

機関番号: 82606

研究種目: 若手研究 (B)

研究期間: 2009~2010

課題番号: 21790927

研究課題名 (和文) 造血幹細胞の自己複製における白血病関連因子 MOZ と MORF の機能の解明

研究課題名 (英文) Roles of leukemia related factor MOZ and MORF in self-renewal of hematopoietic stem cells

研究代表者

勝本 拓夫 (KATSUMOTO TAKUO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 50469970

研究成果の概要 (和文):

本研究では、MORF 及び MOZ の造血幹細胞の自己複製における役割を中心に解析を行った。造血系において MORF は造血幹細胞分画で最も発現が高く、加齢や 5-FU 投与した MORF 欠損マウス、両遺伝子をヘテロ欠損したマウスにおいて、いずれも造血幹細胞分画が減少していることから、MORF は、造血幹細胞の維持に重要な遺伝子であることが示唆された。さらに MORF は、AML1, PU. 1, GATA-1/2 といった転写因子と結合して、その転写を協調的に制御し得ることが明らかとなった。以上の結果から MORF と MOZ は、造血に重要な転写因子と相互作用することで、造血幹細胞の自己複製機構を調節していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文):

In this study, we mainly analyzed the roles of MORF or MOZ in self-renewal of hematopoietic stem cells. High expression of MORF gene was appeared in hematopoietic stem cell fraction. Hematopoietic stem cell fractions were evenly decreased in aged and 5-FU treated MORF deficient mouse or in MOZ/MORF double heterozygous mouse. MORF was associated with AML1, PU. 1 or GATA-1/2 and regulated their transcription. These results suggested MORF and MOZ modulated self-renewal activity of hematopoietic stem cells to interact with AML1, PU. 1 or GATA-1/2 and to regulate their transcription activity.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科臨床医学・血液内科学

キーワード: 造血幹細胞、自己複製、転写制御因子、ヒストンアセチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

転写制御因子はヒストンや DNA の修飾、クロマチン構造の制御によって遺伝子発現を適正に制御している。これまでの遺伝子欠損マウスの解析から転写制御因子が造血幹細胞の自己複製や造血系細胞の発生・分化に重要な役割を担っていることが明らかとなっているが、その分子機序はあまり明らかとなっていない。近年その存在が注目されている白血病幹細胞の自己複製機構において、正常の造血幹細胞による自己複製機構と共通する作用機序があることが示唆されている。このため造血幹細胞の自己複製機構の分子機序を解明することにより、白血病幹細胞を標的とする治療法開発において有用な知見が得られることが期待される。我々はこれまでの研究から、急性骨髄性白血病で見られる融合遺伝子の構成遺伝子であるヒストンアセチル化酵素 MOZ/MORF が造血幹細胞の自己複製に重要な役割を持つことを見いだしていたが、その詳細な分子機序については不明な点が多くあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、MOZ/MORF による造血幹細胞の自己複製機構及び造血系細胞の発生・分化について、主に MOZ/MORF 遺伝子欠損マウスを用いた機能解析及び生化学的な手法を用いて、成体の造血幹細胞の自己複製機構、結合因子の探索と遺伝子発現制御に対する役割及び MOZ と MORF の作用機序の相違について解析を行い、MOZ/MORF の造血幹細胞の自己複製機構制御及び造血系細胞分化・発生における役割及びその分子機序を明らかにすることを目的とする。また白血病幹細胞を標的とした治療法開発及び造血系細胞の再生医学に貢献しうる知見を得ることも目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 成体 MORF 欠損マウスの作製と解析

我々がこれまでに作製した C57BL/6 系統の遺伝的背景を持つ MORF ヘテロ欠損マウスを DBA/2 系統のマウスと交配させ、両系統の遺伝子背景が混雑した MORF ヘテロ欠損マウスを作製した。さらにこの MORF ヘテロ欠損マウスと C57BL/6 系統の MORF ヘテロ欠損マウスと交配させて、最終的に遺伝的背景が混雑した MORF 欠損マウスを得た。

得られた MORF 欠損マウスについて、生後 12-16 週と同腹個体を用いて、造血器官である胸腺、脾臓、骨髄細胞について、種々の表面抗原に対する蛍光抗体で染色して、フローサイトメトリーで、造血系細胞の各分画の割合について解析を行った。

(2) 造血幹細胞の自己複製における MORF の役割

### ① MORF 遺伝子の発現量解析

マウス骨髄中の造血系細胞各分画をフローサイトメトリーを用いてソーティングを行い分離した。回収した細胞から RNA を抽出して、定量的 RT-PCR 法を用いて発現量を解析した。各分画の cDNA 量は b-actin の発現量で平準化した。

### ② 5-FU 投与による造血幹細胞障害

5-FU などの骨髄抑制を引き起こす薬剤を投与すると末梢の造血系細胞が障害される。それを補うために造血幹細胞の増殖・分化が誘導される。しかしながら造血幹細胞の自己複製能に障害があると造血幹細胞数を維持することができない。この系を利用して、MORF 欠損造血幹細胞の自己複製能について解析を行った。5-FU を 1 週間毎に 3 回、100 mg/Kg 腹腔内に投与して、最後の投与後 4 週間後に骨髄細胞を調製して、フローサイトメトリーで造血幹細胞分画の割合を計測した。

### ③ 加齢による造血幹細胞の障害

これまでの報告から、特に造血幹細胞の長期の自己複製能に障害が見られる場合、加齢に伴い造血幹細胞分画が減少することが知られている。そこで 6-9 ヶ月齢の MORF ホモ欠損マウス及びヘテロ欠損マウスから骨髄細胞を調製して、フローサイトメトリーを用いて造血幹細胞分画の割合を計測した。

### ④ 造血幹細胞の自己複製に関わる遺伝子の発現における MORF の役割

造血幹細胞の自己複製に関わることが明らかとなっている細胞周期抑制因子や MOZ の標的遺伝子の発現について、造血幹細胞を多く含む分化マーカー陰性、c-Kit, Sca-1 陽性分画 (KSL 分画) の細胞を用いて、MORF 欠損マウスでの各遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法で解析した。

### (3) MORF と転写因子の結合及び機能解析

#### ① MORF 結合転写因子の解析

MORF と結合する転写因子について、免疫沈降法を用いて検討した。HA タグ付きの MORF 遺伝子及び Flag タグのついた転写因子の遺伝子を 293T 細胞に導入して強制発現させた。タンパク質を回収して、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降して、ウエスタンブロット法で MORF との結合を解析した。

#### ② 転写因子による転写活性化における MORF の機能解析

MORF と結合する転写因子による転写活性化における MORF の機能についてレポーター

アッセイを用いて解析した。MORF 遺伝子と転写因子遺伝子、レポーター遺伝子を SaOS2 細胞に導入して強制発現させた。タンパク質を回収後、ルシフェラーゼ活性を指標に転写活性化に対する MORF の影響を解析した。

#### (4) MORF と MOZ の協調的作用

##### ① 造血系細胞分画の解析

胎生 14.5 日の胎仔肝臓細胞を調製して、種々の表面抗原に対する蛍光抗体で染色して、造血系細胞の各分画の割合をフローサイトメトリーで解析した。

##### ② 競合的移植実験による造血幹細胞の自己複製能の解析

Ly5.2 を発現する胎生 14.5 日の胎仔肝臓細胞を  $2 \times 10^5$  細胞と、競合細胞として Ly5.1 を発現する同数の骨髓細胞を同時に致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植した。移植後 4, 8, 12 週後に抹消血中の移植細胞由来白血球の割合を解析した。移植後 12 週後に胸腺、脾臓、骨髓細胞を回収して造血系細胞の各分画における移植細胞に由来する細胞の割合を解析した。

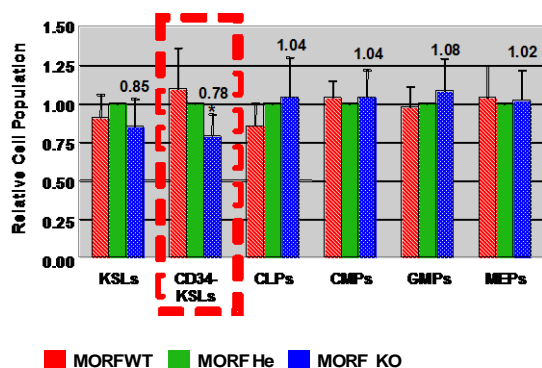
#### 4. 研究成果

##### (1) 成体 MORF 欠損マウスの作製と解析

純系の MORF 欠損マウスは、生後 4 週間までに致死に至るため、遺伝的背景を混雑させることによって成体まで生存可能な MORF 欠損マウスが作成可能か検討した。その結果、DBA/2 と掛け合わせることで成体まで生存可能な MORF 欠損マウスが得られた。

MORF 欠損マウスは体長が小さく、体重は野生型の 7 割程度であった。造血器官である胸腺、脾臓、骨髓の細胞数を計測した結果、胸腺及び脾臓細胞数は、野生型の半分程度に減少していた。一方骨髓細胞は、野生型の 8-9 割程度であった。フローサイトメトリーを用いて、種々の造血系細胞について解析した。胸腺及び脾臓に含まれる各細胞分画の割合は、MORF 欠損マウスで顕著な違いは見られなかった。骨髓中では、造血幹細胞を多く含む CD34 陰性 KSL 細胞分画が MORF 欠損マウスで減少していた。(図 1)

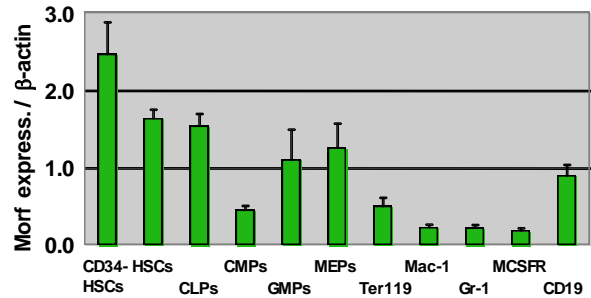
図 1 骨髓中の造血前駆細胞の割合



##### (2) 造血幹細胞の自己複製における MORF の役割

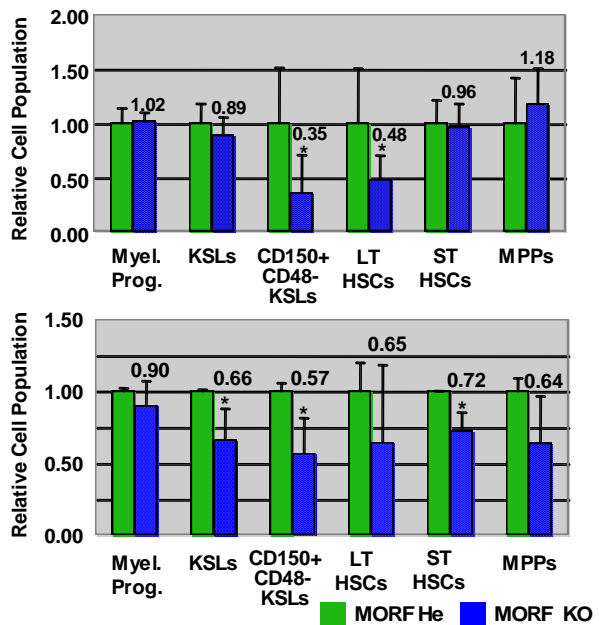
造血系各細胞分画を分離して MORF の発現量を解析した。その結果、MORF は造血幹細胞を含む CD34- KSL 細胞分画で発現が高く、分化に従って発現量は少なくなっていた。また分化した造血系細胞分画では、CD19 陽性の B 細胞分画で比較的多くの発現が見られた (図 2)。

図 2 造血系細胞での MORF の発現



造血幹細胞の長期の維持機構における MORF の役割を明らかにするために、5-FU 投与による骨髓抑制及び加齢に対する造血幹細胞の維持について解析した。その結果、いずれの場合も骨髓中の造血幹細胞分画が MORF 欠損マウスで MORF ヘテロ欠損マウスと比べて顕著に減少していた (図 3)。

図 3 5-FU 投与及び加齢と造血幹細胞の割合 (上段; 5-FU 投与、下段; 老齢マウス)



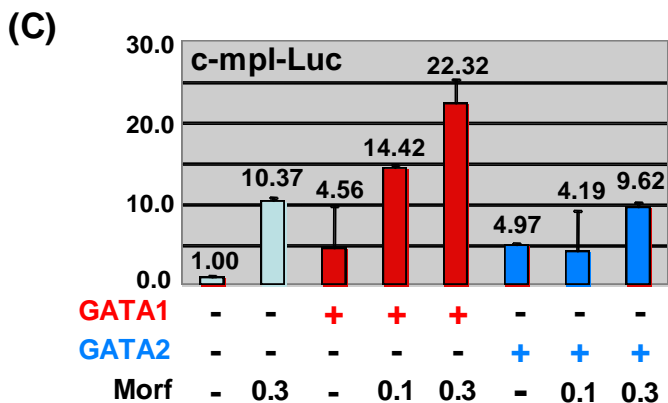
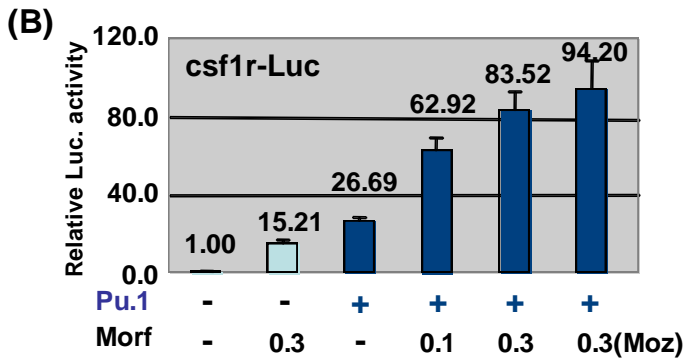
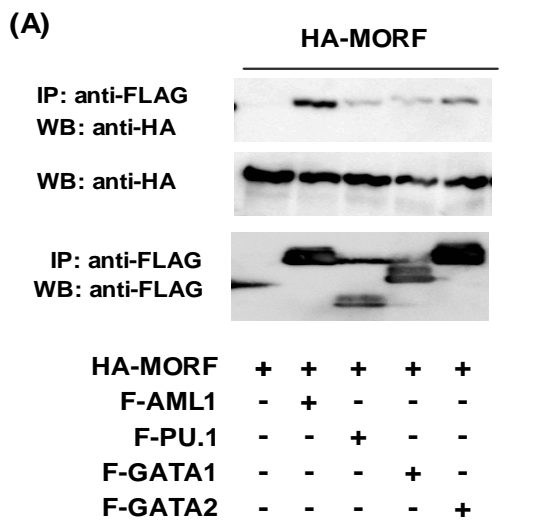
さらに MORF 欠損マウスで見られる造血幹細胞の機能障害の原因となりうる遺伝子について、細胞周期抑制因子や MOZ 欠損マウスで発現が低下している遺伝子について、造血幹細胞を多く含む KSL 分画の細胞でその発現量を MORF ヘテロ欠損マウスと比較した。しかしながら、解析した遺伝子中に MORF 欠損

マウスのKSL分画で顕著に発現が低下している遺伝子は含まれていなかった。以上の解析から MORF は、造血幹細胞の自己複製機構において、特に長期の自己複製機構に重要な役割を担っていることが示唆された。

(3) MORF と転写因子の結合及び機能解析

今までに造血において重要な役割を持つことが明らかとなっている転写因子について MORF との結合を免疫沈降法を用いて解析した。MORF は今までに知られている AML1 のみならず PU.1, GATA-1/2 といった転写因子と結合した (図 4A)。

図 4 MORF と転写因子との結合及び転写制御



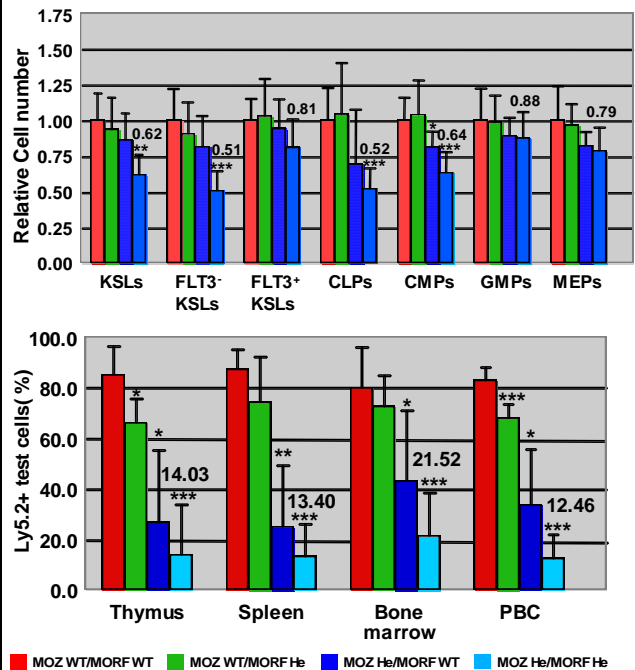
次いで MORF と結合する 転写因子による転写活性化における MORF の機能をレポーターアッセイで解析した。MORF は、PU.1, GATA-1 による転写を協調的に活性化したが、GATA-2 による転写は活性化しなかった (図 4B, C)。この結果から、MORF は、AML1 のみならず PU.1, GATA-1/2 といった造血幹細胞の自己複製や造血系細胞の発生・分化に関わる転写因子と相互作用して、造血系を制御していることが示唆された。

(4) MORF と MOZ の協調的作用

MOZ/MORF ダブルヘテロ欠損マウスは、MORF 欠損マウスと同様に生後 4 週間までに全例が死亡した。そのため造血系各細胞について胎生 14.5 日の胎仔肝臓細胞を用いて解析した。胎仔肝臓細胞数に顕著な違いは見られなかったが、造血幹細胞及び共通リンパ球前駆細胞、共通骨髄球前駆細胞分画の割合が減少していた (図 5)

胎生 14.5 日の MOZ/MORF ダブルヘテロ欠損胎仔肝臓細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスに競合細胞と同時に同数移植して、造血掲載構築における寄与率を解析した。MOZ/MORF ダブルヘテロ欠損細胞は、単独ヘテロ欠損細胞と比べて骨髄再構築に寄与する割合が低下していた (図 6)。この結果から、MORF と MOZ との間には、造血幹細胞の自己複製機構や造血系細胞の発生・分化制御機構において協調的な作用が有ることが示唆された。

図 5 MOZ/MORF 両ヘテロ欠損マウスの解析 (上段; 胎仔肝臓中の造血前駆細胞の割合、下段; 競合的移植実験)



以上本研究を通じて、MORF が造血幹細胞の自己複製機構において、特に長期の造血幹細胞の維持に重要な転写制御因子であること、またその分子機序として、造血に重要な転写因子である AML1, PU.1, GATA-1/2 と協調的に標的遺伝子の転写を制御していること、MOZ と MORF の間に協調的な作用があることが推察された。

今後の課題としては、今回の解析から MORF の造血幹細胞の自己複製障害の原因となりうる遺伝子発現が変化している遺伝子について明らかにすることができなかった。この点について細胞周期抑制因子や MOZ の標的遺伝子以外にも検討して明らかにする必要がある。

本研究において得られた知見は、MOZ/MORF 融合遺伝子による白血病発症機構の解明や造血幹細胞及び造血系細胞を体外で増幅するような再生医学にも貢献しうる重要な知見であると考えられる。

#### 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 3 件)

- ① Masaki Michishita, Rui Akiyoshi, Hisashi Yoshimura, Takuo Katsumoto, Hitoshi Ichikawa, Kozo Ohkusu-Tsukada, Takayuki Nakagawa, Nobuo Sasaki, Kimimasa Takahashi; Characterization of Spheres Derived from Canine Mammary Gland Adenocarcinoma Cell Lines. Research in Veterinary Science, 査読有、2010, in press
- ② Yukiko Aikawa, Takuo Katsumoto, Pu Zhang, Haruko Shima, Mika Shino, Kiminori Terui, Etsuro Ito, Hiroaki Ohno, E. Richard Stanley, Harinder Singh, Daniel G Tenen, Issay Kitabayashi; PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential, Nat. Med., 査読有、16, 2010, 580-85
- ③ Kenta Hibiya, Takuo Katsumoto, Takashi Kondo, Issay Kitabayashi, Akira Kudo;

Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyltransferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons, Dev Biol., 査読有、329, 2009, 176-90

[学会発表] (計 6 件)

- ① 勝本拓夫、北林一生、「Roles of histone acetyltransferase MORF and MOZ in hematopoiesis」、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 神戸ポートアイランド
- ② 嶋晴子、山中久美子、相川祐規子、勝本拓夫、篠美花、古関明彦、北林一生、「Roles of Ring1A/B and ROS in stem cell potential of MOZ and other myeloid leukemias」、第 72 回日本血液学会学術総会、2010 年 9 月 パシフィコ横浜
- ③ Takuo Katsumoto, Issay Kitabayashi, Roles of histone acetyltransferase MORF and MOZ in hematopoiesis, 51<sup>st</sup> ASH annual meeting and exposition, 2009 Dec. New Orleans, USA
- ④ 勝本拓夫、北林一生、「Roles of histone acetyltransferase MORF and MOZ in hematopoiesis」、第 71 回日本血液学会学術総会、2009 年 10 月 国立京都国際会館
- ⑤ 勝本拓夫、相川祐規子、北林一生、「MOZ は、MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病細胞化に必須である」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 パシフィコ横浜
- ⑥ 勝本拓夫、北林一生、「Histone acetyltransferase MOZ and MORF are

essential for self-renewal of  
hematopoietic stem cells」、第 7 回幹細胞  
シンポジウム、2009 年 5 月 泉ガーデンタワ  
ー

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝本 拓夫 (KATSUMOTO TAKUO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究  
所・研究員

研究者番号 : 50469970