

放射線再生医学研究部門 幹細胞機能学研究分野概況

教	授	瀧	原	義	宏
助	手	大	坪	素	秋
助	手	安	永	晋	一郎
大	学	石	川	暢	恒
大	学	岡	田		賢
大	学	大	野	芳	典
大	学	白	尾	謙	一郎
大	学	津	村	弥	来

本年4月から博士課程の大学院生1名と技能補佐員1名を新たに迎えると同時に、事務補佐員1名の支援を得て研究室の総勢は10名となった。当研究分野では、放射線障害をはじめとした各種難治疾患に対して再生医学の観点から新しい治療戦略を開発することを目的として研究を進めている。造血幹細胞移植療法は再生医療の原型であり、放射線障害をはじめとする難治性疾患に対する新戦略を提供することが期待される。移植には、骨髓幹細胞や末梢血幹細胞が使用されてきたが、最近ではさい帯血幹細胞が中心になりつつある。いずれにしても十分な細胞数の良質な幹細胞を確保することが最も重要である。そこで、当研究分野では、良質な造血幹細胞の増幅法の開発を目指して、造血幹細胞の制御機構の解析を中心に研究を進めている。

造血幹細胞の活性を制御する分子基盤にアプローチするに際して、研究室ではその内的因子から解析の糸口を見つける方針を立てた。ショウジョウバエの遺伝学的解析から発見されたポリコム遺伝子群(PcG)に注目し、独自にマウス及びヒトの相同遺伝子を単離した。PcGは一度設定された転写状態を維持する細胞メモリー機構を構成しているが、小児の難治性白血病であるmixed lineage leukemiaに好発する染色体転座点11q23から見つかったMIL遺伝子がPcGと相反する機能を有するトリソックス遺伝子のヒト相同遺伝子であることから、PcGの造血制御における役割が推測された。そこで、遺伝学的解析と生化学的解析の両面から解明を進めた。まずノックアウトマウスを作製し、造血幹細胞の活性を維持するにあたりPcGが必須な役割を果たしていることを初めて突き止めた。その後、PcGによる幹細胞制御はES細胞から造血幹細胞、神経幹細胞、神経堤細胞、そして白血病幹細胞にまで及ぶことが報告された。PcGの分子機能についても解析が進んだ。PcG複合体2がヒストンH3K27をメチル化することによってクロマチンに指令暗号としてヒストンコードを設定する。この指令暗号を認識してリクルートされてきたPcG複合体1が近傍のヒストンH2Aをユビキチン化するとともに、クロマチン再構成を抑制することによって遺伝子発現を系統的に抑制する。このようにヒストンコードを介したエピジェネティックな転写制御機構の基本原則が解ってきた。そして、PcGはp16CKIやp19ARFをコードし細胞老化を制御するINK4a遺伝子座の転写を抑制することによって幹細胞の活性を維持していることが報告されている。しかし、INK4a遺伝子座の転写制御だけではPcGによる幹細胞の活性制御を理解するには充分ではなく、PcGによる幹細胞活性を支持する分子基盤には新たな側面があることが予測される。研究室ではPcG複合体1がDNA複製ライセンス化因子Cdt1の抑制因子Gemininと直接結合し、DNA複製開始制御に関っていることを新たに見つけた。興味深いことに造血幹細胞の増幅活性を有するHox遺伝子群の遺伝子産物もGemininと結合することから、これらの造血幹細胞の活性を担う内的因子がいずれもGemininを介して造血幹細胞の

制御に関わっていることが解る。したがって、Geminin-Cdt1システムが幹細胞制御において根幹的役割を果たしているのではないかと考えられる。本年度は昨年度までの解析をさらに進めるとともに、昆虫細胞を用いてPcG複合体1とその活性を再構築する生化学的解析に取り組み、幹細胞の活性を支持する分子基盤の解明を精力的に進めた。さらに、正常幹細胞だけでなく、白血病幹細胞をはじめとしたがん幹細胞における役割にも解析の範囲を広げた。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。これらの研究により幹細胞の活性を支持する分子基盤を明らかにし、幹細胞の増幅法の開発やがん幹細胞の制御法の開発に貢献したいと考えている。

広島大学医学部小児科と共同で解析を進めているヒトの先天性免疫異常、先天性血液凝固障害、さらに β 酸化異常症の分子生物学的解析も軌道に乗り、情報発信を開始した。

1. 研究題目：PcGによるDNA複製ライセンス化制御機構の解析

参加研究者：大坪素秋，安永晋一郎，津村弥来，大野芳典，時元利恵，瀧原義宏

研究室では遺伝子欠損マウスを用いた遺伝学的解析によって、造血幹細胞の活性制御においてPcGが重要な役割を果たしていることをはじめて明らかにした。そして、昨年度までの解析によってPcG複合体1がDNA複製ライセンス化因子であるCdt1の抑制因子Gemininのタンパク質レベルでの安定性制御に直接関わっていることが明らかにしたので、本年度はバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞Sf9にPcGの各メンバーのタンパク質を発現させ、再構成したPcG複合体を単離精製し、そのGemininに対するE3ユビキチンリガーゼ活性を生化学的に証明することを試み成功した。さらに、Scmh1がPcG複合体1とともにGemininを核から細胞質へと移送させること、そしてPcG複合体1自身もユビキチン化を受け、タンパク質レベルで安定性が制御されていることを明らかにした。Gemininの発現量はこのような一連の過程によって厳格に規定されていることがわかった。GemininはDNA複製のライセンス化制御だけでなく、ゲノムの安定性や未分化性維持にも関わっていることが解っており、幹細胞制御におけるGeminin-Cdt1システムとその制御機構の役割が明らかにすることができた。

2. 研究題目：PcGによる造血幹細胞制御の分子基盤の解析

参加研究者：安永晋一郎，大野芳典，大坪素秋，津村弥来，時元利恵，瀧原義宏

PcGの遺伝子欠損マウスを用いた解析から、PcGが造血幹細胞の自己複製能を含めた活性制御に必須な役割を果たしていることを明らかにした。従来、PcG複合体1は専らクロマチンの高次構造の制御を介して転写の維持を担っていると理解されて来たが、研究室ではPcG複合体1がDNA複製ライセンス化因子Cdt1の抑制因子Gemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして働き、DNA複製ライセンス化の制御に関わっていることを明らかにした。そこで、PcGによるGemininのタンパク質レベルでの制御が造血幹細胞の活性を支持する分子基盤にどのように関わっているかを明らかにすることを目的として、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入系を駆使してGeminin及びCdt1の造血幹細胞の活性制御における役割を明らかにした。また、昨年度に確立したScmh1のノックアウトマウスを用いて、PcG複合体1によるGeminin制御機構とその生物学的意義について主に造血幹細胞機能に焦点を当てて詳しい解析を進めている*。

*本研究は大阪府立成人病センター研究所分子生物学部門（三好淳部長）との共同研究である。

3. 研究題目：Hoxによる造血幹細胞制御の分子基盤の解析

参加研究者：大野芳典，安永晋一郎，津村弥来，大坪素秋，岡田賢，時元利恵，瀧原義宏

発生過程においてHox遺伝子群は前後軸に沿った位置情報を提供し、形態形成を司っているが、造血幹細胞を制御する内的因子としても近年大変注目されている。HOXB4を高発現させることによって造血幹細胞の自己複製を誘導することができるだけでなく、ES細胞から造血幹細胞の発生を誘導することが可能であることから、造血幹細胞の発生を司るセクター遺伝子としての機能を有しているのではないかと考えられている。しかし、

Hox遺伝子群がどのような分子基盤に基づいて自己複製能を含めた造血幹細胞の活性制御やその発生に関っているのかについては未だに充分には解っていない。研究室ではHOXB4の高発現がPcG遺伝子群の欠損による造血幹細胞の活性異常を効率良く遺伝学的に相補することを明らかにし、その分子基盤を明らかにするための貴重な手がかりを得た。上述のPcG複合体1だけでなくHox遺伝子産物もホメオドメインを介してGemininと結合することはすでに明らかにしているので、PcG及びHoxが共に結合するGemininをタンパク質レベルで制御することによってDNA複製のライセンス化制御を介して造血幹細胞の活性を維持しているのではないかと推測される。そこで、さらに遺伝学的及び生化学的に詳細に解析を進め、造血幹細胞を制御する分子基盤について理解を深めることを目指した。HOXB4は転写を制御するだけでなく、Geminin-Cdt1システムを直接制御し、DNA複製ライセンス化を調節することによって細胞に増殖活性を付与していることがわかってきた。幹細胞制御だけでなく発生制御とも関連し、PcGやHOXによって構成される実に巧妙な制御系の存在が浮かび上がってきた。

4. 研究題目：白血病幹細胞の活性を支持する分子基盤の解析

参加研究者：安永晋一郎，大野芳典，津村弥来，大坪素秋，石川暢恒，時元利恵，瀧原義宏

昨年度までのマウスを用いた解析によって、PcGがGeminin-Cdt1システムの制御に直接関わり、正常造血幹細胞を支持する分子基盤を構成していることを証明した。さらに、Bmi1を中心にPcGの発現が白血病や骨髄異形成症候群（MDS）における病期の進行や予後とよく相関することを明らかにした。従って、正常造血幹細胞だけでなく、白血病幹細胞をはじめとしたがん幹細胞においてもGeminin-Cdt1システムがこれらの活性を制御するために重要な役割を果たしているのではないかと推測される。そこで、実際にどのような分子基盤によって白血病の病勢とPcGの発現が関わっているのかを明らかにする目的で、Bcr-Ablをレトロウイルスベクターを用いて胎仔肝細胞に導入し、マウスに実験的白血病を発症させ、遺伝学的に白血病の発症及び白血病幹細胞の活性制御においてPcGがどのような役割を果たしているのかについて詳細に明らかにして行くこと計画した。Imatinib（STI571）の効果についても調べる計画である*。

*本研究は原医研内科及び広島大学医学部小児科と共同で研究を進めている。

5. 研究題目：先天性細胞性免疫不全症の分子レベルでの病因解析

参加研究者：岡田 賢，石川暢恒，白尾謙一郎，津村弥来，大野芳典，川口浩史，安永晋一郎，大坪素秋，瀧原義宏，小林正夫

抗酸菌やサルモネラ菌等の細胞内寄生細菌に対して選択的に易感染性を示す先天性疾患群の存在が知られている。これらの患者においてはIFN- γ やIL-12に関連するシグナル伝達経路に異常が存在することが推測されるが、分子レベルにおける病因は未だに充分には解明されていない。そこで、本研究では非定型抗酸菌による多発性骨髄炎を呈した2症例についてその分子レベルでの病因解析を行った。症例1では、末梢血単核球におけるリポ多糖体またはIFN- γ によるIL-12またはTNF- α の産生誘導能が低下しており、遺伝子解析の結果、INFGR1に4塩基の欠損を認めた。本変異は今まで報告がなく、新しいIFN- γ R1異常症と考えられた。本変異が優性変異となる分子基盤についてさらに解析を進めた。症例2は症例1とは異なり、INF- γ R1や他のIL-12やIFN- γ 経路に関する既知のシグナル伝達分子群に異常は認められず、新たな免疫不全症の可能性が考えられた。

6. 研究題目：選択的IgA欠損症におけるTACI遺伝子異常の分子生物学的意義の解析

参加研究者：岡田 賢，白尾謙一郎，石川暢恒，梶梅輝之，安永晋一郎，大坪素秋，瀧原義宏，小林正夫

TACI（Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor）はTNFレセプターファミリーの一つで、主としてCD27⁺メモリーB細胞上に発現し、B細胞の増殖、免疫グロブリンのクラススイッチに関与している。近年、選択的IgA欠損症（SIgAD）や分類不能型免疫不全症（CVID）の一部の症例

で、TACIをコードする遺伝子TNFRSF13Bに変異が存在することが報告された。SIgADとCVIDは、しばしば同一家系内に認められることが古くから報告されており、互いにオーバーラップする疾患群と考えられていたが、この報告により両疾患の一部がTACIの異常という共通の分子基盤のもとに引き起こされていることが明らかになった。我々はSIgADの患者において、本邦で初めてTNFRSF13Bの変異（1塩基挿入）を認めた。これは今まで報告の無い変異で、本変異が疾患を引き起こす分子基盤について解析を行った。患者末梢血由来のB細胞は、CD40L刺激に対する反応性は保たれていたが、TACIのリガンドであるAPRIL刺激に対する反応性が障害されていた。この結果より、TACIの変異が本症発症に関与することが考えられた。

7. 研究題目：先天的第XI因子欠損症の分子レベルでの病因解析

参加研究者：石川暢恒，岡田 賢，白尾謙一郎，安永晋一郎，大坪素秋，瀧原義宏，小林正夫

血液凝固因子である第XI因子は、血液凝固カスケードの中で第IX因子を活性化させる役割を担っている内因性因子である。その欠乏症は、常染色体劣性遺伝の形式をとり、ユダヤ人では比較的多いが、本邦では稀な凝固因子異常症である。病態としては一般に、第VIII因子欠乏症や第IX因子欠乏症のように乳幼児期から重篤な出血症状を呈することは稀であるが、手術などの侵襲時に難治性出血となることもあり、症例によっては出血傾向が顕在化する。本研究では、重度の第XI因子欠乏患者を発端者とする1家系を見出し、遺伝子解析を行った。その結果、新規変異を特定し、本邦で既に確認されている変異との複合ヘテロにより発症したことを明らかにした。発端者の兄も同じ変異を持っており、父、母はヘテロであった。第XI因子欠乏症に関してはこれまで種々の遺伝子変異が報告されているが、人種・集団により好発部位が異なっており、本邦での解析の進展が期待された。

8. 研究題目： β 酸化異常症におけるACADS異常症の分子学的解析

参加研究者：白尾謙一郎，岡田 賢，石川暢恒，但馬 剛，安永晋一郎，大坪素秋，瀧原義宏，小林正夫

Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (SCAD) は β 酸化酵素の一つで、ミトコンドリアマトリックスにおいて短鎖脂肪酸の代謝に関与しており、butyryl-CoAからenoyl-CoAへの代謝を媒介する。1980年代、同じ β 酸化酵素であるmiddle-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) の欠損が、新生児突然死症候群(SIDS)の原因の一つになっていることが明らかになり、 β 酸化酵素異常症が注目されたが、SCAD欠損症もSIDSの原因になることがわかってきた。本研究ではSCAD欠損症の患者において、acyl-coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain (ACADS) 遺伝子に新規の変異を同定した。この変異が疾患を引き起こすことを確認するため、現在解析中である。HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いてのSCAD欠損症の診断・解析が可能かどうか確認していく予定である。SCAD欠損症は稀な疾患と考えられてきたが、近年では健常人にもSCADをコードする遺伝子であるの変異を認めることが明らかになり、疾患発症に何らかの修飾因子が関与していると考えられている。

A. 原 著

1. Mihara, K., Chowdhury, M., Nakaju, N., Hidani, S., Ihara, A., Hyodo H., Yasunaga, S., Takihara, Y., Kimura, A. (2006) Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. *Blood* 107: 305-308. (R), (G), (I)
2. Fujimura, Y.I., Isono, K.I., Vidal, M., Endoh, M., Kajita, H., Mizutani-Koseki, Y., Takihara, Y., van Lohuizen, M., Otte, A., Jenuwein, T., Deschamps, J., Koseki, H. (2006) Distinct role of Polycomb group gene products in transcriptionally repressed and active domains of Hoxb8. *Development* 133: 2371-2381. (R), (G), (I), (A)
3. Chowdhury, M., Mihara, K., Yasunaga, S., Ohtaki, M., Takihara, Y., Kimura, A. (2007) Expression of Polycomb-group (PcG) protein BMI-1 predicts prognosis in patients with acute leukemia. *Leukemia in press* (R), (G), (I)

4. Ishikawa, N., Okada, S., Sato, T., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Takihara, Y., Kobayashi, M. (2007) A novel mutation (Gln433Glu) in exon 12 combined with the G insertion in exon 13 causes severe factor XI deficiency in Japanese patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis in press* (R), (G), (I)
5. Mihara, K., Takihara, Y., Kimura, A. (2007) Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. *Cytogenet. Cell Genet. in press*
6. Okada, S., Ishikawa, N., Shirao, K., Kawaguchi, H., Tsumura, M., Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Takihara, Y., Kobayashi, M. (2007) The novel IFNGR1 mutation 774del4 produces a truncated form of interferon-gamma receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon-gamma signal transduction. *J. Med. Genet., in press* (R), (G), (I)
7. 瀧原義宏 「再生医学最前線」ポリコム遺伝子群の分子機能と幹細胞制御：幹細胞を支持する分子基盤. 医学のあゆみ (医歯薬出版) 217: 557-562, 2006
8. 瀧原義宏 幹細胞の活性を支持するポリコム遺伝子群. 放射線科学 (実業広報社) 49: 353-360, 2006
9. 瀧原義宏 ポリコム遺伝子群. 造血器腫瘍アトラス (日本医事新報社) 印刷中
10. 瀧原義宏 がん幹細胞の活性を支持するポリコム遺伝子群の役割. *Biotherapy* (癌と科学療法社) 印刷中
11. 瀧原義宏 白血病幹細胞研究の新展開. *Front Wave in Hematology* (アトリスク) 印刷中

B. 学会発表等

1. 瀧原義宏：造血幹細胞の活性を支持するポリコム複合体の分子機能
第14回 近畿さい帯血幹細胞移植研究会 (大阪)
平成18年5月13日
2. 瀧原義宏, 安永晋一郎, 大坪素秋, 大野芳典, 津村弥来, 石川暢恒, 岡田 賢：ポリコム複合体によるDNA複製ライセンス化制御の造血幹細胞における役割
平成18年年度 特定領域研究 (A) 第3回公開班会議「幹細胞の可塑性と未分化性機構」(東京)
平成18年5月18-19日
3. 瀧原義宏：造血幹細胞の活性を支持するポリコム複合体の分子機能
放射線影響研究機関協議会セミナー (放射線医学総合研究所, 千葉)
平成18年6月5日
4. Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Tsumura, M., Ohno, Y., Okada, S., Ishikawa, N., Miyachi-Hatasako, R., Kobayashi, M., Takihara, Y. Role of Polycomb-group genes in the regulation of DNA replication Licensing.
第29回 日本分子生物学会年会 (京都)
平成18年6月18-23日
5. Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Okada, S., Ishikawa, N., Tsumura, M., Miyachi-Hatasako, R., Kobayashi, M., Takihara, Y. Transduction of HOXB4 into rae28-deficient fetal liver cells recovered the impaired hematopoietic stem cell activity and B cell development.

第29回 日本分子生物学会年会（京都）

平成18年 6 月18－23日

6. 秋元志美, 安永晋一郎, 大坪素秋, 藤原好恒, 山本 卓, 瀧原義宏, 谷本能文, 鈴木文男: 細胞種に依存した細胞の放射線応答: アポトーシス誘発と分裂異常

第49回日本放射線影響学会（札幌）

平成18年 9 月 6－8 日

7. 大坪素秋, 安永晋一郎, 岡田 賢, 石川暢恒, 津村弥来, 大野芳典, 宮地－畠迫里佳, 小林正夫, 瀧原義宏: ポリコム複合体によるDNA複製制御因子Gemininのユビキチン化と安定性制御

第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会総会同時期開催（福岡）

平成18年10月 6－8 日

8. 安永晋一郎, 大坪素秋, 大野芳典, 津村弥来, 岡田 賢, 石川暢恒, 宮地－畠迫里佳, 小林正夫, 瀧原義宏: ポリコム遺伝子欠損造血幹細胞の活性低下に対するHOXB4による遺伝学的相補

第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会総会同時期開催（福岡）

平成18年10月 6－8 日

9. 大野芳典, 安永晋一郎, 大坪素秋, 津村弥来, 岡田 賢, 石川暢恒, 宮地－畠迫里佳, 小林正夫, 瀧原義宏: ポリコム遺伝子群によるGeminin-Cdt1システムを介した造血幹細胞制御機構の解析

第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会総会同時期開催（福岡）

平成18年10月 6－8 日

10. Takihara, Y. Role of the Geminin-Cdt1 replication licensing system in hematopoietic stem cells.

The 4th International symposium of 21st century COE program, “Genome Damage and Regenerative medicine”, Hiroshima, Japan, February 6-7, 2007.

11. Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Tsumura, M., Okada, S., Ishikawa, N., Tokimoto, R., Kobayashi, M., Takihara, Y. HOXB4-overexpression complements the impaired hematopoietic stem cell activity in polycomb-deficient fetal liver cells.

The 4th International symposium of 21st century COE program, “Genome Damage and Regenerative Medicine”, Hiroshima, Japan, February 6-7, 2007.

12. Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Tsumura, M., Ohno, Y., Okada, S., Ishikawa, N., Tokimoto, R., Kobayashi, M., Takihara, Y. Polycomb-group complex 1 as an E3 ubiquitin ligase for Geminin, a negative regulator of DNA replication licensing.

The 4th International symposium of 21st century COE program, “Genome Damage and Regenerative Medicine”, Hiroshima, Japan, February 6-7, 2007.

13. 瀧原義宏, 大坪素秋, 安永晋一郎, 大野芳典, 津村弥来, 岡田 賢, 石川暢恒: ポリコム複合体によるDNA複製ライセンス化制御の造血幹細胞における役割

平成18年年度 特定領域研究（A）第4回公開班会議「幹細胞の可塑性と未分化性機構」（東京）

平成19年 2 月19－20日