

保存さい帯血の有効利用のための技術開発

広島大学 原爆放射線医科学研究所

准教授 安永 晋一郎

はじめに

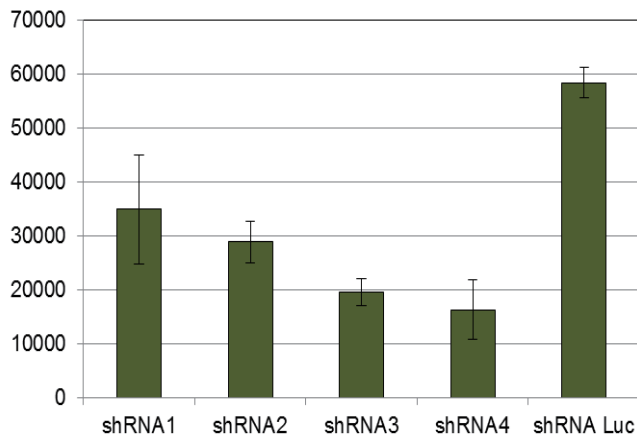
がん化学療法技術の進歩により、がん化学療法後の長期生存が可能になった。しかし、このような長期生存者においては、高い確率で二次性の骨髄異形成症候群や白血病を発症する。その根治的な治療には造血幹細胞移植療法を行なう必要がある。近年、造血幹細胞の供給源としてさい帯血が使用可能となり、比較的高年齢の患者に対しても造血幹細胞移植が適応されるケースが激増している。しかしながら、さい帯血バンクの保存さい帯血のうち約9割は、造血幹細胞数が不足しているため移植療法に供することができない。そこで、申請者は、保存さい帯血の有効利用のために、保存さい帯血中の少量の造血幹細胞を体外で増幅し、それを造血幹細胞移植療法に提供する技術を開発することが必要であると考えた。

報告者は、造血幹細胞制御の二大内的因子として位置づけられるポリコーム複合体1とHOXA9/HOXB4が、ともにDNA複製制御因子であり幹細胞未分化性維持因子でもあるGemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして機能することを証明し、造血幹細胞活性を支持する上でGemininの代謝制御が極めて重要な働きを持つことを明らかにした。そこで、申請者は、Gemininの発現や機能を制御することで、造血幹細胞の体外での増幅が可能になるのではないかと考えた。

結 果

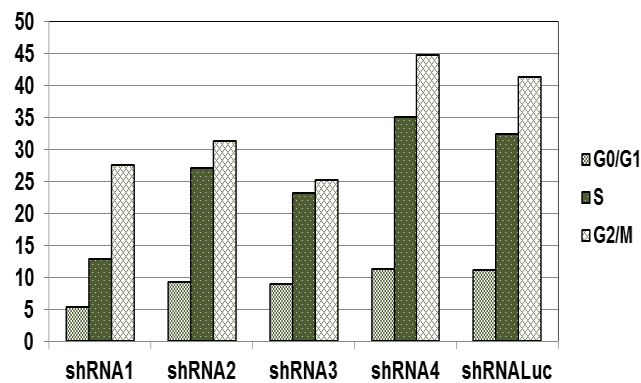
Gemininに対する4種類のshRNA (shRNA1~4) をそれぞれ導入することによって、骨髄(BM)細胞においてGeminin mRNAを低下させることができるかどうかをリアルタイムRT-PCR法を用いて定量解析した(第1図)。コントロールベクターとして、他の遺伝子の発現に影響がないことが確認されているルシフェラーゼに対するshRNA (shRNA Luc) を用いた。その結果、Gemininに対するすべてのshRNAの導入においてshRNA Lucの導入よりもGeminin mRNA量が低下していることが示された。

次にGeminin mRNAの低下に伴い、Gemininのタンパク質発現量も低下しているかを検証した。各細胞周期でのGemininタンパク質の発現量をフローサイトメーターで解析した。BM細胞にshRNA1, 2及び3発現レトロウィルスを感染させると各細胞周期におけるGemininタンパク質の発現量が低下することがわかった(第2図)。また、shRNA1, 2及び3を感染させたBM細胞では、Gemininのタンパク質発現量の低下に伴いS期の細胞分画が増加した(第3図)。



第1図 BM細胞におけるGemininに対するshRNAのmRNA発現量への影響

各shRNA発現レトロウィルスを感染させたBM細胞をリアルタイムRT-PCR法により解析した。発現量は10ng total RNAあたりのコピー数で示した。また、そのコピー数はGapdh mRNAの発現量により標準化した。

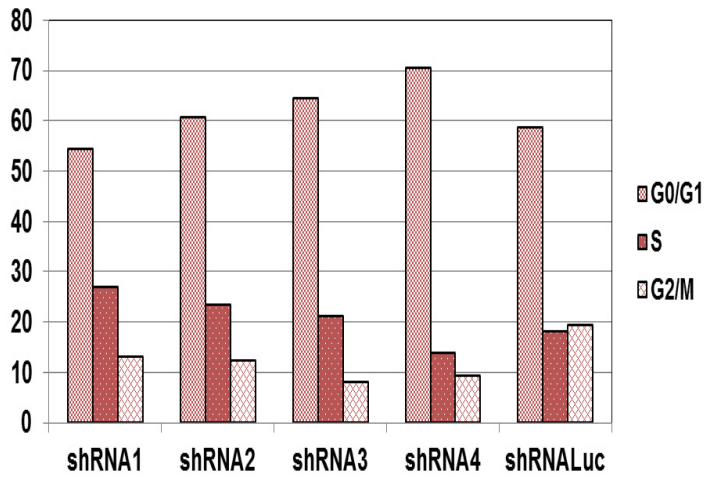


第2図 BM細胞における各shRNA導入のGemininタンパク質発現への影響

各shRNA発現レトロウィルスを感染させたBM細胞におけるGemininタンパク質発現と細胞周期をフローサイトメーターで解析した。各細胞周期におけるGemininタンパク質の発現量を輝度の相乗平均にて示した

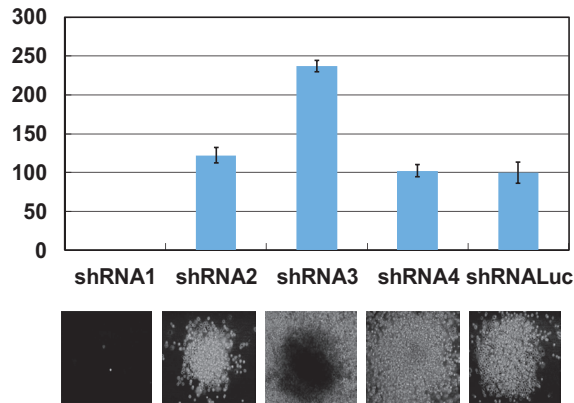
一方でshRNA4を発現させても、Gemininタンパク質量は減少せずS期にある細胞分画も増加しなかった。

さらに、どのshRNAが造血能の活性化に効果的であるかを調べるために、造血前駆細胞活性を評価する方法の一つであるコロニーアッセイを行った。その結果、shRNA3を導入した場合、コロニー数はコントロールと比較して約2倍に上昇した（第4図）。また、蛍光顕微鏡下にてコロニーを観察すると、shRNA3においてはネガティブコントロールと比べ、著しく大きなコロニー形成が観察された（第4図）。一方で、shRNA1を導入してもコロニー形成は全く観察されなかった。shRNA1ではGemininタンパク質の発現が他のshRNAと比べ低いので（第2図）、DNAの再複製が起こることでチェックポイントが誘導されて細胞増殖が停止し、コロニーが形成されなかった可能性が考えられた。続いてshRNA3導入が造血前駆細胞活性を誘導することが、確かにGemininの発現抑制によって引き起こされた現象であることを検証するために、shRNA3を導入したBM細胞にGemininを重導入してコロニーアッセイを行った。その結果、shRNA3の導入により約2倍まで上昇したコロニー形成能は、Gemininを重導入することによりネガティブコントロールと同程度まで低下した（第5図）。これらの結果から、shRNA3によりGemininの発現を抑制することが造血前駆細胞活性を上昇させたことが明らかになった。



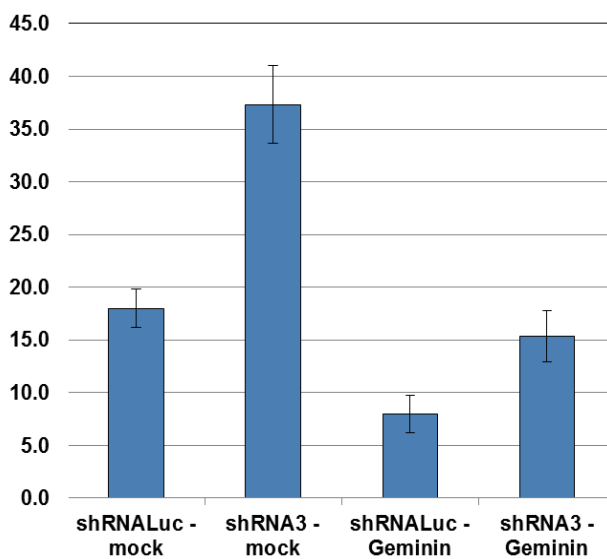
第3図 BM細胞における各shRNA導入の細胞周期への影響

各shRNA発現レトロウイルスを感染させたBM細胞におけるGemininタンパク質発現と細胞周期をフローサイトメーターで解析した。各細胞周期にある細胞の割合を示した。



第4図 各shRNA発現レトロウイルスを感染させたBM細胞によるコロニーアッセイ

各shRNA発現レトロウイルスベクターをBM細胞に感染させ、コロニーアッセイを行った。顕微鏡下で計測したコロニー数(上) 蛍光顕微鏡下で撮影した代表的なコロニーの形態(下)



第5図 shRNA3に加えGemininを重導入することによる造血前駆細胞活性への影響

BM細胞にそれぞれのshRNA発現レトロウイルスベクターを導入し、2日後にGeminin発現レトロウイルスベクター及び空ベクター(mock)を重導入してから、コロニーアッセイを行った。

考 察

報告者は、造血幹細胞を制御する二大内的因子として位置付けられるポリコーム複合体1とHoxが、それぞれGemininの分解制御を介して造血幹細胞の活性を支持していることを明らかにした。さらに、造血幹細胞では多くの細胞がG₀期にありながらGemininの発現は高く、造血前駆細胞になるとGemininの発現は低下し、活発な増殖活性と分化が誘導される。このことはG₀/G₁期におけるGemininの発現量の変化が造血幹細胞から造血前駆細胞を誘導し、Gemininが造血を開始させる制御因子として機能している可能性を示唆している。そこで、本研究ではこのGemininに注目して、発現量を制御することで造血活性制御におけるGemininの分子機能の解明を試みた。そして、BM細胞において4種類のshRNA発現レトロウイルスベクターを用いて恒常的にGemininのタンパク質の発現量を抑制できることが分かった。特に、その中の一つのshRNA3を導入することは下位造血前駆細胞のみならず、より上位の造血前駆細胞の活性を増幅でき、Gemininが造血前駆細胞の活性制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。Gemininのタンパク質発現を最も抑制するshRNA1の導入は造血活性を欠損させる結果となったが、これはDNAの再複製を抑制しているGemininを過剰に抑制することでDNA再複製が起こり、チェックポイントが引かれて細胞増殖ができなくなったためではないかと考えられた。つまり、造血前駆細胞を活性化する最適なGemininの発現量があり、shRNA3による発現抑制が最もその量に近い可能性が考えられた。さらに、shRNA3を導入したBM細胞を用いて骨髄再構築能を評価し、shRNA3によるGemininの発現抑制が造血幹細胞の活性を上昇させるかどうかを現在検証している。また、造血幹細胞の自己複製や分化増殖におけるGemininの分子機能や発現動態を明らかにすることを目的に、生細胞内でGemininの発現動態を詳細に観察することができる実験系を確立するためにGeminin遺伝子の終始コドン直前にEYFP発現遺伝子をノックインしたマウスを確立し、Gemininの発現を可視化することに成功している。そのノックインマウスと、本研究で確立したGemininの恒常的な過剰発現やノックダウンの技術を駆使してGemininの発現量を変化させ、造血幹細胞の自己複製やその後の増殖分化に及ぼす影響を解析し、造血幹細胞の活性制御におけるGemininの分子機能を明らかにしたいと考えている。そして、その知見を基にex vivoで造血幹細胞の活性の増幅を誘導することができる方法の確立を目指して研究を進めていきたい。

要 約

造血幹細胞の体外での増幅を目指して、報告者はshRNAを用いてGemininのノックダウンを行い骨髄細胞の造血活性の変化を調べた。4種類のshRNAを試みたところ、その中の1種類のshRNAは、コロニー形成能を飛躍的に上昇させた。また、この上昇したコロニー形成能は、Gemininの重導入により野生型骨髄細胞と同じ程度まで低下した。従って本研究は、Gemininの発現操作により造血活性を制御できる可能性を示した。

文 献

1. Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Okamoto, M., Ishizaki, H., Shirai, M., Saeki, K., Kurogi, T., Mihara, K., Brock, H. W., Miyoshi, J. & Takihara Y. Scmh1 composes an E3 ubiquitin ligase for Geminin and histone H2A to regulate protein's stability of Geminin directly or via transcription repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
2. Ohno, Y., Yasunaga, S., Janmohamed, S., Ohtsubo, M., Saeki, K., Kurogi, T., Mihara, K., Iscove, N. N. & Takihara Y. Hoxa9 transduction induces mouse hematopoietic stem and progenitor cell activity through direct down-regulation of Geminin protein. *PLoS ONE*, in press.
3. Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Mori, S., Tsumura, M., Okada, S., Ohta, T., Ohtani, K., Kobayashi, M. & Takihara Y. Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(50), 21529-21534, 2010.
4. Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Ohno, Y., Tsumura, M., Okada, S., Ishikawa, N., Shirao, K., Kikuchi, A., Nishitani, H., Kobayashi, M. & Takihara Y. Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(30), 10396-10401, 2008.