

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07782

研究課題名(和文) 巨核球造血におけるホメオドメイン転写因子IRX1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a transcription factor, IRX1, in megakaryocyte differentiation

研究代表者

佐藤 知彦 (Sato, Tomohiko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70587005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：巨核球造血においては、多くの転写因子が適切な段階で協調的に働くことが必要であるが、これら転写因子による制御機構は完全に解明されていない。本研究の目的は、血球分化との関連が報告されていない転写因子、IRX1の巨核球造血における機能を明らかにすることである。  
IRX1を発現させた細胞では、細胞周期が停止し、巨核球系・赤芽球系特異的遺伝子の発現上昇が認められることを明らかにした。IRX1が血球分化に関連する転写因子であることがはじめて示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病で遺伝子変異が認められた転写因子IRX1は、これまで血液疾患との関連はもとより、血液学の分野では全く注目されていなかった。今回の研究において、IRX1が血球分化に関わる転写因子であることをはじめて示したが、これは白血病の発症要因の解明にとどまらず、正常な血球分化のメカニズムの解明にも役立つことが予想され、血液学の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In megakaryopoiesis, many transcription factors need to work cooperatively at appropriate stages, but the transcriptional regulatory mechanism have not been fully elucidated. The purpose of this study is to clarify the function of IRX1, a transcription factor that has not been reported to be associated with hematopoietic differentiation, in megakaryopoiesis. We revealed that IRX1 expressing cells underwent cell cycle arrest and showed increased expression of megakaryocyte-erythroid specific genes. This is the first report demonstrating that IRX1 is involved in hematopoietic differentiation.

研究分野：血液学

キーワード：巨核球造血

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

正常造血において、巨核球は造血幹細胞(HSC) - 骨髄球系共通前駆細胞(CMP) - 巨核球/赤芽球系共通細胞(MEP)を経て分化・成熟に至る、造血幹細胞を頂点とした血球分化モデルが広く浸透している。この分化・成熟には、トロンボポイエチンのほかに、GATA1、FOG1、RUNX1、FLI-1などの転写因子が適切な段階で協調的に働くことが必要である(*Br J Haematol.* ; 161:778-793, 2013)。しかしながら、これら転写因子による制御機構は完全には解明されていない。

申請者らは本研究を開始する前に、ダウン症関連急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)症例の中に、*IRX1*の遺伝子変異をもつ症例を高頻度に発見した(データ未発表)。*IRX1*は多くの種で広く保存されている Iroquois ホメオドメイン転写因子の1つで、胎児期の外胚葉の発達に関連する胃癌や頭頸部がんでその発現が低下しているといった報告は散見されるが、その標的遺伝子や下流のパスウェイ等は一切不明である。また既存の発現解析データベースによると造血細胞の中において *IRX1* は、ヒトにおいては MEP で、マウスにおいては赤血球系ではなく巨核球系でその発現が高いが、血球分化に関する *IRX1* の機能についての報告は存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*IRX1* が巨核球分化に関わる転写因子であることを示し、*IRX1* の標的遺伝子およびその下流のパスウェイを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### IRX1 が巨核球分化に関わる転写因子であることの証明

DS-AMKL 細胞株である KPAM1 に *IRX1* を過剰発現させて、細胞増殖が抑制されることを示す。また、ドキシサイクリン容量依存性に *IRX1* の発現を自在に調整できる細胞株(KPAM1-Tet-*IRX1*)を用いて、*IRX1* を発現している細胞では細胞周期が停止しているために細胞増殖が抑制されていることを BrdU 解析にて証明し、遺伝子発現解析を行うことで *IRX1* が巨核球分化に関わることを示す。

#### ChIP-Seq による *IRX1* の標的遺伝子の同定

##### 1) 抗 *IRX1* 抗体を用いる方法

*IRX1* 発現細胞において、抗 *IRX1* 抗体で ChIP を行った後に次世代シーケンサーでシーケンスを行う。得られたデータをゲノム配列にマッピングし、*IRX1* 結合部位を同定する。

##### 2) 抗 FLAG 抗体を用いる方法(市販の抗 *IRX1* 抗体でうまくいかない場合)

3×FLAG モチーフ部を作成済みの pRetroX-TetOne-*IRX1* ベクターへ組み込み、3×FLAG-*IRX1* 発現ベクターを作製する。このベクターを KPAM1 へ導入した後に、抗 FLAG 抗体で ChIP を行う。

#### IRX1 下流パスウェイの探索

KPAM-Tet-*IRX1* を用いて、*IRX1* 発現あり/なしの双方の細胞で RNA-Seq を行う。そこで得られたデータを基に GO 解析を行い、*IRX1* の下流のパスウェイを探索する。

#### 4. 研究成果

##### IRX1 が巨核球分化に関わる転写因子であることの証明

KPAM1 に IRX1 を組み込んだレトロウイルスベクター (pRetroX-IRES-ZsGreen1) を感染させ、IRX1 を過剰発現させた。それらの細胞を最適な条件下で培養し、トランスダクション後 day 2, 4, 6, 10 で細胞増殖を観察した。生細胞数の測定には Cell Counting Kit-8 を用いた。

図1に示す通り、IRX1 を過剰発現させた細胞では (IRX1-WT)、手を加えていない細胞 (Empty vector) に比較して有意差をもってその増殖が抑制されていた。

次に KPAM1-Tet-IRX1 とそれにドキシサイクリンを添加して IRX1 を発現させた KPAM1-IRX1 の細胞を用いて細胞周期解析を行った。図2に示すように、KPAM1-Tet-IRX1 に比較して、KPAM1-IRX1 では G1-phase が有意に増加し、S-phase が有意に減少していた。上の結果と考え合わせると、IRX1 発現群で細胞増殖が抑制されていたのはアポトーシスではなく、細胞周期が停止していることに起因することが示された。

KPAM1-Tet-IRX1 と KPAM1-IRX1 から抽出した RNA を用いて行った Real-time PCR では、図3に示すように巨核球・赤芽球系特異的遺伝子の発現上昇を認め、IRX1 は巨核球分化にも関わる転写因子であることを明らかにした。

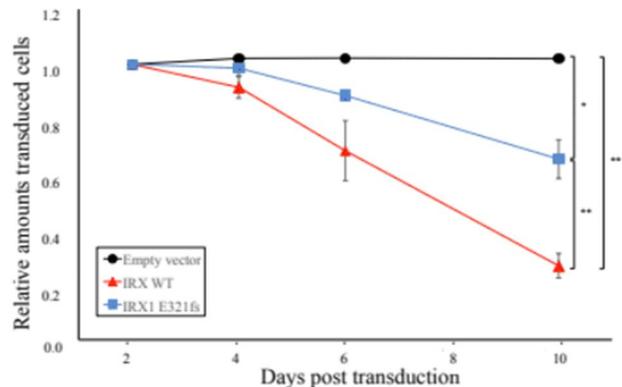


図1 細胞増殖曲線

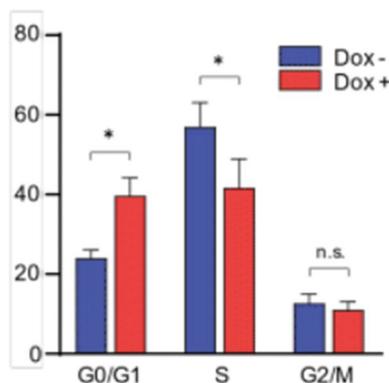


図2 細胞周期解析

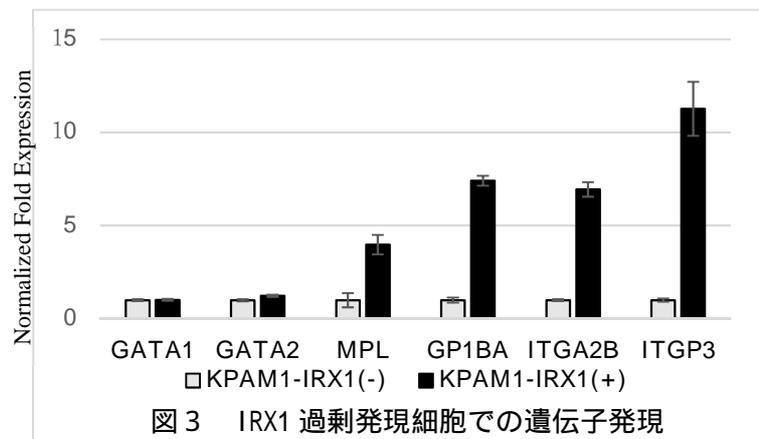


図3 IRX1 過剰発現細胞での遺伝子発現

##### ChIP-Seq による IRX1 の標的遺伝子の同定

市販の抗 IRX1 抗体は免疫沈降グレードではなく work しなかった。そのため抗 FLAG 抗体を用いた方法で ChIP を行い、得られた材料で次世代シーケンサーにてシーケンスを行ったが、IRX1 の標的遺伝子の同定はできなかった。

##### IRX1 下流パスウェイの探索

KPAM1-Tet-IRX1 と KPAM1-IRX1 から抽出した RNA を用いて実験を行った。GO 解析では、巨核球系特異的遺伝子ではなく、赤芽球系特異的遺伝子である複数の Hb 遺伝子の発現上昇が確認された (データ未掲載)。IRX1 は赤芽球系分化により強く関連している転写因子である可能性と推察され、今後継続して研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在論文投稿中である

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	土岐 力  (Tutomu Toki)  (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師    (11101)	
研究 分 担 者	金崎 里香  (Rika Kanazaki)  (60722882)	弘前大学・医学研究科・助教    (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------