

広大原医研年報第44号, 2003

放射線再生医学研究部門 幹細胞機能学研究分野研究概況

教 授 瀧 原 義 宏

当研究分野は、再生医学の観点から放射線障害や各種疾患に対する新しい治療戦略を模索すべく、平成14年度に放射線再生医学研究部門の一つとして新設された。平成15年2月1日に瀧原義宏教授が着任し、研究室の新規開設に着手した。研究室では、エピジェネティクスあるいは細胞メモリー機構と呼ばれるクロマチン構造の制御を介した転写維持機構を担うポリコム遺伝子群の機能とその分子機構を解析することから研究を始めた。これらの知見に基づき、将来の再生医療を担うと考えられる組織幹細胞あるいは成体幹細胞の制御機構の解明と操作法の開発を目差している。当研究分野における本年度の研究課題とその成果は以下の通りである。

1. 研究題目：ポリコム遺伝子群 *rae28* を欠損した造血幹細胞は長期造血維持に異常を示す

参加研究者：金智裕*, 澤田明久*, 遠藤洋子*, 瀧原義宏

ポリコム遺伝子群 (PcG) の遺伝子産物は核内複合体を形成し、染色体の高次構造を制御することによって遺伝子発現の維持を担っている。我々は独自に単離した PcG の一つ *rae28* 遺伝子の遺伝子欠損マウスを作製し、造血制御において PcG がどのような役割を担っているかについて解析を進めている。*rae28* 遺伝子の遺伝子欠損マウスは周産期致死であるため、まず遺伝学的交配により EGFP でラベルした *rae28* 遺伝子欠損マウスを作製した。そして、本研究では、14.5日胚の胎仔肝 (FL) 細胞を致死量の放射線照射した同系マウスに移植し、造血幹細胞機能を検討した。限界希釈法を用いた競合的長期骨髄再構築法で調べた結果、造血幹細胞はホモ接合型マウスの FL において、野生型の 1/20 に減少しており、さらに、1ヶ月間における造血幹細胞の自己複製能を競合的長期骨髄再構築法で検討した結果、自己複製能が 1/15 に低下していることがわかった。ホモ接合型の造血幹細胞はマウス骨髄を長期に再構築することは可能であったが、自己複製能が低下しているため、移植後6ヶ月においては、造血幹細胞は著しく低下していた。興味深いことに、造血前駆細胞レベルは比較的よく代償されているにもかかわらず末梢血の血球細胞は減少していた。これらの所見から、*rae28* は造血維持すなわち造血幹細胞の自己複製及び造血前駆細胞の機能に関与していることが推測された。

2. 研究題目：ポリコム遺伝子群 *rae28* による造血制御機構の解析

参加研究者：澤田明久*, 金 智裕*, 遠藤洋子*, 瀧原義宏

我々は PcG の一つ *rae28* の遺伝子欠損マウスを用いた解析から、*rae28* が発生過程において、位置情報すなわち場所特異的な細胞の特性を決定する Hox 遺伝子群の遺伝子発現維持を担っていることを明らかにしてきた (Takahara et al., Development 124: 3673, 1997)。一方、最近 *rae28* が造血幹細胞の自己複製能や造血前駆細胞機能に関与していることを見出した。興味深いことに *rae28* 遺伝子欠損マウスにおいては、造血細胞における Hox 遺伝子群の発現に異常が見い出されないことから、*rae28* による造血制御には Hox 遺伝子群の転写制御とは別の機構が存在することが推測される。そこで本研究では、*rae28* による造血制御機構を明らかにすべく、細胞レベルでの解析を行った。*rae28* 遺伝子の遺伝子欠損マウスは周産期致死であるため、14.5日胚の FL 細胞を用いて、SCF+IL-3+GM-CSF 存在下でメチルセルロース法によるコロニーアッセイを行ったところ、ホモ接合型において、CFU-C は、野生型の約 60% 程度であったが、同様の方法で単一のサイトカインに対する反応性を調べると、GM-CSF や

TPO に対する反応性が特に著減していた。興味深いことにこれらのレセプターの発現には著変なく、また、それぞれのサイトカインに反応して形成されたコロニー内の細胞の数や細胞周期にも有意な差は認められなかった。現在、さらにサイトカインのシグナル伝達や細胞周期制御について分子レベルでの検討を進めている。

3. 研究題目：ポリコム遺伝子群 *rae28* による心臓発生制御

参加研究者：大杉友顕*, 瀧原義宏

rae28 遺伝子欠損マウスは paraxial mesoderm と rhombomere における Hox 遺伝子群の発現維持の異常を示し、同遺伝子はマウスにおいても位置情報の維持を担っている。ホモ接合型は眼の低形成を伴った顔面の形成異常、口蓋裂、胸腺及び副甲状腺の低形成など神経提細胞に由来する臓器の系統的異常とファロー四徴症や両大血管右室起始などの心臓の形態形成の異常を伴っていた。本研究ではポリコム遺伝子群の心臓発生における役割について解析を進めた。*rae28* 遺伝子欠損マウスにおいては、心臓発生初期の心臓特異的のホメオボックス遺伝子 *Nkx2.5/Csx* の発現に異常は認められなかったが、発生の進行とともに十分な *Nkx2.5/Csx* の発現が維持されず、*Nkx2.5* の下流にあると考えられる *Hand1*, *ANF*, *MLC2v* にも系統的な発現異常が見い出された。そこで、心臓に *Nkx2.5/CSX1* を発現させたトランスジェニックマウスを用いて遺伝学的な相補実験を行い、心臓の発生異常が外来生の *Nkx2.5/CSX1* によって効率よく相補され、*Nkx2.5/Csx* の下流にある *Hand1*, *ANF*, *MLC2v* の発現も正常復帰することを明らかにした。さらに、心筋特異的に *rae28* を発現するトランスジェニックマウスとの遺伝学的交配によって *rae28* がどのように *Nkx2.5/Csx* を制御しているかについても検討を加えた。

4. 研究題目：ポリコム遺伝子群による心臓維持の機構

参加研究者：瀧原義宏, 遠藤洋子*

β ミオシン重鎖 (β MHC) のプロモーターを用いて、*rae28* を心筋特異的に発現するトランスジェニックマウス (β MHC-*rae28*) を作製した。*rae28* 遺伝子は発生初期の心臓では強い発現を示すが、発生の進行に伴って、発現が低下する。しかし、複合体を構成している他のポリコム遺伝子群の発現は比較的一定である。したがって、発生過程でポリコム遺伝子群複合体はその構成成分が動的に制御されている可能性が考えられる。興味深いことに β MHC-*rae28* は例外なく拡張型心筋症に良く似た病態を示し、生後 8 ヶ月までにはうっ血性心不全を引き起こし、致死となる。 β MHC-*rae28* の心筋においては、サルコメアの構造変化が認められるとともに、心筋がアポトーシスを起こし脱落していくことがわかった。したがって、*rae28* の心筋特異的な高発現が心筋維持の機構を損ない心筋の脱落を引き起こしたことが推測された。これらのことから、ポリコム遺伝子群が心筋の維持に関与していることが予想される。さらに、 β MHC-*rae28* はヒト拡張型心筋症の疾患モデルマウスとしても興味深いと考えられる。

(*大阪府立成人病センター研究所・生化学部門)

A. 原著

1. Koga, H., Kaji, Y., Nishii, K., Shirai, M., Tomotsune, D., Osugi, T., Sawada, A., Kim, J. Y., Hara, J., Miwa, T., Yamauchi-Takahara, K., Shibata, Y., Takihara, Y. Overexpression of the Polycomb-group gene *rae28* in cardiomyocytes does not complement abnormal cardiac morphogenesis in *rae28*-deficient mice, but causes dilated cardiomyopathy. Lab. Invest. 82: 375-385, 2002, cited in cover. (G) (I).
2. Ohta, H., Sawada, A., Kim, J. Y., Tokimasa, S., Nishiguchi, S., Humphries, R. K., Hara, J., Takihara, Y. The Polycomb-group gene *rae28* is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. 195: 759-770, 2002. (R) (A) (G) (I).

3. Shirai, M., Osugi, T., Koga, H., Kaji, Y., Takimoto, E., Komuro, I., Hara, J., Miwa, T., Yamauchi-Takahara, K., Takihara, Y. The *Polycomb*-group gene *rae28* sustains *Nkx2.5/Csx* expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J. Clin. Invest.* 110: 177-184, 2002, cited in cover. (G) (I).
4. Suzuki, M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M., Masumoto, H., Vidal, M., Isono, K., Koseki, H. Involvement of the Polycomb-group gene *Ring1B* in the specification of the anterior-posterior axis of vertebrates. *Development* 129: 4171-4183, 2002. (G) (I).

B. 学会発表

1. 金 智裕, 澤田明久, 遠藤洋子, 時政定雄, 太田秀明, 原 純一, 瀧原義宏: ポリコム遺伝子群 *rae28* を欠損した造血幹細胞は長期造血維持に異常を示す. 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会 (横浜) ワークショップ: 造血・血球機能-2, 2002年9月12日～15日.
2. 澤田明久, 金 智裕, 遠藤洋子, 時政定雄, 太田秀明, 原 純一, 瀧原義宏: ポリコム遺伝子群 *rae28* を造血制御に機序. 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会 (横浜), 2002年9月12日～15日.
3. 澤田明久, 金 智裕, 窪田恵子, 時政定雄, 藤崎弘之, 松田佳子, 太田秀明, 小野寺隆, 瀧原義宏, 原 純一: 無ガンマグロブリン血症の新規原因遺伝子の同定. 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会 (横浜), 2002年9月12日～15日.
4. 瀧原義宏, 澤田明久, 金 智裕, 時政定雄, 太田秀明, 遠藤洋子, 原 純一: 造血幹細胞の自己複製制御におけるポリコム遺伝子群の役割, 第22回血液幹細胞シンポジウム (東京) 2002年11月8日.
5. 瀧原義宏, 金 智裕, 澤田明久, 遠藤洋子, 時政定雄, 太田秀明, 原 純一: ポリコム遺伝子群は造血幹細胞の自己複製に重要な役割を果たしている. 25回日本分子生物学会年会 (横浜) シンポジウム「造血幹細胞の自己複製を制御する分子機構」2002年12月11日～14日.
6. 瀧原義宏: ポリコム遺伝子群 *rae28* による造血幹細胞制御, 国立遺伝学研究所研究会「エピジェネティクスの分子機構と疾患」(三島) 2003年3月13～14日.
7. Keiko Takihara, Tomoaki Osugi, Hideyuki Koga, Yoshikazu Kaji, Yoshihiro Takihara: The polycomb-group gene *rae28* sustains *Nkx2.5/Csx* expression and is essential for cardiac morphogenesis. 第67回日本循環器学会学術集会 (福岡) 2003年3月28～30日.
8. Takihara, Y., Osugi, T., Koga, H., Kaji, Y., Shirai, M., Yamauchi-Takahara, K. The Polycomb-group gene *rae28* is required for maintaining *Nkx2.5/Csx* expression, which is crucial for cardiac development. 75th American Heart Association Scientific Sessions. 2002.11.20, Chicago.

