

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591111

研究課題名（和文） 血液細胞分化の不可逆性の分子基盤の解明

研究課題名（英文） A study of molecular mechanisms underlying the irreversibility of hematopoietic differentiation

研究代表者

北島 健二（KITAJIMA KENJI）

大阪大学・医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：10346132

研究成果の概要：血液細胞の分化は不可逆的であり、細胞系列の運命付けにより、他の細胞系列への分化能力を恒久的に失う。この運命付けの分子基盤の研究を進めた結果、従来、転写活性化を担うとされてきた転写因子が、DNA メチル化などのエピジェネティック修飾を制御することにより不可逆的な遺伝子発現変化を誘導していることが明らかとなった。このことから、細胞分化の不可逆性の分子基盤には、転写因子によるエピジェネティック修飾の制御が関与しているものと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：血液細胞、胚性幹細胞、転写因子、細胞分化、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞分化の不可逆性は普遍的な現象であり、クロマチン構造の大幅な変化などが関与していると考えられているが、その分子基盤については、多くが未解明なまま残されていた。

我々の研究室では、OP9 ストロマ細胞によるマウス胚性幹細胞（ES 細胞）

から血液細胞への分化誘導法（OP9 システム）を開発し（Nakano T et al. *Science* 265:1098-101,1994）、血液細胞の発生・分化の研究を一貫して行っている。この方法では、ES 細胞から分化多能性を有する造血前駆細胞を得ることができる。

George Daley らのグループは、OP9 システム、およびテトラサイクリンに

よる遺伝子発現誘導システムを用いて、HoxB4 の強制発現により長期骨髄再建能を有する未分化血液細胞への分化誘導に成功している (Kyba M et al. *Cell* 109:29-37,2002)。

我々は、OP9 システムと、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (TET-OFF システム) を組み合わせることにより、ES 細胞から血液細胞への分化において、コンディショナルに遺伝子発現を誘導するシステムを構築している。この OP9 システムと TET-OFF システムを用いた研究により、

- ① 転写因子 GATA-2 のコンディショナルな発現が、未分化血液細胞の増幅、および、マクロファージから巨核球への運命転換を誘導すること、
- ② 従来の研究で用いられていた GATA-2 とエストロゲン受容体のリガンド結合部位の融合遺伝子 GATA-2/ER は、GATA-2 とは異なる生物学的作用を示すこと (Kitajima K et al. *EMBO J* 21:3060-69,2002)、
- ③ 転写因子 GATA-1・2 と結合する転写補助因子 FOG-1 の細胞増殖制御機能は血液細胞の分化段階、および分化系列依存的であること (Tanaka M et al. *Genes Cells* 9:1213-26,2004)、
- ④ GATA-1 遺伝子欠損 ES 細胞と TET-OFF システムによるコンディショナルなレスキューを用いて、赤血球系細胞の細胞増殖・細胞分化・アポトーシスに対する GATA-1 の作用機序が異なること (Zheng J et al. *Blood* 107:520-27,2006)、

を、明らかにしてきた。また、GATA-2 による巨核球からマクロファージへの運命転換は、マクロファージ分化に必須な転写因子 PU.1 の発現量に依存し、PU.1 存在下では、GATA-2 は、赤

血球へ運命転換を誘導すること (Kitajima K et al. *Blood* 107:1857-63,2006)、GATA-1 遺伝子の欠損により赤血球系細胞が分化多能性を獲得すること (Kitajima K et al. *Genes Dev* 20:654-659,2006)、も見出している。本研究申請は、これらの研究成果を基盤として、生物学上の命題である細胞分化の不可逆性の分子メカニズムの解明に挑むものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子 GATA-1 および GATA-2 の細胞分化における機能解析を通して、血液細胞分化の不可逆性の分子基盤を明らかにすることである。

我々の研究室では、GATA-1 の欠損により、最終分化直前の前赤芽球様の細胞が、試験管内において自己複製能、および分化多能性を獲得することを見出している。このことは、GATA-1 が赤血球系において細胞分化の不可逆性に必須であることを意味する。また、この成果は生体内に比較的少量に存在する分化段階の進んだ血液細胞を用いて、一つの遺伝子の改変により、機能的に異なる細胞への“脱分化”が可能であることを示しており、再生医療で必要とされる細胞の供給法としても利用できる可能性が高い。

また、我々は、GATA-2 の一過性過剰発現により、細胞分化の運命転換が誘導されることを見出している。これらの研究結果は、GATA 因子により、細胞分化の不可逆性を制御できる可能性を示している。本研究では、転写因子 GATA-1 および GATA-2 の細胞分化における機能解析を通して、血液細胞分化の不可逆性の分子基盤を明らかにする。あわせて、臨床応用が可能な細胞分化制御技術の確立、細胞における脱分化誘導技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究の遂行にあたり、我々の研究室で開発した独創的なマウス胚性幹細胞の試験管内血液細胞分化誘導システム（OP9システム）を利用した。

OP9システムは、血液細胞発生・分化研究のツールとして国内外において広く用いられている。我々の研究室は、常にその分野のトップとして研究を行っている。

マウス ES 細胞は、生体内の血液細胞と比べて遺伝子操作が容易であり、gain of function、loss of function のための研究ツールとして最適である。

我々は、既に GATA-1 遺伝子欠損 ES 細胞株を樹立している。さらに、TET-OFF システムの導入により、ES 細胞から血液細胞への分化において、コンディショナルに遺伝子発現を誘導するシステムを構築している。TET-OFF システムは、血液細胞の各分化段階における転写因子の一過性強制発現に有効である。

OP9 システムの特徴は、①赤血球、巨核球、マクロファージなどへの選択的分化誘導、②終末分化した機能的な血液細胞への分化誘導、③ES 細胞から血液細胞の同調的な分化進行、であり、生体内の造血細胞の利用と比べて、各血液細胞系列の同定、単離が容易である、という利点がある。

4. 研究成果

転写因子 GATA-1 および GATA-2 による、エピジェネティック修飾の制御が、不可逆的な遺伝子発現変化を引き起こすこと、そして細胞分化の不可逆性にも関与していることを明らかにすることが出来た。

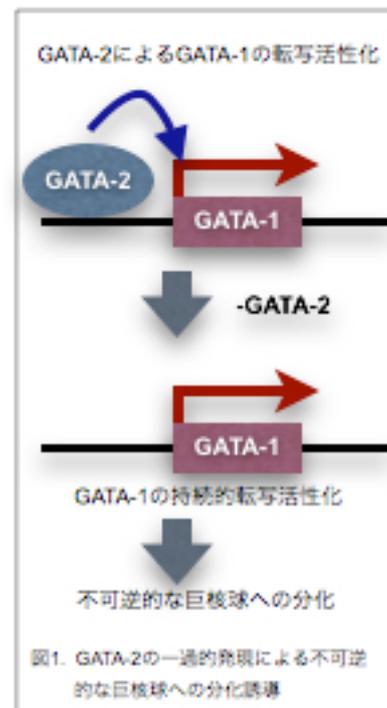
(1) GATA-2 による不可逆的な巨核球への運命転換

GATA-2 は、造血幹・前駆細胞の増殖に関与している転写因子である。

マウス胚性幹細胞から試験管内で分化誘導した造血前駆細胞へ、GATA-2 の強制発現を行い、マクロファージ方向への分化誘導を行うと、マクロファージへの分化が阻害され、巨核球へと運命転換する。この運命転換は、不可逆的なものであり、GATA-2 の一過的発現で十分であることを見出した。

さらに、GATA-2 の一過的発現によって、赤血球・巨核球の分化に必須な転写因子 GATA-1 の持続的な発現が誘導されることが判明した。

この運命転換における GATA-1 の役割を調べるために、GATA-1 欠損造血前駆細胞へ GATA-2 の強制発現を行った。その結果、巨核球への分化転換の減少が認められたことから、GATA-2 は GATA-1 の発現亢進を持続的に誘導することによって、巨核球への運命転換を行っているものと考えられた（図1）。



(2) GATA-1 欠損による赤血球系細胞の運命転換

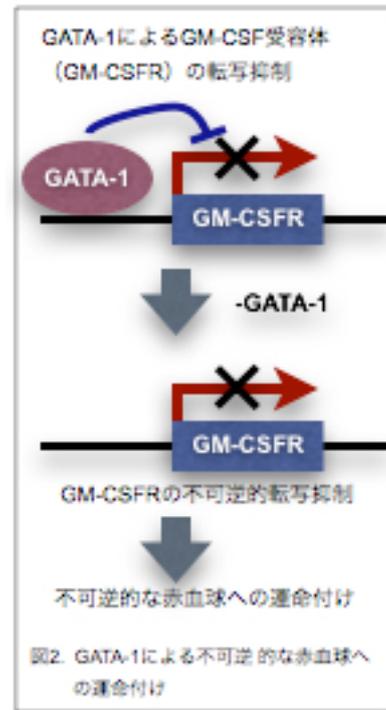
我々は GATA-1 を欠損した赤血球系細胞が、GM-CSF、IL-3 により好中球・マクロファージ、マスト細胞へ分化転換することを見出している。

そこで、GATA-1 欠損赤血球系細胞を用いて、好中球・マクロファージに特異的に発現している遺伝子の発現解析・エピジェネティック解析を行った。

その結果、GATA-1 欠損赤血球系細胞では、本来、好中球・マクロファージ系列に限局して発現している好中球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 受容体 *gm-csfr* が発現しており、野生型赤血球系では、発現が認められないことを見出した。

さらに、*gm-csfr* の転写開始点付近のヒストンは、GATA-1 欠損赤血球系細胞では、高アセチル化状態であるが、野生型赤血球系細胞では、低アセチル化状態であることが明らかとなった。

野生型赤血球系細胞へヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A 処理を行うと、*gm-csfr* の発現が認められた。従って、赤血球系における *gm-csfr* の転写抑制は、ヒストン脱アセチル化によるものであることが判明した。以上から、GATA-1 欠損赤血球系細胞における好中球・マクロファージ特異的遺伝子の異所性発現は、ヒストンアセチル化などのエピジェネティックパターンの成立が行われなことが原因であると考えられた (図2)。



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) Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, Eto K, Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M.
Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells.
Biochem Biophys Res Commun, 366: 763-8, 2009 (査読あり)
- 2) Sakai E, Kitajima K, Sato A, Nakano T.
Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation.
Exp Hematol, 37: 334-45, 2009 (査読あり)
- 3) Sugiyama D, Tanaka M, Kitajima K, Zheng J, Yen H, Murotani T, Yamatodani A, Nakano T.

Differential context-dependent effects of friend of GATA-1 (FOG-1) on mast-cell development and differentiation.

Blood, 111: 1924-32, 2008 (査読あり)

- 4) Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, Kitajima K, Ikawa M, Okabe M, Niwa H, Nakano T.

Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3.

Stem Cells, 25: 2705-11, 2007 (査読あり)

- 5) 北島健二.

赤血球・巨核球造血における転写因子ネットワーク

実験医学 25: 1554-1561, 2007 (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 北島健二, 鄭 潔, 杉山大二郎, 顔 宏哲, 仲野 徹.

転写因子依存的なエピジェネティック修飾を介した細胞運命決定.

第 6 回 幹細胞シンポジウム, 東京, 2008 年5月16~17日

- 2) 北島健二.

GATA-1 欠損赤血球系細胞の自己複製能・分化多能性獲得.

第 3 回 血液学若手の会, 東京, 2007年7月21日

- 3) 北島健二, 鄭 潔, 顔 宏哲, 杉山大二郎, 仲野 徹.

転写因子PU.1による造血細胞の多能性・自己複製制御.

第 5 回 幹細胞シンポジウム, 淡路, 2007 年5月17~19日

- 4) 榎原宏紀, 木村 透, 大塚 哲, 中村肇伸, 北島健二, 伊川正人, 岡部 勝, 丹羽仁史, 仲野 徹.

GSK-3阻害による効率的なES細胞の樹立.

第 5 回 幹細胞シンポジウム, 淡路, 2007 年5月17~19日

6. 研究組織

(1)研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA KENJI)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (常勤)

研究者番号 : 10346132

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし