

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659464

研究課題名(和文) Gm16515によるグロビン合成調節機構の解明とその臨床応用検討

研究課題名(英文) An elucidation and clinical application examination of the globin synthesis adjusting mechanism by Gm16515

研究代表者

杉山 大介 (Sugiyama, Daisuke)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00426652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：(1)Gm16515 K0マウスの作製：ES細胞2クローンを購入し、胚盤胞注入法で2クローンのF01の雌キメラマウスから雄キメラマウスを得た後、B6マウスと継続的に交配させた。

(2)サラセミアの無効赤血球造血を惹起する候補因子の抽出：野生型及びサラセミアモデルマウスよりデータベースを作成した。サラセミア惹起因子として、インスリン様成長因子結合単タンパク質ファミリーに属するIgfbpXを抽出した。

(3)候補因子のin vitro機能解析：赤血球造血が盛んな胎仔肝臓を用いた。野生型マウスではIgfbpXは終末期赤血球造血を亢進した。サラセミアモデルマウスではグロビン遺伝子発現の亢進を認めた。

研究成果の概要(英文)：(1)Production of a Gm16515 K0 mouse: After purchasing embryonic stem cell 2 clone and obtaining a male chimera mouse from the female chimera mouse of F01 of two clones with a blastocyst injection method, it was made to cross continuously with B6 mouse.

(2)Extraction of the candidate factor which induces invalid red corpuscle hematogenesis of beta-thalassemic: the database was created from the wild type and beta-thalassemic model mouse. As a beta-thalassemic inducement factor, IgfbpX belonging to an insulin-like growth factor joint single protein family was extracted.

(3)In vitro performance analysis of a candidate factor: Fetal liver with prosperous red corpuscle hematogenesis was used. In the wild-type mouse, IgfbpX rose end term red corpuscle hematogenesis. Rise of globin gene expression was accepted with the beta-thalassemic model mouse.

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：血内科学 グロビン

### 1. 研究開始当初の背景

グロビンは赤血球の酸素運搬を司るタンパク質である。その量的・質的異常は異常ヘモグロビン症と呼ばれ、貧血状態を惹起する。中でもサラセミアは東アジアに多発する常染色体優性遺伝性の異常ヘモグロビン症である。サラセミアでは骨髄において効率良く赤血球が産生されない無効赤血球造血を生じる。この無効赤血球造血はグロビン合成の不均衡に起因すると考えられているが、発症機序の解明は発展途上である。申請者は自らが確立した新規貧血モデルゼブラフィッシュの解析を更に進め、ヒストンアセチル化を抑制しグロビン合成を負に制御する Gm16515 を同定した。

### 2. 研究の目的

本研究では Gm16515 に焦点を当て、グロビン合成機構を解明し、サラセミアの無効赤血球造血を惹起する新規因子の同定を試み、その機能解析を行う事を目的とした。

### 3. 研究の方法

新規貧血モデルゼブラフィッシュのマイクロアレイ解析：

新規貧血モデルゼブラフィッシュ (Kulkeaw et al., BBRC 2010) の造血組織・腎髄をマイクロアレイ解析し、貧血に關与する候補因子の抽出を行った。次に、real-time PCR 法により二次スクリーニングを行い、造血幹細胞が赤血球へ分化する過程において遺伝子発現が 50 倍亢進する Gm16515 を同定した。Gm16515 はヒストンのアセチル化を司る GCN5 ヒストンアセチル化酵素に類似し、アセチル化に關与するかを検討した。

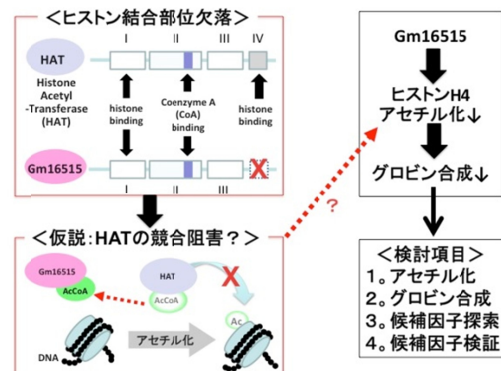
In vivo における Gm16515 の機能解析：既にグロビン遺伝子発現の検討が行われており、造血転写因子遺伝子の解析とマイクロアレイ法による網羅的解析を行い、Gm16515 の発現を制御する因子の同定を試みた。Gm16515 コンディショナルノックアウトマウス作製のベクター構築済み ES 細胞を、マウス胚盤胞へ移植した。

Gm16515 の AcCoA 結合能の解析：マウスおよびヒト Gm16515 リコンビナントタンパク質を精製した。EnzyChrom Coenzyme A Assay Kit (BioAssay Systems 社) あるいは Coenzyme A Assay Kit (Abnova 社) を用いて、精製した Gm16515 タンパク質が AcCoA 結合能を保持するか、吸光度計を用いて計測・評価した。

Gm16515 によりアセチル化が抑制される配列の同定：

Gm16515 を過剰発現させたフレンド白血病細胞サンプルを用いて、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。抗体は抗アセチル化 Lysine 抗体、及び抗アセチル化

ヒストン H4 抗体を用いる。real-time PCR 法を用いて、major globin 遺伝子を含めたグロビン遺伝子群に加え、グロビン遺伝子発現を制御すると考えられる造血転写因子遺伝子 (gata1、klf1 など) の発現解析も行った。



無効赤血球造血を惹起する候補因子の発現・機能解析：

Svasti 博士との共同研究で、サラセミアモデルマウス由来 iPS 細胞の樹立に成功した。そこで、候補因子の遺伝子過剰発現用ベクターを構築し、このサラセミア iPS 細胞へ遺伝子導入する。導入した iPS 細胞を培養して赤血球を分化誘導し、real-time PCR 法によるグロビン遺伝子の発現解析、及び HPLC によるグロビンタンパク質の解析を行い、グロビン合成の不均衡が改善されるか検討する。更に、Tri 博士、Lai 博士、Svasti 博士よりサラセミア患者サンプルの提供を受け、候補因子の遺伝子発現を検討した。

### 4. 研究成果

新規貧血モデルゼブラフィッシュのマイクロアレイ解析：

Gm16515 の機能解析として、Gm16515 をマウス赤白血病細胞へ強制発現した系においては、免疫染色法により Gm16515 がヒストンアセチル化を抑制する事が示唆された。また、real-time PCR 法によりグロビン遺伝子発現を検討したところ、

共に遺伝子発現が抑制された。遺伝子導入 2 日後の細胞において、細胞表面抗原発現の解析をフローサイトメリーにより検討したが、コントロールと比較し、顕著な違いは認められなかった。

In vivo における Gm16515 の機能解析：遺伝子改変マウス作製を試みた。欧州の EuMMCR 社より Gm16515KO ES 細胞 (EPD0061\_2\_F01 と EPD0061\_2\_H03) の 2 つのクローンを購入後、胚盤胞注入法により、ES 細胞クローン H03 と二匹の ES 細胞クローン F01 の雌キメラマウスから一匹の雄キメラマウスを得た。ゲノム中に変異型 Gm16515 を含むマウスを得るため、雄キメラマウスを B6 マウスと継続的に交配させた。キメラマウスが得られた

後、時期特異的に Gm16515 遺伝子のノックアウトマウスを得る為の、Mx-1-Cre マウスの繁殖準備は完了した。

Gm16515 の AcCoA 結合能の解析：  
Gm16515 のヒストンアセチル化阻害作用を検討するため、アッセイキットを用いて、アセチル補酵素 A 結合能及びヒストンアセチル化酵素活性を保持するか検討した。Gm16515 はアセチル補酵素 A 結合能を保持するにも関わらず、ヒストンアセチル化酵素活性を保持しない事から、Gm16515 によるヒストンアセチル化阻害作用は既存のヒストンアセチル化酵素に対する競合阻害である事が示唆された。

Gm16515 によりアセチル化が抑制される配列の同定：

Gm16515 中のアセチル結合ドメインを含む peptide(12, 13, 14, 15, 16aa アミノ酸)を設計し、K562 細胞に添加培養し、globin gene expression を検討した。12-16aa 配列で a-globin expression の抑制を認めた。一方、b-globin expression に変化は認めなかった。そこで、さらに internalization の効率を上げるため、短いアミノ酸配列 (10aa) を設計し、a-globin expression の抑制を認めた。

さらに ChIP アッセイを行ったところ、Gm16515 は胎仔肝臓造血前駆細胞において globin 遺伝子の promoter region への結合は、認められなかった。一方、globin 遺伝子の発現を制御する *klf1* 遺伝子に関してはその promoter region に結合することが示唆されたため、Gm16515 の間接的な globin 遺伝子制御を行っていることが示唆された。

無効赤血球造血を惹起する候補因子の発現・機能解析：

サラセミアモデルマウスの造血発生解析として、野生型マウス及びホモ接合体マウス (IVSII-654/ IVSII-654) を飼育した。胎齢 13.5 日目の bulk 胎仔肝臓を用いて、DNA マイクロアレイ法にて行った。ホモ接合体マウスサンプルで発現が低下する遺伝子の中から、サラセミア発症に関与する最終候補因子として、インスリン様成長因子結合単タンパク質ファミリーに属する *IgfbpX* を同定した。再検証実験を行い、野生型に対しホモ接合体胎仔肝臓ではその遺伝子発現が 65% 低下していた。正常造血における候補因子の発現解析・機能解析では胎齢 12.5 及び 14.5 日目の胎仔肝臓を用いた。候補因子 *IgfbpX* のタンパク質発現を ELISA 法にて確認したところ、類洞内皮細胞で発現が最も高く、肝芽細胞、血液細胞でも発現が確認できた。また、*IgfbpX* に対するレセプター (*Igf1r*, *Tgfbr1*, *Tgfbr2*, *Lrp1*) の発現解析を qPCR 法にて行い、Ter119 陽性細胞においては *Igf1r* 発現

が高発現することを確認した。既報では、*IgfbpX*-*Igf1r* シグナルと競合する分子として、*Igf1* が報告されていたことから、次に *Igf1* のタンパク質発現を ELISA 法にて確認したところ、上記 *IgfbpX* 同様、類洞内皮細胞で発現が最も高く、肝芽細胞、血液細胞でも発現が確認できた。次に野生型胎齢 14.5 日目の胎仔肝臓細胞を用いて *in vitro* 機能獲得実験を培養系にて行った。エリスロポエチン Epo 添加、Ter119 陽性赤血球系細胞に *IgfbpX* を添加 2 日培養後、CD71-Ter119+ 成熟赤血球分画の割合を flow cytometry 法にて確認したところ、添加前の 9.6% に対し *IgfbpX* 添加では 16.1% に増加を認める一方、さらに *Igf1* 同時添加では 12.4% であり、*Igf1* は赤血球造血を阻害することが明らかとなった。異常造血における候補因子の機能解析では、胎齢 12.5 及び 14.5 日目のサラセミアモデルマウス胎仔肝臓を用いて *in vitro* 機能獲得実験を培養系にて行った。培養 2 日後には、グロビン遺伝子群の遺伝子発現の変化を qPCR 法にて検討した結果、*IgfbpX* 添加細胞では、*Hbb-b1*, *Hbb-bh1* 等の遺伝子発現の亢進が認められた (N=1)。これらの解析法は上述の Gm16515 ノックアウトマウスが得られた場合にも有効な解析法である。

さらに、サラセミアマウス由来 iPS 細胞の樹立を行った。ホモ接合体マウス (IVSII-654/ IVSII-654) 由来胎仔繊維芽細胞 MEF 及びヘテロ接合体マウス (major, minor/ IVSII-654) 由来骨髄及び末梢血細胞に初期化遺伝子を導入し、iPS 細胞を数ライン樹立した。樹立の確認は胚葉体形成法、Alkaline Phosphatase 染色法、SSEA-1 染色及びテラトーム形成法といった既存の方法に従った。さらに、樹立 iPS 細胞より中胚葉の分化誘導段階の培養に関して、胚様体形成法を用いて細胞密度・培養添加試薬・培養時間の最適化を行った。中胚葉マーカーとして Fik1、外胚葉マーカーとして E-cadherin、内胚葉マーカーとして PDGFR を用いた。E-cadherin 陰性、PDGFR

陰性細胞中、Fik1 陽性細胞をフローサイトメトリー法により解析した結果、 $3 \times 10^5$  細胞/mL、BMP4 (15 ng/mL) 添加、培養 5 日目において、Fik1 陽性細胞が最も効率的に誘導されることが明らかとなった。継続的に中胚葉より赤血球前駆細胞の分化誘導、赤血球前駆細胞から成熟赤血球への分化誘導段階の分化誘導培養法の最適化を行っている。

##### 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8件)

・ Yoshihide Hayashizaki, Alistair Forrest, Hideya Kawaji, Michael Rehli, J Baillie,  
(以下著者省略 255 名、杉山 大 介 (61 番 目))

A promoter level mammalian expression atlas.

Nature, 査 読 有 、 [Paper #2012-12-15786H], 2014.

・ Swain A, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, Sugiyama D.

Intrinsic and Extrinsic Regulation of Mammalian Hematopoiesis in the Fetal Liver.

Histology and Histopathology. 2014 in press.

・ Tomoko Inoue, Kasem Kulkeaw, Kanitta Muenu, Yuka Tanaka, Yoichi Nakanishi, and Daisuke Sugiyama.

The herbal drug ninjin'yoeito accelerates myelopoiesis but not erythropoiesis in vitro.

Genes to Cells, 査 読 有 ,19(5):432-440, 2014.

・ Tan KS, Tamura K, Lai MI, Veerakumarasivam A, Nakanishi Y, Ogawa M and Sugiyama D.

Molecular pathways governing development of vascular endothelial cells from ES/ iPS cells.

Stem Cell Rev, 査 読 有 ,9(5):586-98, 2013.

・ Antas VI, Al-Drees MA, Prudence AJ, Sugiyama D and Fraser ST.

Hemogenic endothelium: a vessel for blood production.

Int J Biochem Cell Biol, 査 読 有 ,45(3):692-695, 2013.

・ Sugiyama D, Kulkeaw K and Mizuochi C.

TGF-beta-1 up-regulates extra-cellular matrix production in mouse hepatoblasts.

Mech Dev, 査 読 有 ,130(2-3):195-206, 2013.

・ Mizuochi C, Fraser ST, Biasch K, Horio Y, Kikushige Y, Tani K, Akashi K, Tavian M and Sugiyama D.

Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic transition during early embryogenesis.

PlosOne, 査 読 有 ,7(4): e35763, 2012.

・ Kulkeaw K, Inoue T, Mizuochi C, Horio Y, Ishihama Y and Sugiyama D.

Ectopic expression of Hmgn2 antagonizes mouse erythroid differentiation in vitro.

Cell Biol Int, 査 読 有 ,36(2): 195-202, 2012.

〔学会発表〕(計9件)

・ Kulkeaw Kasem, 杉山 大 介

Dppa3 accelerates erythroid differentiation accompanied with globin synthesis in the mouse fetal liver.

第 7 回 武 田 科 学 振 興 財 団 薬 学 科 学 シ ン ポ ジ ウ ム、大 阪、2014 年 1 月 18 日、ポ ス タ ー 発 表

・ Keai Sinn Tan, 杉山 大 介

SCF and IGF-1 accelerate erythropoiesis in the spleen of mouse embryo

第 7 回 武 田 科 学 振 興 財 団 薬 学 科 学 シ ン ポ ジ ウ ム、大 阪、2014 年 1 月 18 日、ポ ス タ ー 発 表

・ 杉山 大 介

胎 生 期 造 血 ニ ッ チ 制 御 機 構 解 析 に よ る 新 規 生 理 活 性 物 質 の 同 定

第 17 回 バ イ オ 治 療 法 研 究 会 学 術 集 会、福 岡、2013 年 12 月 7 日、口 頭 発 表

・ 杉山 大 介

胎 生 期 造 血 ニ ッ チ 制 御 機 構 解 析 に よ る 新 規 生 理 活 性 物 質 の 同 定

第 59 回 幹 細 胞 治 療 研 究 フ ォ ー ラ ム、福 岡、2013 年 5 月 16 日

口 頭 発 表 ( 特 別 講 演 )

・ Daisuke Sugiyama, Kasem Kulkeaw, Tomoko Inoue, Chiyo Mizuochi, Wai Feng Lim, Sarinthip Preedagasamzin, Keai Sinn Tan

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver hematopoiesis through extracellular matrix and cytokine production

Keystone Symposia, Hematopoiesis January 14-19, 2013. Sheraton Steamboat Resort, Steamboat Springs, Colorado (アメリカ) ポスター発表

・ Daisuke Sugiyama, Kasem Kulkeaw, Tomoko Inoue, Wai Feng Lim, Sarinthip Preedagasamzin, Keai Sinn Tan

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver hematopoiesis through extracellular matrix and cytokine production

Cold Spring Harbor Asia Conferences, Stem Cells and Developmental Mechanisms.

December 3-7, 2012. Suzhou (China)、口 頭 発 表

・ 杉山 大 介

Embryonic regulation of the hematopoietic stem cell niche and implications for its expansion.

The 3rd Meeting of Asian Cellular Therapy Organization.

November 15 17, 2012, Chiangmai (Thailand)、口 頭 発 表 ( 招 待 講 演 )

・杉山大介

Embryonic regulation of the hematopoietic niche and implications for haemotherapy.

1st International Conference on Stem Cells.

September 6-11, 2012, Chania (Greece)

口頭発表(招待講演)

・杉山大介

The use of animal models in hematopoiesis research

4th Malaysian Tissue Engineering & Regenerative Medicine Scientific Meeting

June 3-4, 2012, Langkawi、口頭発表(招待講演)

〔図書〕(計1件)

・Sugiyama D and Sasaki T.

Isolation of embryonic hematopoietic niche cells by flow cytometry and laser capture micro-dissection.

Methods in Mol Biol.1035:57-65, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：アセチル化酵素競合阻害因子

Gm16515の新規用途

発明者：杉山 大介

権利者：九州大学

種類：特許

番号：特許願 2012-080211

出願年月日：2013年3月29日

国内外の別：国内

名称：造血細胞の増殖ペプチド及びその用途

発明者：杉山 大介

権利者：九州大学

種類：特許

番号：特許願 2014-070968

出願年月日：2014/3/31

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://jisedai.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 大介 (Daisuke Sugiyama)

九州大学 医学研究院 准教授

研究者番号：00426652

(2)研究分担者

石谷 太 (Tooru Ishitani)

九州大学 生態防御医学研究所

准教授

研究者番号：40448428