様式Ｃ－１９

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　4 月　13 日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：　2009　～　2011
課題番号：21591208
研究課題名（和文）
転写因子ネットワーク内の HUB 分子が細胞分化能力へ与える影響の分子論的解明
研究課題名（英文）
Molecular analysis of effects of HUB molecules in transcription factor network on cell differentiation
研究代表者
坂本 比呂志（SAKAMOTO HIROSHI）
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：00347014

研究成果の概要（和文）：
血液細胞の増殖分化に必須な転写因子 c-Myb タンパク質をモニターできる c-myb レポーターマウスを作成し樹立した（世界初）。このマウスにより各種前駆細胞および血液幹細胞の c-Myb 発現が確認でき現在までに報告のない新しい細胞画分を同定した。さらに血液幹細胞において、多くの細胞（～90％）は c-Myb 陽性であったが、c-Myb 陰性画分とは異なった性格を示した。

研究成果の概要（英文）：
I established a new mouse line reporting the endogenious c-Myb protein level. By using these mice, it was evident that various types of hematopoietic progenitors and stem cells expressed c-Myb, some of which have never been reported before. Also, in hematopoietic stem cell population, c-Myb labeles around 90% of them, which presented futures different form c-Myb positive cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：細胞分化、転写因子、c-myb

１．研究開始当初の背景

c-myb は、幼弱な血液細胞における細胞増殖への重要性が古くより知られている。ES 細胞試験管内分化系を用いた先の研究により、

c-Myb は、様々な血液細胞系譜において色々な分化段階でその発現量を変化させ、細胞分化を制御していることを明らかにした。その変化は ON/OFF と言った単純なものではなく、微妙に変化していることを示した。同様な報告が、様々な遺伝子改変マウス等の解析からなされている。実際に、c-myb mRNA の量は microRNA (miRNA150) によって制御され、B 細胞や赤芽球/巨核球の分化において関与する。また、c-Myb タンパク質も、様々な転写後修飾により量的に制御されている。近年、c-myb が T-ALL (T cell acute lyphoblastic leukemia) [(3)] や APL (Acute Promyelocytic Leukemia)で見られる PML body に関与すること[(4)]も報告されており、その制御機構の攪乱が病因となることを示している。このように c-myb の重要性は広く知られているが、c-myb の発現制御機構の複雑さにより、内在性の c-myb のレポーターES 細胞やマウスは現在まで存在していない。そこで、本研究は　内在性の c-Myb タンパク質をモニターすることにより、臓器特異的ノックアウトマウスでは検討不可能な c-Myb 発現量による細胞分画が可能となり、血液細胞分化機構の解明に新規性をもたらすと考える。

２．研究の目的

様々な転写因子ネットワークに共通な基本概念の解明を最終目標とする。そこで、転写因子ネットワーク内の HUB 分子の重要性を明らかにする為に、転写因子 c-Myb を HUB と捉え、その量的変動により制御されている血液細胞分化を解析の手段として研究を進めていく。

具体的には、 1) リンパ球および赤芽球/巨核球系譜における c-Myb 発現量変化による分化能の変化への影響を調べ　その分子機構を解明する。

2) c-Myb による核内ダイナミクスの変化と細胞分化との関連を明らかにする。

3) c-myb 遺伝子の細胞系譜特異的な転写調節機構の解明。

３．研究の方法

〈1〉　＜c-myb レポーターES 細胞の樹立＞

EGFP を c-myb 遺伝子の c 末端領域にノックインし、EGFP 融合 c-Myb (c-MybEGFP) の発現をモニターする。

〈2〉　＜c-myb レポーターマウス作成＞

上記 c-myb レポーターTT2 ES 細胞 (c-mybEGFP /TT2) の樹立後、すぐにノックインマウスの作成を行う。

〈3〉　＜細胞系譜決定機構の解明＞

上記の c-myb レポーターマウスを用いて、前駆細胞を蛍光強度に応じて分画し、その能力と他の細胞系譜特異的遺伝子の発現を検討する。

「リンパ球系譜への影響」「赤芽球/巨核球系譜への影響」

さらに、単一細胞毎の分化能力の変化に着目する。分化能力と c-Myb 発現のバラツキは、多分化能の細胞集団内の heterogeneity を反映すると考えている。細胞集団内の EGFP の発現量を分画し、数時間の再培養培養後の分化能力と c-Myb 発現量のバラツキの間の変化を比較する。ある細胞集団内には、可塑的な変化が一定時間内は認められるが、その後は変化が固定されることが ES 細胞等の研究から推察される。そこで、その瞬間に細胞内で何が起こっているのかを、免疫染色、FISH, クロマチン沈降 (ChIP) 等を用いて検討し、可逆的変化と不可逆的変化の間 (単なる分子の「ゆらぎ」が決定事項として決まる瞬間) の分化制御機構に迫る。

４．研究成果

上記の研究計画<1>は、上手くいき、マウスの作成に取りかかり、c-myb レポーターマウスの樹立に成功した（世界初）。このマウスはC57/BL6（CD45.2）のES細胞により樹立を行ったため、即座に C57/BL6（CD45.1）マウスへの細胞移植および解析が現在可能である（C57/BL6（CD45.2）への backcross の必要がない）。さらに、ホモマウスも同様に誕生し、安定的に維持している。この結果は、導入したレポーターが、高いレベルで生体内のc-Mybタンパク質の機能を相補していることを示している。転写因子によるChIP（クロマチン免疫沈降法）は難易度が高いが、このマウスは抗 EGFP 抗体を用いる事により問題を回避できる（詳細後述）。

このマウスからは、EGFP発現を基にした新しい細胞集団も前駆血液細胞集団に見出している。また、血液幹細胞（HSC）画分においても EGFP の発現が見られた。この発現の詳細を検討するためにHSCをCD34を用いて、LT-HSCとST-HSCに分離した。驚いたことに、EGFPは両画分において発現が見られた。そこで、LT-HSC における EGFP 発現を　他のLT-HSCマーカーで確認した。$CD150^{+}CD48^{-}$-KSLおよびSide Population-KSLの両者においても EGFP は発現していた。この結果は、血液細胞の増殖に必須と考えられているc-mybが、LT-HSC(大半が G0 期)においても発現し、機能していることを示唆している。そこで、LT-HSCをsorting後、C57/BL6（CD45.1）への移植を行った。$EGFP^{+}CD34^{-}$KSL と$EGFP^{dull}CD34^{-}$KSL（$EGFP^{-}$とEGFP弱陽性を含む）には、明かな能力的差異が存在していた。現在、この点に着目し、研究を続行している。

これらの細胞現象を分子に結びつけるアプローチとして以下を行っている。

次世代シークエンサーによる以下の網羅的解析（共同研究）

○ $EGFP^{+}CD34^{-}$KSL と $EGFP^{dull}CD34^{-}$KSL の間の遺伝子発現の差

LT-HSCにおけるc-myb制御遺伝子の同定。さらに、これら遺伝子による LT-HSC 機能の制御機構への研究の進展

○ c-MybEGFP 発現細胞画分での c-Myb タンパク質の結合領域の探索

c-myb が各種の細胞分化も制御していることから、細胞画分毎の結合領域の変化を調べる。細胞分化におけるクロマチンの構造変化を追跡するツールになると考えている。

上記 2 つの解析を結びつけることで、c-Mybタンパク質の転写因子ネットワークにおける役割を明らかできると考えている。また、c-myb の血液幹細胞における新しい役割も明らかになっており、幹細胞における heterogeneity を視野に入れて研究を続けている。

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　3　件）

① Ishida M, El-Mounayri O, Kattman S, Zandstra P, Sakamoto H, Ogawa M, Keller G, Husain M*.　Regulated Expression and Role of c-Myb in the Cardiovascular-Directed Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells.　*Circ Res.* 2012, 110: 253-64. 査読有

② Tsuji-Tamura K, Sakamoto H, and Ogawa M*. ES cell differentiation as a model to study cell biological regulation of vascular development.　‘ Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis ’ ed. Craig Atwood, ISBN 978-953-307-196-1, INTECH, Vienna,

Austria, pp581-606. (2011) 査読無し

③ Sakamoto H*, K. Tsuji-Tamura and M. Ogawa. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines (Review). *Int. J. Hematol.* 2010, 91: 384-391 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

①田村-辻 潔美、坂本 比呂志、朴 勝煥、小川峰太郎
The role of Foxo1 transcription factor in vascular development
第 8 回心血管幹細胞研究会 2011 年 1 月 14 日- 15 日 東京 品川プリンスホテル

②坂本比呂志、田村潔美、小川峰太郎
Bone Marrow Hematopoiesis from ES Cell-Derived Progenitor Cells
CREST/さきがけ「iPS 細胞」研究領域合同シンポジウム 2011 年 1 月 14 日 東京 日本科学未来館

〔その他〕
ホームページ等
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_differentiation/

6．研究組織

(1)研究代表者

坂本 比呂志 (SAKAMOTO HIROSHI)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：00347014