

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 年度～2009 年度
 課題番号：19390022
 研究課題名 (和文) 巨核球の分化・成熟に関与する転写因子群の機能解析と血小板減少症モデルマウスの作成
 研究課題名 (英文) Transcription factors regulating normal and pathological platelet differentiation
 研究代表者
 土井 健史 (DOI TAKEFUMI)
 大阪大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：00211409

研究成果の概要 (和文) : 造血幹細胞から血小板が産生される分化メカニズムを明らかにするために、家族性血小板減少症に関連する RUNX1 遺伝子の解析を行った。その結果、RUNX1 は血小板系列特異的に発現する PF4 遺伝子のプロモーターに結合し、ETS-1、FLI-1 と協調的に PF4 を活性化した。しかし、血小板減少症患者に見られる RUNX1 変異体は、プロモーターを活性化できなかった。そこで、生理的条件下の正常型、変異型 RUNX1 の機能を評価し、モデルマウス作製へと応用するため血小板系列特異的に外来遺伝子を強制発現できる ES 細胞分化系を構築した。

研究成果の概要 (英文) : To understand the molecular mechanism for platelet production from hematopoietic stem cells, we focused on the Runx1 gene, which is closely related to familial platelet disorder (FPD). In the current study, RUNX1 is shown to bind to the promoter sequence of the PF4 gene, which is expressed only in platelet lineage, and cooperatively activate the promoter with ETS family proteins, ETS-1 and FLI-1. On the other hand, RUNX1 mutants found in the FPD patients could not activate the promoter. To understand the functional difference between wild type and mutant RUNX1 in physiological platelet differentiation, a novel ES cell differentiation system was established, in which exogenous genes can be overexpressed only in platelet lineage

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：血小板、遺伝子発現制御、分化、RUNX1

1. 研究開始当初の背景

血小板は造血幹細胞から産生され、止血、血管修復等の重要な役割を担っている。1994年に発見されたトロンボポエチンは、血小板産生を強く促進する因子であり、血小板減少症の治療に用いられることが期待された。しかし、生体における中和抗体の生成等、臨床応用は困難であることが明らかとなり、トロンボポエチンに代わる血小板減少症治療薬の開発が強く望まれていた。このため、造血幹細胞からどのように血小板へと細胞が分化するのかについてのメカニズムの解明は急務であったが、国内外において本研究の大きな進展は見られていなかった。

著者らは、造血幹細胞から血小板への分化成熟メカニズムを解明するために、血小板系列の遺伝子発現制御に関する転写因子の同定を目的に研究を進め、血小板系列特異的に発現する血小板第4因子 (PF4) の発現制御機構についての解析から、血小板の分化成熟を制御する可能性のある候補転写因子として、RUNX1、MEIS1、USFをはじめとする11種の転写因子の同定に成功していた。そこで、これらの転写因子がPF4遺伝子をどのようなメカニズムで発現制御するのか、また、血小板の分化成熟にどのように関与するのかを解明することで、血小板の分化成熟機構の詳細を解明しようと考えた。

2. 研究の目的

(1) 転写因子 RUNX1 が PF4 遺伝子の発現を制御するメカニズムを明らかにする。

(2) 家族性血小板減少症に見られる RUNX1 遺伝子への変異が血小板減少症を引き起こすメカニズムを提唱する。

(3) 血小板減少症モデルマウス作製のために必要となる、血小板系列特異的に遺伝子を強制発現させるシステムを構築する。

3. 研究の方法

(1) RUNX1 が結合する PF4 プロモーター中の配列をゲルシフトアッセイにより同定する。また、RUNX1 と協調的に PF4 プロモーターを活性化する転写因子をレポーター遺伝子アッセイにより同定する。

(2) 正常型 RUNX1 と RUNX1 変異体の機能の違いを、レポーター遺伝子アッセイにより解析する。

(3) PF4 プロモーターに GFP 遺伝子を連結させた配列をもつ ES 細胞を作製し、これを *in vitro* で血小板へと分化させる際に、血小板系列特異的に遺伝子を強制発現させることができるかを検証する。

4. 研究成果

(1) PF4 プロモーターに含まれる 8 箇所の RUNX1 結合モチーフを含むプローブと RUNX1 タンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、6 箇所のサイトに RUNX1 が結合することが明らかとなった。また、RUNX1 と ETS ファミリーの転写因子の発現ベクターを用いたレポーター遺伝子アッセイから、ETS-1、FLI-1 が RUNX1 と協調的に PF4 プロモーターを活性化することが明らかとなった。

(2) 家族性血小板減少症に見られる 10 種の RUNX1 変異体を用いてレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、変異型 RUNX1 では、天然型 RUNX1 でみられた ETS-1、FLI-1 との協調的な転写活性化は見られず、正常型と比べ PF4 プロモーター活性は、80%以上減少することが明らかとなった。この結果から、家族性血小板減少症にみられる RUNX1 遺伝子への変異は、血小板系列に特異的に発現する遺伝子の発現を大きく減少させることが明らかとなり、この現象が血小板産生を妨げることで血小板減少症が発症する可能性が示された。

(3) PF4 プロモーターに GFP 遺伝子を連結させたトランスジーン 1 コピーをマウス ES 細胞の Hprt 遺伝子の 5' 上流に相同組換えにより挿入した。得られた ES 細胞を骨髓ストローマ (OP9) 細胞上で 5 日間培養することで、FLK-1 陽性の中胚葉系細胞へ誘導後、さらに新しい OP9 細胞上で 5 日間トロンボポエチンを含む培地で巨核球、血小板系列へと分化させた。分化後の細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、GFP を強く発現する細胞、包帯突起を形成する細胞が確認された (下図)。さらに、

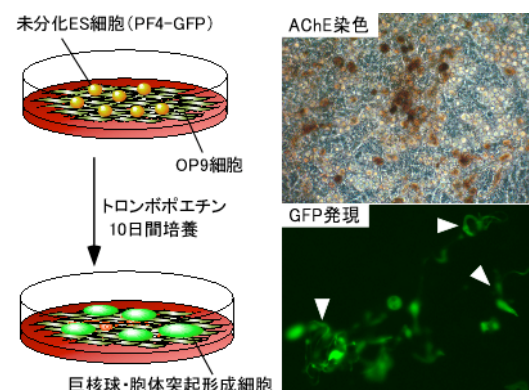


図1 血小板系列特異的に外来遺伝子を強制発現できる血小板分化システム

CD41 抗体を用いた FACS 解析、アセチルコリンエステラーゼ染色の結果から、血小板系列

特異的に GFP が発現していることが明らかとなった。本結果から、RUNX1 変異体の機能解析、血小板減少症モデルマウス作製のための基盤技術を構築できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 岡田欣晃、土井健史、*in vitro* と *in vivo* で異なるレポーター遺伝子アッセイの結果、生産と技術、査読無、62 巻、2010、51-56
- ② N. Yamano, T. Kimura, S. Watanabe-Kushima, T. Shinohara, T. Nakano, Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 392, 2010, 311-316
- ③ 岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞の遺伝子発現制御研究からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性、生化学、査読無、80 巻、2009、117-121
- ④ K. H. Baek, A. Zaslavsky, R. C. Lynch, C. Britt, Y. Okada, R. J. Siarey, M. W. Lensch, I. H. Park, S. S. Yoon, T. Minami, J. R. Korenberg, J. Folkman, G. Q. Daley, W. C. Aird, Z. Galdzicki, S. Ryeom, Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1, *Nature*, 査読有, Vol. 459, 2009, 1126-1130
- ⑤ J. Liu, Y. Kanki, Y. Okada, E. Jin, K. Yano, S.-C. Shih, T. Minami, W. C. Aird, A +220 GATA motif mediates basal but not endotoxin-repressible expression of the von Willebrand factor promoter in Hprt-targeted transgenic mice, *J. Thromb. Haemost.*, 査読有, Vol. 284, 2009, 22195-22205
- ⑥ E. Jin, J. Liu, J. Suehiro, L. Yaun, Y. Okada, V. Nikolova-Krstevski, K. Yano, L. Janes, D. Beeler, K. Spokes, E. Regan, S. C. Shih, P. Oettgen, T. Minami, W. C. Aird, Differential roles for ETS, CREB and EGR binding sites in mediating VEGF receptor 1 expression in vivo, *Blood*, 査読有, Vol. 114, 2009, 5557-5566
- ⑦ K. Kojima, S. Kuramochi-Miyagawa, S. Chuma, T. Tanaka, N. Nakatsuji, T. Kimura, T. Nakano, Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cell, *Genes. Cells.*, 査読有, Vol. 14, 2009, 1155-1165

- ⑧ E. Sakai, K. Kitajima, A. Sato, T. Nakano, Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation, *Exp. Hematol.*, 査読有, Vol. 37, 2009, 334-345
- ⑨ Y. Okada, E. Jin, V. Nikolova-Krstevski, K. Yano, J. Liu, D. Beeler, K. Spokes, M. Kitayama, N. Funahashi, T. Doi, L. Janes, T. Minami, P. Oettgen, W. C. Aird, A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression in vivo, *Blood*, 査読有, Vol. 112, 2008, 2336-2339
- ⑩ D. Sugiyama, M. Tanaka, K. Kitajima, J. Zheng, H. Yen, T. Murotani, A. Yamatodani, T. Nakano, Differential context-dependent effects of friend of GATA-1 (FOG-1) on mast-cell development and differentiation, *Blood*, 査読有, Vol. 111, 2008, 1924-1932
- ⑪ Y. Okada, K. Yano, E. Jin, N. Funahashi, M. Kitayama, T. Doi, K. Spokes, D. L. Beeler, S.-C. Shih, H. Okada, T. A. Danilov, E. Maynard, T. Minami, P. Oettgen, and W. C. Aird, A Three-Kilobase Fragment of the Human Robo4 Promoter Directs Cell Type-Specific Expression in Endothelium, *Circulation Research*, 査読有, Vol. 100, 2007, 1712-1722

[学会発表] (計 5 件)

- ① 渡邊美穂、米倉正哲、仲井友子、登 治謙、志水美己子、岡田欣晃、土井健史、家族性血小板減少症患者にみられる変異型 RUNX1 の機能解析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山桃太郎アリーナ (岡山県)
- ② 登 治謙、渡邊美穂、米倉正哲、志水美己子、仲井友子、岡田欣晃、土井健史、-51 ETS サイトを介する PF4 遺伝子の発現制御メカニズムの解明、第 8 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム 2009、2009 年 11 月 14 日、名古屋市立大学田辺通キャンパス (愛知県)
- ③ 登 治謙、渡邊美穂、米倉正哲、岡田欣晃、土井健史、血小板第 4 因子遺伝子の発現制御における -51 ETS サイトの役割、第 10 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2009 年 6 月 19 日、日本薬学会長井記念ホール (東京都)
- ④ 登 治謙、渡邊美穂、米倉正哲、岡田欣晃、土井健史、-51 ETS サイトを介する血小板第 4 因子遺伝子の発現制御機構の解析、日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館
- ⑤ 渡邊美穂、北山美絵、原 敏郎、米倉正哲、登 治謙、山崎大典、William Aird、北島

健二、仲野 徹、岡田欣晃、土井健史、家族性血小板減少症(FPD)に見られる RUNX1 変異体を血小板系列特異的に発現する ES 細胞株の樹立、Biochemistry and Molecular Biology 2008、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 健史 (DOI TAKEFUMI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00211409

(2) 研究分担者

岡田 欣晃 (OKADA YOSHIAKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：50444500

仲野 徹 (NAKANO TORU)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：00172370