

## 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 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890042

研究課題名（和文）造血システムにおける活性酸素の役割の解明

研究課題名（英文）Functional role of reactive oxygen species in hematopoiesis

研究代表者

篠原 明仁（SHINOHARA AKIHITO）

東京大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：70579713

研究成果の概要（和文）：活性酸素は有害物質として広く知られるが、近年は生物の恒常性を保つ物質として注目を集めている。本研究では、造血細胞の中でも赤血球と血小板を産生する巨核球・赤血球系前駆細胞の細胞内活性酸素が低く保たれていることを明らかにした。また活性酸素を負荷によりこれらの造血細胞の産生・維持が阻害されることを明らかにした。造血システムにおける活性酸素の重要性を示すと共に、活性酸素の制御による血液細胞生成の効率化など再生医療への応用の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：While reactive oxygen species (ROS) have been known as harmful substances, it has been noted recently that ROS are critical mediators in cellular homeostasis. In this study, we revealed that intracellular ROS level of megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells (MEP) was kept low. Furthermore, we revealed that ROS inhibited the generation of MEP. This study indicates the importance of ROS in hematopoiesis and the possibility that control of ROS is useful for effective generation of blood cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：活性酸素、造血幹細胞、造血前駆細胞、造血細胞分化、CSF1R

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素（以下 ROS：reactive oxygen species）は不対電子を持つ酸素を含む分子種であり、細胞内活動に伴って必然的に生じる。近年 ROS が重要なシグナル伝達物質の一つであることが認知され、血液領域においても ROS の正常の生理的機能に関する研究が行われている。細胞内 ROS が造血幹細胞の quiescence の維持に関与することが知られるが、造血前駆細胞の維持・分化課程において ROS がどのような役割を担うかは全く明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

細胞内における ROS の発生源として重要な NOX 遺伝子群は造血前駆細胞にも発現しており、これらの細胞で ROS が重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では造血前駆細胞において ROS が果たす機能の解明を目的とする。また造血障害を呈しかつ細胞内 ROS の上昇が観察される疾患、たとえば骨髓異形成症候群などの病態への ROS の関与、ROS の制御による疾患の治療についても検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス造血細胞内の ROS 濃度を Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) の技術を用いて生細胞のまま測定し、造血システムにおける ROS の微細な変化を捉えると同時に、造血細胞において ROS の生成に関わる遺伝子の変化を測定する。2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H2-DCFDA) を用いることで、細胞内の ROS を生きたまま測定することができる。

(2) マウス造血前駆細胞に低濃度の過酸化水素を用いて ROS を負荷、または catalase により ROS を低下させ半固形培地で培養し、ROS の血球分化への影響をコロニーアッセイ法により解析する。また同じ分化段階にある造血前駆細胞を細胞内 ROS の高低に分けて FACS で分離した後に半固形培地で培養し、血球分化傾向の違いを観察する。

(3) FACS を用いて、同一分化段階のマウス造血前駆細胞の中で細胞内 ROS の高い分画と低い分画に分けて分離、それぞれの細胞の RNA を回収しマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現パターンの差を網羅的に解析する。得られたデータは dChip ソフトウェアを用いて MBEI (Model Based Expression Index) 法により正規化を行い、階層的クラスタリングを行って解析する。また Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を同時に行うことで、ROS に関連する遺伝子を細胞周期・アポトーシス・血球分化などの遺伝子グループごとに総合的に解析する。

(4) 前述のマイクロアレイで得られたデータから ROS の標的遺伝子を抽出する。マウス造血前駆細胞に ROS を負荷し、これらの遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法で解析する。また CSF1R が ROS の標的遺伝子として有望であると考えられ、CSF1R の発現に応じて CMP を分離し半固形培地で培養、前述のコロニーアッセイ法により分化傾向の差を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1)

① 各種蛍光抗体および H2-DCFDA を用いて FACS により以下に示す各マウス造血前駆細胞の細胞内 ROS 濃度を測定した。

造血幹細胞：KSL 細胞

(c-kit/Sca1 陽性; lineage 抗原陰性細胞)

骨髄球系造血前駆細胞：CMP

(common myeloid progenitor)

巨核球・赤血球系前駆細胞：MEP

(megakaryocyte/erythroid progenitor)

顆粒球・単球系前駆細胞：GMP

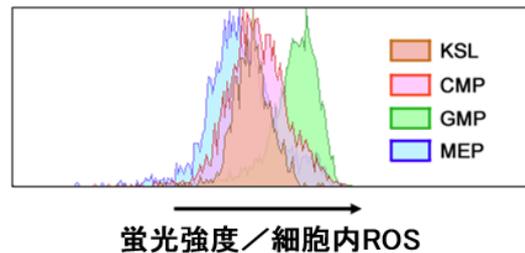
(granulocyte/monocyte progenitor)

造血細胞の中でも赤血球と血小板を産生

する MEP では細胞内 ROS 濃度が低く、逆に好中球や単球に分化する顆粒球・単球系前駆細胞 GMP では細胞内 ROS 濃度が高く保たれていることが明らかとなった (図 1)。

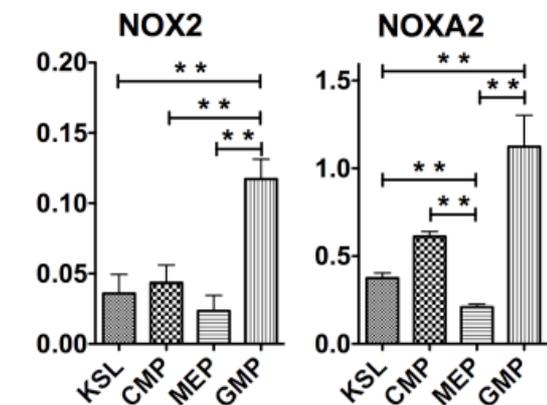
これまで、造血幹細胞では細胞内 ROS が低く保たれ、分化が進むにつれ ROS が高濃度になることが知られていた。この研究では造血幹細胞から GMP へと分化が進むにつれ細胞内 ROS が高くなる点は既報と同様に示され、逆に MEP では造血幹細胞と同等程度に細胞内 ROS が低く保たれたまま分化が進む点が新たな知見であった。

<図 1：造血細胞の細胞内 ROS>



② 次に各造血幹細胞・前駆細胞を FACS で分離し total RNA を回収して細胞内 ROS の制御に関わる遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法で解析した (図 2)。

<図 2：造血細胞の ROS 関連遺伝子発現>



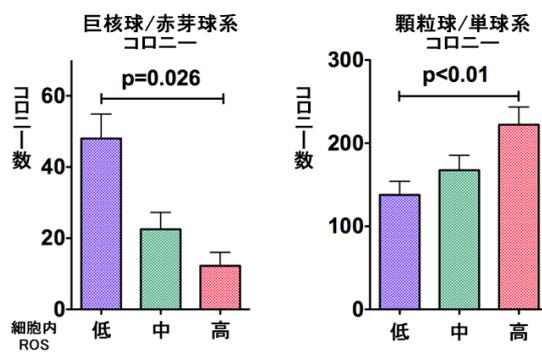
NOX2 (cytochrome b-245/NADPH oxidase 2) は好中球やマクロファージでの食細胞効果に関わる遺伝子として知られ、造血幹細胞を含む血液細胞内における ROS の発生に関わる遺伝子である。また NOXA2 (neutrophil cytosolic factor 2 / p67phox) は NADPH oxidase 複合体のサブユニットを形成する蛋白をコードし、NOX2 同様に血液細胞内における ROS の発生に関わる。MEP では NOX2/NOXA2 が最も低く且つ Nrf2 が高く制御されていた。また GMP では NOX2/NOXA2 が最も高い発現を示しており、遺伝子の発現パターンからも MEP が最も細胞内 ROS が低く制御されていることが示された。GMP と MEP で細胞内 ROS が

大きく異なることから、CMP から GMP/MEP への分化の進行の過程で ROS が何らかの役割を果たしているのではないかと推測された。

(2)

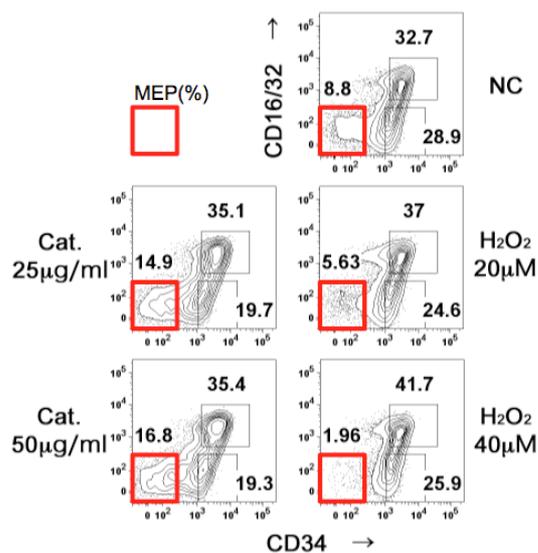
① マウスの骨髓球系前駆細胞: CMP を細胞内 ROS の高低に分けて FACS で分離し半固形培地で培養、コロニーアッセイ法により分化傾向の差を解析した。細胞内 ROS の低い CMP は巨核球系/赤芽球系コロニーの数が多く、逆に細胞内 ROS の高い CMP では巨核球系/赤芽球系コロニーの数が少なかった。顆粒球/単球系コロニーでは逆の傾向が見られ、細胞内 ROS の高い CMP では顆粒球/単球系コロニーの数が多く観察された。

<図3：ROS濃度によるCMP分化の違い>



② 次に CMP に過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を用いて ROS 負荷をかけた場合、および catalase (Cat.) を用いて ROS を減じた場合の CMP の分化の違いを観察した (図4)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて CMP を培養すると CMP から MEP への分化が抑制され (図4の赤枠)、逆に catalase を用いた場合には MEP への分化が促進された。

<図4：CMPからMEP分化の変化>

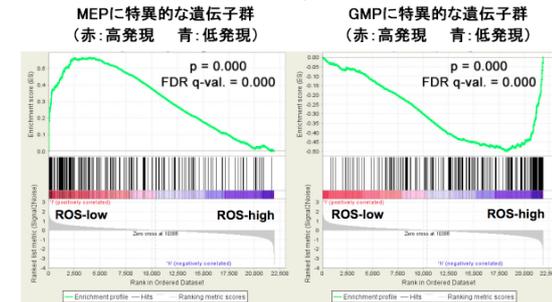


①および②の結果を総合すると、造血前駆細胞

(特に CMP) の分化過程の中で、ROS の高低により分化傾向が大きく変化することが示された。

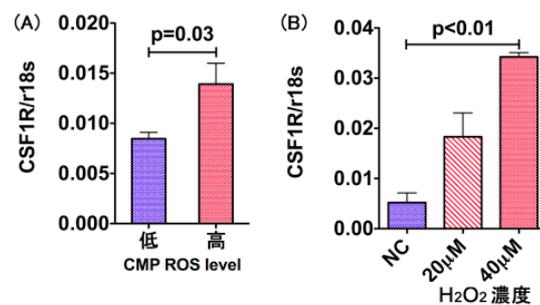
(3) FACS を用いてマウス骨髓球系前駆細胞: CMP を ROS の高低に分けて分離した。分離後の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて、遺伝子の発現パターンを網羅的に解析した。その結果、ROS の低い CMP では MEP に類似した遺伝子発現パターンを示すのに対し、ROS の高い CMP では GMP に近い遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった (図5)。

<図5：CMPの遺伝子発現パターン>



(4) (3) で示したマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの結果から、いくつかの血球分化に関連する遺伝子が ROS に応じて変化していることが明らかとなった。その中で検証を行い、Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) が ROS の標的遺伝子として重要であると推測された。

<図6：CSF1Rの遺伝子発現>



① マウスの骨髓球系前駆細胞: CMP を細胞内 ROS の高低に分けて FACS で分離し CSF1R の遺伝子発現レベル (mRNA) を定量 RT-PCR 法で比較したところ、細胞内 ROS の低い CMP では CSF1R の発現が低く、逆に細胞内 ROS の高い CMP では CSF1R の発現が高いことが明らかとなった (図6A)。

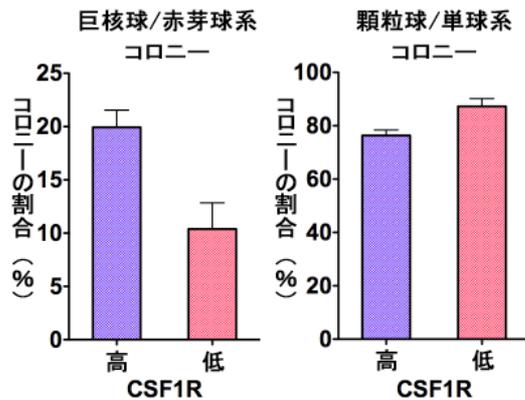
またヒト赤芽球様白血病細胞由来の K562 細胞株に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて ROS の負荷を行ったところ、CSF1R の遺伝子発現が上昇することが明らかとなった (図6B)。以上のことから、

ROSによりCSF1Rの遺伝子発現が制御されている可能性が示された。

② CSF1Rはマクロファージコロニー刺激因子の受容体として知られ、造血細胞の中では単球系細胞に強く発現する遺伝子として知られている。その分化や増殖に関与していることが明らかとなっているが、骨髓球系造血前駆細胞の段階でどのような機能を持っているかは明らかになっていなかった。

そこで骨髓球系造血前駆細胞:CMFの細胞表面CSF1Rを蛍光抗体で標識し、CSF1Rの発現の強弱に応じてCMFをFACSで分離した。分離した細胞を半固形培地で培養し、コロニーアッセイ法で分化傾向を観察したところ、CSF1Rの発現の低いCMFでは巨核球/赤芽球系コロニーの割合が低く、逆にCSF1Rの高いCMFではこれらのコロニーの割合が低いことが明らかとなった(図7)。

<図7:CMFのCSF1Rの発現と分化傾向>



これらの結果からROSがCSF1Rの発現を介して骨髓球系前駆細胞の分化段階を制御している可能性が強く示された。

本研究では造血前駆細胞の種類によって細胞内ROS濃度が異なること、特にMEPでの細胞内ROSが低く制御されていることを示し、ROSの負荷または除去によって造血前駆細胞の分化経路が大きく影響されることを初めて明らかにした。またROSの高低により骨髓球系造血前駆細胞の分化傾向が特徴づけられていることを明らかにし、CSF1Rの遺伝子発現の調節を介してROSが造血前駆細胞の分化を制御していることを明らかにした。

これまでROSが造血幹細胞の維持に関与することやショウジョウバエの造血発生に関わることが知られていた。また好中球においてはNOX、NOXA2などの遺伝子の働きを介して食細胞効果にROSが利用されていることも明らかになっている。しかし、造血前駆細胞の維持・分化課程においてROSがどのような役割を担っているかは全く明らかになっていなかった。この研究で造血細胞の分化の中

途段階でROSが大きな役割を果たしていることが明らかになり、血球の発生から最終分化に至るまでROSが緻密に制御され、分化も機能を修飾している可能性が示された。

このことはROSの制御により、造血幹細胞から効率的に特定系統の血液細胞を生成することが可能であることを示している。再生医療分野においては胚性幹細胞や人工多能性幹細胞などを用いた血液細胞の産生の研究が進んでおり、こういった技術と組み合わせることで研究成果の実臨床への応用の可能性が広がると考えられる。

## 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)

[学会発表](計4件)

① 篠原 明仁、A critical role of reactive oxygen species in the generation of megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2010年12月4日、Orange County Convention Center, Orland, USA

② 篠原 明仁、造血前駆細胞の系統決定における活性酸素の役割、第72回日本血液学会学術集会、2010年9月24日、パシフィコ横浜(神奈川県)

③ 篠原 明仁、骨髓球系前駆細胞の分化における活性酸素の役割、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪国際会議場(大阪府)

④ 篠原 明仁、A critical role of reactive oxygen species in the generation of megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells, 第1回日本血液学会国際シンポジウム、2010年7月16日、秋田大学(秋田県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 明仁 (SHINOHARA AKIHITO)

研究者番号: 70579713

東京大学・医学部付属病院・助教