

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790919

研究課題名（和文） 造血幹細胞の幹細胞性を維持するZNF521遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of ZNF521 in hematopoietic cell differentiation

研究代表者

山之内 純 (YAMANOUCHI JUN)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10423451

## 研究成果の概要（和文）：

われわれは転写因子である Zinc finger protein 521 (ZNF521) を発現抑制することによって、多分化能を有する未熟白血病細胞株が赤血球系に分化することを明らかにした。さらに、ZNF521 は GATA-1 と直接結合し、GATA-1 の機能を負に制御することによって造血幹細胞の分化を抑制することを明らかにした。このことは、ZNF521 が造血幹細胞の幹細胞性 (“stemness”) を維持するのに重要な分子であることを強く示唆している。

## 研究成果の概要（英文）：

ZNF521 (zinc finger protein 521) is a transcription factor with an N-terminal transcriptional repressor motif and 30 zinc finger domains. Although a high expression level of ZNF521 in human CD34+ progenitors and hematopoietic malignancies has been demonstrated, the functional role of ZNF521 in hematopoietic cell differentiation has not been clarified. In this study, we analyzed the role of ZNF521 in erythroid cell differentiation using the short hairpin RNA (shRNA)-mediated gene silencing method.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液内科学

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：ZNF521, Evi3, 赤血球

## 1. 研究開始当初の背景

Zinc finger protein 521 (ZNF521) は、

ヒトCD34陽性造血幹細胞に高発現しているが、血液細胞の分化に伴いその発現が低下す

る興味深い転写因子である。また、多くの急性骨髄性白血病細胞においても高発現していることが報告されており、造血幹細胞の腫瘍化における役割も注目に値する (Blood 103(6), 2062-2070, 2004)。このような背景のもと、われわれは現在この興味ある転写因子ZNF521の血球分化における働きを解析している。

慢性骨髄性白血病急性転化由来細胞であるK562細胞と赤白血病由来細胞であるHEL細胞にZNF521のsiRNAを導入することにより、その発現を抑制し、細胞の機能的、形態学的変化を解析した。その結果、ZNF521発現を抑制したクローンではコントロールと比較して、glycophorin Aやヘモグロビンなどの赤血球の分化を示す遺伝子ならびにタンパク質発現の著しい増加が認められた。以上の結果より、転写因子であるZNF521の発現を抑制することによって、多分化能を有する未熟造血細胞株が赤血球系に分化することを初めて明らかにした。さらに、ZNF521は赤血球分化に必須の転写因子であるGATA-1と直接結合し、GATA-1の機能を負に制御することによって造血幹細胞の分化を抑制することを明らかにした。このことは、ZNF521が造血幹細胞の幹細胞性 (“stemness”) を維持するのに重要な分子であることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果をもとに、マウスES細胞においてZNF521のマウスホモログであるEvi3遺伝子をノックダウンし、その分化増殖における影響を検討する。さらに、Evi3ノックアウトマウスを作製し、その生体内での機能を網羅的に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) siRNAの作製とその遺伝子発現抑制効果の確認

まずマウスEvi3 messenger RNAを分断するshort interfering RNA (siRNA) 配列を決定するためにマウスEvi3の配列からノックダウンする確率が高い配列を選ぶ。マウスの細胞において、short hairpin構造によるセンス、アンチセンスRNA配列をU6 RNAプロモーターを使って導入し二本鎖RNAが細胞内で形成できるようにする。この系で作られたsiRNAの効果は、マウスNIH3T3細胞にsiRNAをトランスフェ

クトし、RT-PCR法を用いて確認する。コントロールのsiRNAはノックダウンできたマウスEvi3のsiRNA配列から3ないし4のコドンを変化させた mismatches siRNA を作製する。これと同じようにマウスNIH3T3細胞にトランスフェクトして、マウスEvi3の発現がトランスフェクトしていない細胞と変わらないことを確認する。

### 2) ES細胞の分化

マウスES細胞は、赤芽球、赤血球への分化の効率が良いとされるR1クローン (F1 cross 129/Sv x 129/Sv-CP inbred sub-strains) を用いる。ES細胞とマウスOP9ストローマ細胞 (C57BL/6 x C3H) F2-osteopetrosis (op/op) マウスから確立した骨髄ストローマ細胞で、macrophage colony-stimulating factorを欠失している。この細胞は、ES細胞から血液細胞、血管内皮細胞を含む中胚葉系への分化が促進することが証明されている。) との共培養を行う。培養5日目までに出現する中胚葉細胞にerythropoietin (EPO) を加えて引き続きOP9ストローマ細胞と共培養する。培養8日目から新しいOP9ストローマ細胞とEPO存在下に共培養を続けることで、赤芽球系細胞を培養12-13日までに得ることができる。

### 3) siRNAのES細胞への導入 (レンチウイルスを用いて)

siRNA効果を発揮するRNA配列とコントロールsiRNA配列を、GFPをマーキングとしたレンチウイルスベクターを用いてES細胞に導入する方法と、薬剤耐性をもつベクターを用いてES細胞に導入しクローンを確立する方法をとる。レンチウイルスベクターは、ES細胞の分化後においても遺伝子のsilencingが発生しないため、未分化ES細胞にも遺伝子導入できる。しかし、今回はレンチウイルスベクターによる導入遺伝子のintegrationには1-2日必要なこと、siRNA形成後dicerによってmRNAの分断が開始されるまで2日以上必要なことを前提条件として考慮し、未分化ES細胞ではなく分化開始5日目のES細胞由来中胚葉細胞において感染させる。その後、赤芽球系細胞に分化させてコントロールと比較して検討する。

### 4) siRNAのES細胞への導入 (クローンを樹立)

すでに同様に、マウスEvi3をノックダウンすることを確認したsiRNAを2種類導入したマウス細胞への発現ベクターを作っており、このベクターを利用する。

クローンを確立する方法は、このベクターをES細胞にelectroporationを用いて導入し、その後、耐性薬剤と培養することでクローンを確立する。その後、ES細胞を赤芽球系細胞に分化させてコントロールと比較して検討する。

#### 5) Evi3欠損マウスの作製

Evi3遺伝子を欠損したマウスを作製する。

#### 6) Evi3ノックダウンES細胞の分化に関する検討

まず、上記した方法で作製したEvi3 siRNA導入ES細胞の遺伝子発現をコントロールES細胞と網羅的に比較検討する。次に、赤芽球系分化に関する影響を、glycophorin Aの発現、benzidine染色によるhemoglobin産生などによってコントロールES細胞と比較する。さらに、さまざまな細胞への分化誘導系を用いて、Evi3の細胞分化に関する役割を明らかにする。

#### 7) Evi3ノックアウトマウスの解析

Evi3ノックアウトマウスの表現系を形態学的に詳細に観察する。その結果によって、異常臓器を中心として研究計画を立案する。造血器系に異常を認めた場合には、骨髓細胞を用いた*in vitro*実験系で分化増殖能に関する検討を実施する。致死的な場合には、胎児の解析からその原因を明らかにするとともに、さらにコンディショナルノックアウトマウス作製を計画する。

#### 4. 研究成果

マウス ES 細胞の赤芽球、赤血球系への分化に関して確認した。

ZNF521 のマウスホモログである Evi3 についても siRNA を作成し、これをマウス ES 細胞に導入し、Evi3 をノックダウンした細胞を作成した。現在、機能的、形態学的変化を解析中である。

さらに、Evi3 ノックアウトマウスの作製も進んでおり、来年度中には作製できる予定である。まずはマウス体内での造血機能に対する影響に関して検討する予定である。Evi3 ノックアウトマウスはマウス Evi3 の機能を解析する上で、更なる知見が得られる可能性を秘めており、広がりを見せている。

#### 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5件)

- ① Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Nakagawa K, Kumon Y, Fujiwara H,

Yakushijin Y, Yasukawa M. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. *Platelets* 22, 2011, 135-142 査読有

- ② Azuma T, Yamanouchi J, Inoue K, Kohno M, Narumi H, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Derivative (1;18)(q10;q10) in essential thrombocythemia. *Cancer Genetics And Cytogenetics* 199, 2010, 62-64 査読有

- ③ Matsubara E, Sakai I, Yamanouchi J, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Shigemoto K, Yasukawa M. The role of zinc finger protein 521/ early hematopoietic zinc finger protein in erythroid cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 2009, 3480-3487 査読有

- ④ Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Azuma T, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Identification of a novel epitope derived from CML66 that is recognized by anti-leukemia cytotoxic T lymphocytes. *British Journal of Haematology* 146, 2009, 115-118 査読有

- ⑤ Yamanouchi J, Hato T, Tamura T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. Compound heterozygous mutations in the PROS1 gene responsible for quantitative and qualitative protein S deficiency. *International Journal of Hematology* 90, 2009, 537-539 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. The  $\beta$  tail domain ( $\beta$ TD) in the integrin  $\beta$ 3 subunit regulates  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. 第72回日本血液学会学術集会 2010.9.24 横浜市
- ② 安軍、藤原弘、末盛浩一郎、越智俊元、永井功造、峰野純一、白方俊章、山之内純、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴 CD8陽性PTCL細胞のパーフォリン依存性細胞傷害には、腫瘍細胞上のCD3/T細胞受

容体複合体が関与している. 第71回日本血液学会学術集会 2009. 10. 25 京都市

- ③ 山之内純、藤原弘、越智俊元、白方俊章、薬師神芳洋、羽藤高明、平川聡史、大久保信孝、鈴木洋司、満田憲昭、安川正貴 Tie2-Cre STAT3 コンディショナルノックアウトマウスは溶血性貧血を呈する. 第71回日本血液学会学術集会 2009. 10. 24 京都市
- ④ Fujiwara H, Ochi T, Nagai K, Shirakata T, Yamanouchi J, Mineno J, Kuzushima K, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Development of cancer gene-immunotherapy using Aurora-A kinase-specific T-cell receptor genes 第71回日本血液学会学術集会 2009. 10. 23 京都市
- ⑤ Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. Integrin  $\beta 3$  Membrane-Proximal And -Distal Residues Cooperatively Regulate Talin-Mediated  $\alpha I I b \beta 3$  Activation. 22th Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis 2009. 7. 15 Boston, MA, U. S. A
- ⑥ Yamanouchi J, Hato T, Tamura T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. Compound Heterozygous Mutations In The PROS1 Gene Responsible For Quantitative And Qualitative Protein S Deficiency. 22th Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis 2009. 7. 13 Boston, MA, U. S. A
- ⑦ 山之内純、羽藤高明 Toll-like receptors を介した血小板インテグリン  $\alpha I I b \beta 3$  の活性化 第32回日本血栓止血学会学術集会 2009. 6. 5 北九州市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山之内 純 (YAMANOUCHI JUN)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 10423451

