を発見し、その cDNA の単離と遺伝子構造を明らかにした (Nature Genetics 1995)。さらに、Translin 遺伝子欠損マウス (TSN-KO) の異常を解析した結果、造血系細胞の分化増殖に重篤な障害が認められた。本研究では、Translin の機能を解析するために、TSN-KO マウスにおけるリンパ系細胞と骨髄系細胞の分化成熟機構の破綻について詳細な解析をおこなった。

### B. 研究方法

#### Translin ノックアウトマウスの作製

Translin キメラマウス作製のために、Translin 遺伝子 (11 kb) を含むターゲティングベクターを 129 系統マウス由来 ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。次に、遺伝子欠損 ES 細胞をマウス初期胚に導入し、偽妊娠マウスに移植した。

作製されたキメラマウス雄と C57BL/6 マウス雌をかけて得られた F1 マウスから、導入

した ES 細胞がキメラ個体内で生殖系列に分化したマウスを選択した。ホモ遺伝子欠損マウスは、F1 同士のかけあわせで得られた。遺伝子組み換え体の解析は、Southern, Northern, Western ブロットティング法で確認した。なお、F2 マウスの遺伝子組み換え体のタイピングは、薬剤耐性遺伝子(Neo)と Translin 遺伝子の 3', 5' プライマーを用いた PCR 法で行った。

#### 定量的 RT-PCR 解析

末梢血から全 RNA を抽出後、reverse transcriptase によって cDNA を合成した。定量的 RT-PCR 解析は、cDNA を鋳型として LC Fast Start DNA master SYBR Green I kit を用いて行った。E2A(E47), EBF, Pax-5 遺伝子の増幅には特異的プライマーを用い、beta-Actin を標準として補正を行った。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護や研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)に関わる状況においては十分な配慮をおこなう。動物愛護上、実験動物に対しては苦痛を和らげる等、倫理面への十分な配慮をおこなう。

#### C. 研究結果

Translin 遺伝子欠損マウスを作製して異常を観察した。その結果、幼年期の遺伝子欠損マウスでは末梢血中の白血球数が激減していることを見出した。この現象は末梢血Bリンパ球が未分化な状態で停止して増殖が阻害されていることに因るものであった。その表現型を解析した結果、TSN-KOマウスでは末梢血中の成熟Bリンパ球が幼若リンパ球(B220-, IL-7R+, CD43+)の段階で分化を停止している

ことを見いだした。また、免疫グロブリン遺伝子の組み換え初期に起こるD-J遺伝子再構成とBリンパ球分化因子、Pax-5の発現が顕著に低下していた。リンパ球前駆細胞(CLP)は、転写因子、E2A, EBF, Pax-5 によって分化することが知られている。ちなみに、E2A, EBF遺伝子を欠損したマウスにおけるリンパ球の表現型は、さらに分化の進んだB220+, IL-7R+, CD4+である。実際、定量的RT-PCR解析によってTSN-KOマウス末梢血中のE2A, EBF, Pax-5のmRNAの発現は低下していた。従って、CLPの分化過程における極めて初期の段階でTranslin遺伝子が深く関わっていることを示唆している。また、生後1年を経過したTSN-KOマウス骨髄では幼若骨髄系細胞が激減し、末梢血では再びBリンパ球の分化停止が認められた。さらに進行すると、骨髄の造血能は廃絶し、脾臓肥大を伴う髄外造血が観察された。以上の結果を総合すると、Translin遺伝子は幼若リンパ系細胞と骨髄系細胞の分化成熟機構に重要な役割を果たしていると結論することができる(図1)。

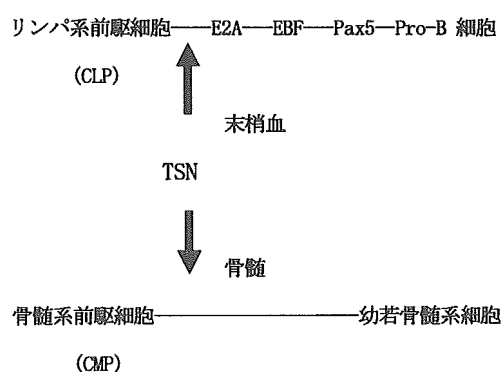


図1 幼若リンパ系細胞と骨髄系細胞の分化成熟機構におけるTSN蛋白の役割

#### D. 考察

Translin遺伝子欠損マウスを用いた解析から、Translin遺伝子は末梢血において幼若リンパ系細胞、骨髄において幼若骨髄系細胞の分化成熟機構にそれぞれ重要な役割を果たしていると結論することができる。また、幼年期における造血では骨髄のみならず末梢血も重要な役割を果たしていることを強く示唆している。このように、Translin蛋白の機能解析を中心にした本研究は、今後大きく発展するものと期待される。

#### E. 結論

Translin遺伝子欠損マウス (TSN-KO) を作製し、その表現型を詳細に解析した結果、TSN-KOマウスでは末梢血中の成熟Bリンパ球が幼若リンパ球 (B220<sup>-</sup>, IL-7R<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>) の段階で分化を停止していることを見いだした。さらに、免疫グロブリン遺伝子の組み換え初期に起こる (Igh) D-J遺伝子再構成とBリンパ球分化因子、Pax-5の発現が顕著に低下していた。造血幹細胞 (HSC) に由来するリンパ球前駆細胞 (CLP) は、E2A, EBF, Pax5 という転写因子によってPro-B細胞へ分化が進行することが知られている。また、E2A, EBF遺伝子を欠損したマウスで分化を停止するリンパ球の表現型はさらに分化の進んだB220<sup>+</sup>, IL-7R<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>である。実際、定量的RT-PCR解析によると、TSN-KOマウス末梢血中のE2A, EBF, Pax5の発現は著しく低下していた。以上の結果は、CLPの分化過程における極めて初期の段階でTranslin遺伝子が深く関わっていることを示唆している。さらに、生後1年を経過したTSN-KOマウス骨髄では、幼若骨髄系細胞が激減し、末梢血では再びBリンパ球の分化停止が認められた。このように、遺伝子欠損マウ

スを用いた解析から、Translin遺伝子は末梢血において幼若リンパ系細胞、骨髄において幼若骨髄系細胞の分化成熟機構に係わっていると結論することができる。また、幼年期における造血では骨髄のみならず末梢血も重要な役割を果たしていることを強く示唆している。今後、末梢血と骨髄に存在する造血幹細胞の関連が明らかにされなければならない。本研究成果は造血機構の解明と様々な因子の発見につながり、最終的には移植治療の発展と医薬品の開発に発展する可能性を示している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kasai, M.

A Significant Role for the Peripheral Blood in Juvenile Hematopoiesis

**Molecular Biology of the Cell (In press 2005)**

Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto S, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.

A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice.

**Int Immunol. 16, 1423-1430 (2004)**

Sugiura, I, Sasaki, C, Hasegawa, T, Kohno, Sugio, T, Moriyama, H, Kasai, M and Matsuzaki, T

Structure of human Translin at 2.2Å resolution

**Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60, 674-679 (2004)**

Ishida, R., Okado, H., Sato, H., Shionoiri, C., Aoki, K., and Kasai, M.

A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division.

**FEBS Lett. 525, 105 (2002)**

VanLoock, M., Yu, X., Kasai, M., and Egelman, E.

Electron Microscopic Studies of the Translin Octameric Ring

**J. Struct. Biol. 135, 58-66 (2001)**

Fuks, F., Burgers, W., Godin, N., Kasai, M., and Kouzarides T.

Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription.

**EMBO J 20, 2536-2544 (2001)**

Hosaka T, Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Yamamoto H, Nakamata T, Tsuboyama T, Oka M, Kasai M, Sasaki MS, Nakamura T, Toguchida J

Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;6).

**Oncogene 19, 5821-5825 (2000)**

Meng, G, Inazawa, J., Ishida, R., Tokura, K., Nakahara, K., Aoki, K., and Kasai, M.

Genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding TRAX, a Translin-associated factor X.

**J. Hum. Genet. 45, 305-308 (2000)**

Meng, G, Inazawa J., Ishida, R., Tokura, K., Nakahara, K., Aoki, K. & Kasai, M.

Structural analysis of the gene encoding RP58, a sequence-specific transrepressor associated with heterochromatin.

**Gene 242, 59-64 (2000)**

Endo J, Toyama-Sorimachi N, Taya C, Kuramochi-Miyagawa S, Nagata K, Kuida K, Takashi T, Yonekawa H, Yoshizawa Y, Miyasaka N, Karasuyama H

Deficiency of a STE20/PAK family kinase LOK leads

to the acceleration of LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes.

**FEBS Lett. 468, 234-238 (2000)**

## 2. 学会発表

Okado,H, Kawano,H, Matsuda, J, Terashima,T, and Kasai,M.

Transcriptional repressor, RP58, is essential for development of the cortical layer formation and the reciprocal connectivity between cortex and thalamus

Annual Meeting of Japanese Molecular Biology Society (Symposium), Kobe, Dec, 2004

## G. 知的財産権の出願登録状況

### 1. 特許取得

国際特許 特願 2002-096216

【発明の名称】 トランスリン結晶およびトランスリンのセレノメチオン誘導体結晶

国際特許 特願 2002-236139

【発明の名称】 トランスリンの3次元構造座標、及び3次元構造座標の使用