

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591204

研究課題名（和文） 細胞分化におけるエピジェネティックパターン成立機構の解明

研究課題名（英文） Establishment of epigenetic pattern during cell differentiation

研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA KENJI)

財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：10346132

研究成果の概要（和文）：マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の試験管内分化誘導システムを用いて、赤血球の最終分化に必須な転写因子 GATA-1 による赤血球系列特異的なエピジェネティックパターン成立機構の解析をおこなった。その結果、GATA-1 は、多能性造血前駆細胞から赤血球系列への運命決定において、赤血球系列固有のエピジェネティックパターン成立に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using mouse embryonic stem cell differentiation induction system, we investigated the role of GATA-1, required for terminal erythroid differentiation, on establishments of erythroid-specific epigenetic pattern. We found that GATA-1 would establish the erythroid-specific epigenetic pattern during cell fate determination from multipotent hematopoietic progenitor cells into erythroid lineage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・血液内科学

キーワード： 血液内科学

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA-1 は、赤血球の最終分化に必須であり、GATA-1 を欠損したマウス赤血球系細胞は、前赤芽球以降の分化が阻害される。

野生型前赤芽球は、本来、限られた細胞増殖能と赤血球へ分化する能力しか有しない分化多能性細胞であるが、我々は、GATA-1 遺伝子を欠損させたマウス

胚性幹細胞（ES 細胞）を赤血球方向へ試験管内で分化誘導した結果、GATA-1 欠損前赤芽球が、好中球・マクロファージなど、他の血液細胞へ分化する能力（分化多能性）と試験管内における自己複製能を有していることを見出した。

2. 研究の目的

GATA-1 欠損による分化多能性獲得の分子基盤を探ることが目的である。本来、

多能性造血前駆細胞は、分化系列の運命決定を経て分化多能性を失い、単能性造血前駆細胞へ分化する。この過程において、細胞系列特異的なエピジェネティックパターンが形成されるものと考えられているが、どのような分子機構で、細胞系列特異的に、エピジェネティックパターンが成立しているのか、は不明なままである。そこで、GATA-1 欠損が、赤血球固有のエピジェネティックパターン成立に及ぼす影響について探ることを目的とした。

3. 研究の方法

GATA-1 遺伝子を Cre DNA リコンビナーゼにより、コンディショナルに欠損させることのできる ES 細胞株 (GATA-1^{loxP} ES 細胞) を樹立し、この細胞を OP9 ストロマ細胞により、赤血球へ試験管内分化誘導をおこなった。この赤血球への分化誘導過程において、レトロウイルスベクターを用いて、Cre リコンビナーゼを強制発現させることにより、GATA-1 遺伝子の欠損を誘導し、分化段階特異的に GATA-1 の欠損を誘導した場合に得られる赤血球系細胞の解析をおこなった。

4. 研究成果

GATA-1^{loxP} ES 細胞を OP9 ストロマ細胞との共生培養により、試験管内分化誘導をおこなった。分化誘導開始から 5 日目にエリスロポエチン (EPO) を添加し培養した場合、12 日目には、脱核した成熟赤血球が多数認められた。一方、GATA-1 遺伝子を未分化 ES 細胞の段階で欠損させ、その ES 細胞を赤血球方向へ試験管内分化誘導をおこなった場合、前赤芽球 (GATA-1^{ES-Cre} 前赤芽球) は、成熟赤血球への最終分化能を失うとともに、EPO に依存した自己複製をおこなった。

この GATA-1^{ES-Cre} 前赤芽球は、好中球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)・インターロイキン-3 (IL-3)、存在下で培養すると、好中球・マクロファージ・マスト細胞などに分化し、分化多能性を有することが明らかとなり、先行研究の実験結果を再現することが出来た。

ついで、GATA-1^{loxP} ES 細胞を前赤芽球まで分化誘導後、GATA-1 遺伝子を欠損させた。その結果、成熟赤血球への最終分化は阻害され、前赤芽球 (GATA-1^{ProE-Cre} 前赤芽球) が EPO 依存的に自己複製をおこなうことが示された。しかし、GM-CSF・IL-3 の添加による好中球などへ

の分化は、認められず、分化多能性を持たないことが判明した。したがって、ES 細胞の段階で、GATA-1 遺伝子を欠損した場合、得られる前赤芽球は、自己複製能・分化多能性を有するが、前赤芽球において、GATA-1 遺伝子を欠損した場合、自己複製能は獲得するが、分化多能性は、獲得できないことが判明した。

さらに、分化多能性を示す GATA-1^{ES-Cre} 前赤芽球は、EPO 存在下においても、好中球・マクロファージなどの分化に関与している転写因子 PU.1 の強制発現によって好中球へ分化するのに対し、GATA-1^{ProE-Cre} 前赤芽球は、PU.1 の過剰発現による好中球分化は認められないことが見出された。一方、両者とも GATA-1 の強制発現では、成熟赤血球へ分化した。

この両方の前赤芽球の遺伝子発現を比較した結果、GATA-1^{ES-Cre} 前赤芽球において、好中球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の受容体である GM-CSFR α が強く発現していることが見出された。一方、GATA-1^{ProE-Cre} 前赤芽球と野生型前赤芽球では、GM-CSFR α の発現は低く保たれていた。

GM-CSFR α の発現は多能性造血前駆細胞で認められることから、本来は、多能性造血前駆細胞から赤血球系列への運命決定段階で GM-CSFR α の発現が抑制されるものと推定できる。そして、GATA-1 は、この発現抑制に関与しているものと考えられた。また、赤血球系細胞への分化にともなう、GATA-1 による GM-CSFR α の発現抑制は不可逆的であり、前赤芽球へ分化後に GATA-1 を欠損させても、GM-CSFR α の発現抑制は、解除されないことが判明した。

赤血球系列への運命決定における GATA-1 による GM-CSFR α の発現抑制が不可逆的であるという実験事実は、この発現抑制がエピジェネティック修飾によるものである可能性を惹起させた。そこで、野生型前赤芽球をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理した結果、GM-CSFR α の発現が認められ、ヒストン脱アセチル化が GM-CSFR α の発現抑制に関与しているものと考えられた。

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7件)

1. 北島 健二, 原 孝彦
iPS細胞から造血幹細胞の誘導.
医学のあゆみ 239:1397-401 (2011)
(査読なし)
2. Okada Y, Nobori H, Shimizu M, Watanabe M, Yonekura M, Nakai T, Kamikawa Y, Wakimura A, Funahashi N, Naruse H, Watanabe A, Yamasaki D, Fukada S, Yasui K, Matsumoto K, Sato T, Kitajima K, Nakano T, Aird WC, Doi T
Multiple ETS Family Proteins Regulate PF4 Gene Expression by Binding to the Same ETS Binding Site.
PLoS ONE 6:e24837 (2011)
doi: 10.1371 (査読あり)
3. Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T
In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2.
Blood 117:3748-58 (2011)
doi: 10.1182 (査読あり)
4. Huang C, Cheng J, Kitajima K, Nakano T, Yeh C, Chong K, Tseng C
Disabled-2 is required for mesoderm differentiation of murine embryonic stem cells.
J Cell Physiol 225:92-105 (2010)
doi: 10.1002 (査読あり)
5. Ohbayashi K, Tanaka K, Kitajima K, Tamura K, Hara T
Novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of cyclin-D2, E-cadherin and integrin-alpha family genes in mouse spermatocyte-derived cells.
Genes Cells 15:699-710 (2010)
doi: 10.1111 (査読あり)
6. Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, Eto K, Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M
Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells.
Biochem Biophys Res Commun 366:763-8 (2009)
doi: 10.1016 (査読あり)
7. Sakai E, Kitajima K, Sato A, Nakano T
Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation.

Exp Hematol 37:334-45 (2009)
doi: 10.1016 (査読あり)

[学会発表] (計9件)

1. Kodaka Y, Kitajima K, Matsuda R, Hara T
Ectopic expression of Lhx2 in muscle satellite cells inhibits their myotube differentiation.
The 34th Annual Meeting of the Molecular biology Society of Japan
Yokohama, December 12-16 (2011)
2. Kitajima K, Hara T
Effects of ectopic expression of LIM-homeobox transcription factor lhx2 on in vitro differentiation of ESCs/iPSCs.
44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
Ginowan, May 18-21 (2011)
3. Kitajima K, Hara T
In vivo analyses of mouse iPSC-derived HSC-like cells generated by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2.
The 9th Stem Cell Research Symposium
Tokyo, May 13-14 (2011)
4. Kitajima K, Hara T
Induction and expansion of pluripotent stem cells-derived engraftable hematopoietic progenitor cells by LIM-homeodomain transcription factor lhx2.
5th International Symposium on GATA factors
Sendai, November 17-19 (2010)
5. Kitajima K, Zheng J, Minehata K, Nakano T, Hara T
Long-term repopulation of adult hematopoiesis by in vitro differentiated blood cells from ESCs/iPSCs by LIM homeobox transcription factor, Lhx2.
The 8th Stem Cell Research Symposium
Awaji, May 13-15 (2010)
6. Minehata K, Kitajima K, Hara T
The role of Foxo1 in the development of hematopoietic cells.
DECODE Winter Workshop 2010
Yuzawa, January 18-20 (2010)
7. Kitajima K, Zheng J, Minehata K, Nakano T, Hara T
Induction of in vivo hematopoiesis-repopulating cells from mouse pluripotent stem cells by LIM-homeobox transcription factor, lhx2.

DECODE Winter Workshop 2010
Yuzawa, January 18-20 (2010)

8. Minehata K, Kitajima K, Hara T
The role of Foxo1 in the development of hematopoietic cells.
The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
Yokohama, December 9-12 (2009)
9. Kitajima K, Zheng J, Nakano T
Establishment and effects of epigenetic pattern regulated by a tissue specific transcription factor.
The 7th Stem Cell Research Symposium
Tokyo, May 15-16 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA KENJI)
財団法人東京都医学総合研究所・生体分子
先端研究分野・主席研究員
研究者番号：10346132

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし