

赤芽球分化必須の膜ドメイン形成の解明と、その制御による赤血球分化培養技術の開発

岡本一男

東京大学大学院医学系研究科 骨免疫学寄付講座

【研究の背景】

輸血用血液不足の深刻化や副作用の問題から、新たな血液供給システムとして造血幹細胞や 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注目を浴びている。実用化に向けた高効率の赤血球誘導法を確立すべく、赤芽球分化誘導機序の詳細な理解は重要課題である。研究代表者はこれまでに、ヒト及びマウスの造血幹細胞、赤芽球前駆細胞を用いた既報のトランスクリプトームデータの再解析および遺伝子欠損マウスの解析から、Ca²⁺結合ドメインを有する分子(protein with EF-hand motif: Pefと称する)が新規の赤芽球分化必須因子であることを見出している。血球系細胞特異的 Pef 欠損マウス (*Pefflox*, *Vav-iCre*)はメンデルの法則に従い出生するものの、生後1日以内に重度の貧血(赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の著明な低下)により死亡する。一方、血小板数、リンパ球、単球・マクロファージ、造血幹細胞などの免疫前駆細胞の数は正常であるため、Pefは赤血球形成のみに特異的に関与する制御因子であると考えられる。

【目 的】

赤芽球分化に必須の新規制御因子 Pef に着目し、Pef によるエリスロポエチン(Epo)-Jak2 制御機構を解析し、Pef を標的とした効率的な ex vivo 赤血球形成誘導法の制御基盤の構築を目指す。

【方 法】

血球系細胞特異的 Pef 欠損マウスの胎仔肝由来赤芽球前駆細胞を用いた初代培養実験から、Epo 刺激による赤芽球分化ならびに Epo 受容体下流のシグナル伝達機構を解析し、Pef が赤芽球分化を制御する作用機序を明らかにする。また Pef の C 末端に FLAG タグを挿入した Pef-FLAG ノックインマウスから赤芽球前駆細胞を単離し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色により Pef の細胞局在を解析し、Epo 受容体及び Jak2 発現分布と比較検証を行う。さらに、Pef の各種ドメインを欠損させた変異体を作製し、Pef 欠損赤芽球前駆細胞に遺伝子導入することで、Epo 誘導性赤芽球分化に必須のドメインを特定する。

【結 果】

Pef 欠損マウスの胎仔肝由来赤芽球前駆細胞では、Epo 刺激による赤芽球分化誘導が顕著に抑えられた。赤芽球前駆細胞は Epo 刺激を受けると、Epo 受容体下流でチロシンキナーゼ Jak2、及び ERK1/2、転写因子 Stat5 がリン酸化され活性化される。そこで Epo 刺激後の細胞抽出液を用いて Western blotting 法により Jak2、ERK1/2、Stat5 のリン酸化を解析したところ、Pef 欠損マウスの胎仔肝由来赤芽球前駆細胞ではいずれのリン酸化も強く阻害されていることが判明した。さらに、Epo 刺激後の遺伝子発現を RNA-seq により解析したところ、Epo により誘導される赤芽球分化関連遺伝子(*Tfrc*, *Bcl2l1*, *Hbb-b2* など)の発現が著しく抑えられていることがわかった。

Pef-FLAG ノックインマウス由来赤芽球前駆細胞を用いて、Pef、Epo 受容体、Jak2 の細胞局在を解析した。野生型の赤芽球前駆細胞では Epo 受容体は細胞膜上にほぼ均一に観察されるものの、Pef 欠損赤芽球では EpoR が異常に凝集し、クラ

スターを形成することが認められた。

次に Pef の各種ドメインを欠損させた変異体を、Pef 欠損赤芽球前駆細胞に遺伝子導入し、Epo 誘導性赤芽球分化効率を検討したところ、Pef の N 末端ドメインが必須であり、Ef-hand motif は赤芽球分化に関与しないことが判明した。そこで、Pef および Pef 変異体をマウスの赤芽球初代培養系および赤白血病(MEL)細胞株に遺伝子導入し、赤血球分化誘導に対する効果を検討したところ、野生型 Pef の過剰発現により Epo 誘導性赤芽球分化が亢進することが判明した。一方、Pef 変異体では赤芽球分化誘導を確認できなかった。

【考 察】

本研究により、Pef は Epo 刺激による Jak2 活性化に必須の制御因子であり、Epo 受容体の細胞膜発現分布に関与することが示された。これまで脂質ラフトにて Epo 受容体が発現することが、Epo 受容体下流の Jak2 活性化に重要であるという報告がなされている。また Epo 受容体は Epo と結合すると立体構造が変化し、その結果 Epo 受容体の細胞質領域に結合している Jak2 のキナーゼ活性が発揮され、リン酸化される。本研究から、Pef による Epo 受容体の細胞膜局在が、Epo-EpoR-Jak2 活性化を築く必須のプラットフォームであることを示唆され、膜ドメイン形成を介した新たな Epo シグナル制御機構の理解に繋がることが期待される。Pef の N 末端ドメインには生物活性を示す既知の特徴的な配列が含まれていないが、Epo 受容体/Jak2 制御に関わる因子との相互作用に関与している可能性が想定されるため、今後、野生型 Pef および N 末端欠損 Pef 変異体を発現させた赤芽球前駆細胞のタンパク質抽出液を用いて質量分析により Pef 結合分子を探索・同定することを計画している。Pef 活性を促進する制御法の開発を通じて、より高い効率で赤芽球分化を誘導できる培養条件の構築に繋げたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

自家性の造血幹細胞・前駆細胞を用いた *in vitro* の赤血球分化誘導系の開発が求められる今、赤血球分化、特に Epo/Jak2 に関わる新規制御機構の解明を図る本研究は、幹細胞を用いた再生医療アプローチの開発への橋渡しになると考えられる。今後 Pef による Epo/Jak2 制御の分子機構をさらに明らかにし、効率的な *ex vivo* 赤血球形成誘導法の開発に繋げることができれば、社会・経済に還元できる革新的な研究シーズとなると予想される。

【参考・引用文献】

Mikhail M Kostik, Maria A Makhova, Alexei S Maletin, Shamai M Magomedova, Lybov S Sorokina, Masayuki Tsukasaki, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi, Dmitriy S Vasiliev, Darya I Kozlova, Alexander Yu Mushkin. Cytokine profile in patients with chronic non-bacterial osteomyelitis, juvenile idiopathic arthritis, and insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine*, 143: 155521, 2021

Kazuo Okamoto. Role of RANKL in cancer development and metastasis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39: 71-81, 2021