

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590286
 研究課題名（和文） 生後の赤血球分化・増殖における転写因子 GATA-1 の機能解明
 研究課題名（英文） Analysis of *gata1* deficiency in postnatal erythropoiesis

研究代表者
 大根田 絹子（OHNEDA KINUKO）
 高崎健康福祉大学・薬学部・教授
 研究者番号：50323291

研究成果の概要：転写因子 GATA-1 の生後の造血における役割を検証するため、条件付 *gata1* ノックアウトマウスと誘導的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを用いて、成体造血組織において *gata1* を欠失させて解析した。その結果、赤血球分化は赤芽球前駆細胞の段階から障害され、好塩基性赤芽球以降に分化した細胞はほとんどみられなかった。また、これらのマウスに貧血を誘発し赤血球造血を刺激しても代償性造血は観察されなかった。したがって、GATA-1 は胎生期のみならず成体においても赤血球分化に必須であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学・転写因子・細胞分化・遺伝子発現制御・赤血球

1. 研究開始当初の背景

（1）哺乳類における造血系の発生過程は、細胞の系列や分化段階に応じて特異的に発現する転写因子群のネットワークによって厳密に制御されている。造血は生涯持続して行われるが、造血が行われる臓器や造血をとりまく環境は胎生期と生後で異なっている。胎生期では、造血の場は卵黄嚢から胎仔肝臓へと変化する。また、急激な成長に応じた活発な細胞増殖を必要とする。一方、成体では、個体の大きさの変

動は小さいが、造血をめぐる環境はときに著しく変化し、それに応じた恒常性維持を目的とした造血が必要となる。胎生期における転写因子の役割については、これまで主にノックアウトマウスを用いた研究が進められてきた。しかしながら、多くの造血系転写因子のノックアウトマウスが胎生致死となることから、生後の造血における転写因子の機能については解析が十分に進んでいない。最近、Runx1 や SCL などいくつかの転写因子について成体マウス

で誘導的に転写因子の発現を欠失させた解析が行われた。その結果、造血系転写因子の役割は、胎生期と生後で必ずしも同一ではないことを示唆する知見が得られている。

(2) Zinc finger 型転写因子 GATA-1 は血球系細胞では赤血球・巨核球・マスト細胞・好酸球・樹状細胞と限られた細胞系列に特異的に発現している。赤血球と巨核球における GATA-1 の役割については、ノックアウトマウスや胚性幹細胞の分化誘導実験などによる解析が進められてきた。その結果、GATA-1 は赤血球と巨核球の分化に必須であることが示唆されている。*gata1* ノックアウトマウスは胎生 12.5 日までに胎児型赤血球の分化障害のため致死となる。そのため、出生後に GATA-1 を欠失させたときの造血系への影響についてはこれまで解析されていなかった。

2. 研究の目的

以上のような背景から、GATA-1 の生理的役割も、他のいくつかの転写因子と同様に胎生期と生後で異なっている可能性がある。しかしながら、生後の造血における GATA-1 の生理的役割については十分に解明されていなかった。そこで本研究は、Cre-loxP システムを用いた *gata1* 遺伝子の条件付きノックアウトマウスを用いて、生後の造血における GATA-1 の機能喪失を個体レベルで解析し、GATA-1 の生後の造血における役割を解明することを目的とする。本研究では、発現が誘導できる2種類の Cre-トランスジェニックマウスを用いて、*gata1* の発現を未分化な造血系前駆細胞から欠失させる。また、定常状態でのゆるやかに進行する赤血球造血と、貧血などのストレスを負荷したときにみられる代償性造血の双方について、GATA-1 欠失の影響を解析する。GATA-1 は、細胞系列特異的な発現を示し、ある細胞系列の分化を統括的に制御する「マスターレギュレーター遺伝子」の代表例である。よって本研究の成果は、生後の造血系における恒常性維持機構とその破綻による疾患の病態の包括的な理解に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) インターフェロンによる誘導的 *gata1* ノックアウトマウスの作成と血液学的解析

マウス *gata1* 遺伝子のエクソン II-VI を挟んで loxP 配列を挿入した *gata1* floxed マウスは、共同研究者であるオランダ・エラスムス大学の Philipsen 博士により作成され、研究代表者に分与されている。このマウスに、インターフェロン誘導性の Mx-Cre トランスジェンを発現させ、インターフェロン誘導剤 (pIpC) の投与により全身性に Cre を発現させる。pIpC 投与後、経時的に GATA-1 の発現量を解析し、*gata1* 遺伝子の組み換え効率を求める。また、*gata1* 欠失細胞の性状解析として、末梢血ギムザ染色、網状赤血球染色、骨髄・脾臓標本のヘマトキシリン-エオジン染色、アセチルコリンエステラーゼ染色 (巨核球染色)、GATA-1 免疫染色等の組織学的解析、フローサイトメトリー、コロニーアッセイ等の解析を行う。

Mx-Cre による *gata1* 遺伝子の組み換えが不十分であった場合には、Cre-ER^T による誘導的発現を試みる。この系は、Cre リコンビナーゼを変異型エストロゲン受容体との融合タンパク質 Cre-ER^T として発現させることにより、エストロゲンアナログである 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) 投与によって誘導的に Cre を活性化させる系である。*gata1* 遺伝子の発現が細胞系列特異的であるため、Cre-ER^T は全身の細胞に強く発現する ROSA26- Cre-ER^T マウスを用いる。

(2) ストレス造血における GATA-1 の機能解析

定常状態における GATA-1 欠失細胞の解析結果を踏まえて、ストレス造血における GATA-1 の生理的役割を解析する。具体的には、フェニルヒドラジンを投与してマウスに溶血性貧血を誘発し、代償性造血が GATA-1 欠失によりどのような影響を受けるのかを解析する。

4. 研究成果

(1) インターフェロンによる誘導的 *gata1* ノックアウトマウスの作成と組織学的解析

インターフェロン誘導性 Mx-Cre を発現する *gata1* floxed マウスに pIpC を投与して経時的に経過を観察したところ、赤血球数には変化が見られなかった。また、骨髄・脾臓の PCR, サザンブロット解析により、*gata1* 遺伝子の組み換えは不十分であると考えられた。網状赤血球増加がみられたことから、GATA-1 欠失細胞からの赤血球造血

は減少し、GATA-1 を欠失していない細胞が代償性に増加していると考えられた。一方、末梢血の血小板数は pIpC 投与後徐々に減少した。巨大血小板などの形態異常も観察された。脾臓では巨核球が著増しており、これらの巨核球は免疫染色では GATA-1 抗体により染色されなかった。これらの GATA-1 欠失巨核球の血小板放出反応は野生型細胞に較べて低下していた。これらの所見は、過去に報告された巨核球特異的に GATA-1 を欠失しているマウスの解析結果と一致するものであった。すなわち、GATA-1 は巨核球の増殖に対して抑制的にはたらくこと、血小板放出機能など巨核球の分化・成熟を促すことが考えられた。

(2) ROSA26-Cre-ER^T マウスを用いた解析次に、エストロゲンアナログである 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) によって誘導的に Cre を活性化する系を用いて GATA-1 の欠失を試みた。その結果、4-OHT 投与後 3 週目の骨髄では、組み換えが起こらなかった *gata1* 遺伝子に由来する PCR 増幅は見られなかった。また骨髄のウエスタンブロット解析では GATA-1 タンパク質が検出されなかった。このように、ROSA26-Cre-ER^T は造血系細胞ではほぼ完全に floxed *gata1* の組み換えを起こすことができると考えられた。このマウスの赤血球を解析したところ以下のような結果が得られた。

4-OHT 投与後 3 週目、4 週目の末梢血所見では、血小板数低下、進行性の貧血、高エリスロポエチン血症が観察された。これらのマウスの骨髄と脾臓から採取した細胞のフローサイトメトリー解析では、CD71・Ter119 を共に発現する分画にある好塩基性赤芽球に相当する細胞が著しく減少していた。

これらのマウスの脾臓の組織所見では、白脾髄に較べて赤脾髄の領域が著しく減少し、脾臓切片の辺縁に薄く観察されたのみであった。

これらのマウスの骨髄細胞を用いたコロニーアッセイでは、赤血球前駆細胞に由来する BFU-E、CFU-E とともにコロニー数が低下していた。

これらのマウスにフェニルヒドラジンによる溶血性貧血を惹起しても野生型マウスで観察された代償的な赤血球造血の亢進は見られず、貧血は更に悪化

した。

以上の結果から、*gata1* を欠失させたことにより、赤血球系の造血が前駆細胞の段階から著しく障害されていると考えられた。したがって、GATA-1 は胎生期のみならず成体においても赤血球と巨核球分化に必須であることが示唆された。ただし、本研究では、造血幹細胞・前駆細胞から赤血球への分化が決定する過程の未分化な分化段階については十分に解析していない。胎生期と生後の造血における GATA-1 の機能の相違がそのような未分化な細胞で見出される可能性は未だ残されている。

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 9 件)

Suzuki M, Moriguchi T, Ohneda K, Yamamoto M. (2009) Differential contribution of the Gata1 gene hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. *Mol Cell Biol.* 29, 1163-1175, 2009 査読有

大森慎也 大根田絹子 (2008) 成体 Gata1 欠損マウスにおける赤血球分化異常 *血液・腫瘍科* 57. 658-663, 査読無

Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y. (2008) The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood* 112, 1482-1492. 査読有

Yamashita T, Ohneda K, Nagano M, Miyoshi C, Kaneko N, Miwa Y, Yamamoto M, Ohneda O, Fujii-Kuriyama Y. (2008) Hypoxia-inducible transcription factor-2alpha in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1. *J Biol Chem.* 283, 18926-18936. 査読有

Gutiérrez L, Tsukamoto S, Suzuki M, Yamamoto-Mukai H, Yamamoto M, Philipsen S, Ohneda K*. (2008) Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its

essential role in steady-state and stress erythropoiesis. *Blood* 111, 4375-4385. (*: corresponding author)
査読有

Yamashita T, Ohneda O, (6名省略, 9番目), Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Poellinger L, Yamamoto M. (2008) Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol.* 28, 1285-1297.
査読有

Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, Kimura KI, Nakagawa T, Shibuya M, Yoshikawa H and Ohneda O. (2007) Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood* 110, 151-160. 査読有

Ferreira R, Wai A, (4名省略, 7番目), Ohneda K, Grosveld F, Yamamoto M and Philipsen S. (2007) Dynamic regulation of gata factor levels is more important than their identity. *Blood* 109, 5481-5490. 査読有

Shimizu R, Trainor CD, Nishikawa K, Kobayashi M, Ohneda K and Yamamoto M. (2007) GATA-1 self-association controls erythroid development in vivo. *J Biol Chem.* 282, 15862-15871. 査読有

[学会発表](計 4 件)

大森 慎也、石嶋 康史、大根田 絹子 マスト細胞における GATA 転写因子の自立のおよびネットワーク発現機構 BMB2008(日本生化学会・日本分子生物学会合同年会) 2008.12.9-12 神戸ポートアイランド

Ohneda K, Nakano M, Ishijima Y, Yamamoto M. Characterization of a functional ZBP-89 binding site that mediates gata1 gene expression during hematopoietic development Oct. 11-14, 2008, 16th Hemoglobin Switching meeting, Monterey, California

Ohneda K, Gutiérrez L, Tsukamoto S, Suzuki M, Yamamoto-Mukai H, Yamamoto M,

Philipsen S Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress The 21th NAITO CONFERENCE Nuclear Dynamics and RNA (I) June 24-27, 2008, Yatsugatake Royal Hotel

大根田 絹子 Laura Gutiérrez 鈴木未来子 塚本佐保 向井陽美 山本雅之 Sjaak Philipsen 生後の赤血球・巨核球造血における転写因子 GATA-1 の機能解析 日本薬学会第 128 回年会 2008 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大根田 絹子 (OHNEDA KINUKO)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授
研究者番号: 50323291

(2)研究分担者

石嶋 康史 (ISHIJIMA YASUSHI)
高崎健康福祉大学・薬学部・助教
研究者番号: 10433640

大森 慎也 (OHMORI SHINYA)
高崎健康福祉大学・薬学部・助手
研究者番号: 10509194

(3)連携研究者