

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に關与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	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	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩	…… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江	…… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広	…… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子	…… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦	…… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利	…… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄	…… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗	…… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英	…… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓	…… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ	…… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子	…… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一	…… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士	…… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子	…… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒	…… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文	…… 576

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 リンパ球減少症や骨髄不全症を示す造血疾患モデル動物を用いて、造血に関する基盤的研究をおこない、造血幹細胞の自己増殖と分化の振り分けを制御する因子を明らかにした。本研究の成果は、免疫不全症の再生医療と医薬品の開発に発展する可能性を示している。

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

生体を防御する免疫機構が破綻した状態は免疫不全症と呼ばれ、再生不良性貧血(aplastic anemia)、骨髄線維症(myelofibrosis)、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome、MDS)などの血液難病が含まれる。これらの疾病で観察されるリンパ球減少症(lymphocytopenia)と骨髄不全症(bone marrow failure)は、薬物(抗がん剤や免疫抑制剤)、放射線療法、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)による感染等の外因性要因(続発性免疫不全)と造血細胞の内因的欠損(先天性免疫不全)によって分類される。しかし、それぞれの病因と発症機構の詳細は不明な点が多く、疾患モデル動物実験を基盤にした研究の必要性が高まっている。

主任研究者らは、DNA結合蛋白、Translinの遺伝子欠損マウス(TSN-K0)に認められる造血系の異常を詳細に観察した。その結果、幼年期におけるTSN-K0マウスの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、末梢血リンパ球の成熟が未分化な状態で停止していることに因るものであった。また、老齡TSN-K0マウスが重篤な骨髄不全に陥ることも明らかとなり、造血系におけるTranslin遺伝子の重要性が示された。本研究の目的は、造血疾患モデルマウスを用いて、リンパ球減少症と骨髄不全症の発症に係わる因子の解明と医薬品開発の基盤技術を確立することである。

B. 研究方法

遺伝子欠損マウスの作製

Translin キメラマウス作製のために、Translin 遺伝子(11 kb)を含むターゲッ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。

遺伝子欠損マウスのコンジェニック化

Translin遺伝子欠損マウス(TSN-KO)をC57BL/6
マウスに戻し交配を繰り返して、遺伝的背景が
同じコンジェニックマウスに置き換えた。これ
によって、ヘテロ同士の掛け合わせで得られる
25%のホモに依存していた従来の研究と比較
して、遺伝的背景が均一なホモマウスを安定供
給することが可能になり、本研究のスピードア
ップと一層の進展が期待できる。

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)
に係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

我々は、DNA結合蛋白Translin蛋白の機能の詳細

を明らかにするために、Translin遺伝子欠損マ
ウス(TSN-KO)を作製してその表現型を詳細に解
析し、以下の結果を得ることが出来た。

(1) 末梢血リンパ球の減少

その結果、幼年期におけるTSN-KOマウスの末
梢血中の成熟白血球数が激減していることを見
いだした。この現象は、末梢血リンパ球の成
熟が停止していることに因るものであった。
すなわち、TSN-KOマウスでは末梢血中の成熟Bリ
ンパ球が減少し、幼若リンパ球(B220-, IL-7R+, C
D43+)の分化成熟が停止していることがFACS解
析で明らかとなった。因みに、リンパ球前駆
細胞に不可欠な転写因子、E2A, EBF, Pax-5 遺
伝子を欠損したマウスで分裂を停止したリンパ
球の表現型は、さらに分化の進んだB220+, IL-7R
+, CD43+である。従って、Translinは、造血機
構の極めて初期の段階で深く係わり、造血幹細
胞から前駆細胞への分化振り分け機構に不可欠
の因子であると結論できる。

(2) 幼若骨髄球の減少による骨髄不全

TSN-KOマウスに認められるもう一つの異常は、
加齢と共に骨髄の造血能が低下し、生後1年を経
過すると骨髄の幼若骨髄系細胞が激減すること
である。さらに進行すると、骨髄の造血能は
廃絶し、脾臓や肝臓の肥大を伴う髄外造血へ進
行した。この現象を明らかにするため、骨髄
系細胞の分化に不可欠なPU.1遺伝子の発現をRT
-PCR法で解析したが、活性に変化は認められな
かった。しかし、basic helix-loop-helix (b
HLH) 型転写因子、E2Aとそれに特異的に結合す
る蛋白、TAL1の発現が低下していた。E2AとTA
L1の複合体形成は、新たなDNA結合ドメインを形
成し、造血幹細胞の自己複製や前駆細胞への分
化に不可欠な遺伝子の発現を調節することを示

唆している。

(3) 造血幹細胞の自己複製

幼若骨髄細胞が消失したTSN-KOマウスの骨髄では、興味深いことに造血幹細胞(Lin⁻ Sca1⁺ c-kit⁺)が著しく増加していた。そこで、骨髄不全を引き起こしたTSN-KOマウスの大腿骨を病理学的に解析すると、本来、骨端に存在する筈の海綿骨が大腿骨の全面に広がっていた。更に詳細に調べると、海綿骨の周辺には骨芽細胞が多く認められた。骨芽細胞は、造血幹細胞形成に不可欠な微小環境(Niche)本体と考えられるので、TSN-KOマウスの骨髄で見られる造血幹細胞の増加と符合する事実といえる。

(4) 造血幹細胞の自己複製と分化はNiche依存

TSN-KOマウスの骨髄における造血幹細胞の自己複製と分化の異常が幹細胞由来か微小環境由来かを明らかにするために、reciprocalな骨髄移植実験を行った。その結果、上記異常は幹細胞ではなく、それを取り巻く微小環境に因るものであった。以上の結果を総合すると、Translin遺伝子は造血幹細胞の自己複製と分化成熟機構の振り分けに微小環境を介して重要な役割を果たしている結論することができる。

D. 考察

遺伝子治療や人工臓器開発などが含まれる再生医学の分野は、血液幹細胞が多分化能を備えていることが明らかになったことから近年大きく発展し始めている。特に、造血細胞(腹側中胚葉から由来)と血管内皮細胞の共通祖先の実体が最近になって解明されたことは、免疫系、血液循環系、内分泌系などの垣根を越えて多くの研究者の興味を引き、この分野への参入を可能にしたといえる。

一方、自己複製することが出来る造血幹細胞の由来や移動、胎生期と成体期における相違点、分化方向が決定した前駆細胞への振り分け機構等、数多くの基本的な問題点が未解決のまま残されていることも事実である。

本研究では、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、末梢血における幼若リンパ系細胞の分化だけでなく骨髄幹細胞の自己複製と分化振り分け機構にTranslin遺伝子が重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、骨髄不全を引き起こす加齢の実体が解明されれば、本研究はさらに大きく発展するものと期待される。

E. 結論

TSN-KOマウスは、リンパ系細胞のみならず骨髄系細胞の分化成熟機構にも異常を示すことが明らかにされた。特に造血幹細胞の分化と自己複製のバランスが崩壊して自己複製の方へ傾倒したと解釈することができる。したがって、TSN-KOマウスはヒトの免疫不全で観察されるリンパ球減少症と骨髄不全症のモデル実験動物として有用性が高いと考えられる。このように、TSN-KOマウスを用いた本研究から、Translin遺伝子が幹細胞の自己複製やリンパ系及び骨髄系前駆細胞への振り分け機構に係わる制御因子として重要な役割を果たしている結論することができる。今後、Translin蛋白と骨芽細胞で代表されるNiche及び造血幹細胞の関連が明らかにされなければならない。また、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

Ohtaka- Maruyama, C., Miwa, A., Kawano, H., Kasai, M. Okado, H,

Spatial and Temporal Expression of RP58, a Novel Zinc Finger Transcriptional Repressor in Mouse Brain

Journal of Comparative Neurology (In press 2007)

Kasai, M., Fukuda, Y and Ishida, R.

A gene-targeted mouse model for bone marrow failure syndrome

Blood 106 140b (2005)

Ohnishi, K, Sakaguchi, M, Kaji, T, Akagawa, K, Taniyama, T, Kasai, M, et al.

Immunological Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Monoclonal Antibodies Jpn. J. Infect. Dis. 58, 88-94 (2005)

Kasai, M.

A Significant Role for the Peripheral Blood in Juvenile Hematopoiesis

Molecular Biology of the Cell 15, 340a (2004)

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)

2. 学会発表

Kasai, M, Fukuda, Y, and Ishida, R.

Negative regulation of stem cell self-renewal and osteoblast formation

2007 Keystone Symposia Conference

(Stem Cell Interactions with their Microenvironmental Niche)

Keystone, Colorado, USA, March 2007

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

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社