

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591126

研究課題名（和文） C/EBP β による好中球造血制御機構の解明研究課題名（英文） Involvement of C/EBP β in the regulation of granulopoiesis

研究代表者 平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50315933

研究成果の概要：

生体防御において重要な好中球産生調節において重要な働きをしていることが知られている転写因子 C/EBP β がその過程でどのような調節をうけているのかを明らかにすることと、また好中球が骨髄中で造血幹細胞から分化する各ステップにおいて C/EBP β がどのように働いているかを解析するシステムの樹立を目的とした。(1)レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを用いたプロモーター解析法を考案し、好中球の分化過程において C/EBP β のプロモーター部位で重要な配列を決定した。(2)また分化段階特異的な C/EBP β の機能評価のために骨髄中での好中球の分化段階をフローサイトメトリーによって解析する方法を樹立した。

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：感染、転写因子、好中球、骨髄、造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄での造血を制御する因子はサイトカインなど細胞外から刺激する因子と転写因子をはじめとする細胞内の因子に分けるこ

とができ、一定レベルの造血を維持するために両者は互いに協調している。一方、感染症や出血など生体にとって“緊急時”には生体を防御するために必要に応じた血液細胞集団

の造血が亢進する。従来の造血の転写制御に関わる研究の多くは定常状態の造血に焦点をあてて進められてきた。それに対して“緊急時”の造血の転写制御が定常状態と比べてどのように変化しているかについては未解明な部分が多い。

好中球は寿命が 24~48 時間と短いため、その造血調節は生体防御にとって非常に重要である。定常状態の好中球造血には従来から転写因子 CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)が重要な働きをしていることが知られていた。しかしながら感染などで生体が好中球を多数必要としている状況においても C/EBP α が重要な働きをしているかどうかはこれまで明らかではなかった。申請者は真菌感染やサイトカイン投与など好中球造血が刺激されている状況での C/EBPファミリー遺伝子の発現および機能について検討した (Hirai H. et al. Nature Immunology 7: 732-739, 2006)。その結果、緊急時に好中球の産生が亢進するためには C/EBP β の働きが重要であることを明らかにした。これらの結果は定常状態と緊急時において好中球造血を調節する転写制御システムが異なっていることを示している。

2. 研究の目的

好中球産生は C/EBP β に依存している定常状態とより C/EBP β への依存度が高まる緊急時の二つのモードが存在することが示唆される。その二つのモードの切り替えには C/EBP β の発現調節が重要であることが推察される。そこで C/EBP β の転写レベルでの調節を理解するためにプロモーターの解析を行うことを目的とした。また好中球は造血幹細胞からさまざまな分化段階を経て成熟するが各分化段階で C/EBP β がどのような働きをしているかを理解することも重要な課題と考えられるため、その足がかりとしてフローサイトメトリーで未分化な細胞から成熟した好中球までの連続した分化段階を解析する方法を樹立することをもうひとつの目的とした。

3. 研究の方法

(1)レトロウイルスあるいはレンチウイルスベクターに恒常的に活性のある PGK プロモーターと短半減期型の変異型緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子を結合したレポーター発現カセットを持つレトロウイルスベクターを製作した。短半減期型の GFP 遺伝子上流には解析対象となるプロモーター領域の遺伝

子配列を組み込んだ。5-FU 処理した骨髓細胞を採取し、上記レトロウイルスを感染させた後に試験管内でサイトカイン刺激下に培養し 48 時間後にフローサイトメトリーで解析し、GFP の蛍光の変化がプロモーターの有無により変化することを確認した。

(2) マウスから骨髓細胞を採取し各種血液細胞の分化抗原に対する抗体(抗 lineage 抗体: 抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD19 および抗 B220 抗体)と抗 CD117 (c-kit)抗体と好中球分化の指標となる抗 Gr-1 抗体や Ly-6G 抗体と組み合わせて染色しフローサイトメトリーで解析し細胞をソーティングしてその形態やリアルタイム PCR によって遺伝子発現の状況を解析した。

4. 研究成果

(1) レトロウイルスを感染させた後に試験管内でサイトカイン刺激下に培養し 48 時間後にフローサイトメトリーで解析し、GFP の蛍光の変化がプロモーターの有無により変化することを確認した。ついで C/EBP β のプロモーターを結合した GFP の発現を観察し、GFP の蛍光強度の変化としてプロモーター活性が捉えられることを確認した。さらに

C/EBP β のプロモーター領域の種々の長さの欠失型変異体を持つレトロウイルスベクターを作製し、C/EBP β のプロモーター塩基配列上でサイトカイン刺激により転写が亢進するために必要な領域(コアエレメント)が翻訳開始点を 0 として-243bp から-43bp の間に存在すると予測することができた。

(2) 好中球の分化段階を確認するためにソーティングした細胞のギムザ染色による形態の確認と貪食能、走化性を検討したほか、好中球の一次顆粒(ペルオキシダーゼ, エステラーゼ, β -グルクロニダーゼ, 酸ホスファターゼ, ホスホリパーゼ, コラゲナーゼ, エステラーゼ, カテプシン)、二次顆粒(リゾチーム, アルカリホスファターゼ)および三次顆粒を構成する遺伝子の発現レベルを定量的 PCR で検討した。好中球の分化指標として抗 Gr-1 抗体、抗 Ly-6G 抗体、抗 7/4 抗体などや他の抗体との組み合わせを検討したが、抗 Ly-6G 抗体を用いた場合に最もよい結果が得られることが判明した。この結果骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球、桿状核球、分葉核球にほぼ相当するような集団を同定可能であると考えられた。今後分化段階特異的な C/EBP β の機能解析に応用する予定である。

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 2 件)

①骨髄球系造血の感染応答としての転写調節をモニタリングするシステムの開発：平位秀世、今西二郎：第 82 回日本感染症学会総会(松江)、平成 20 年 4 月 18 日

②フローサイトメーターを用いた敗血症における顆粒球造血過程の検討：佐竹早紀子、平位秀世、志馬伸明、稲葉亨、藤田直久、今西二郎：第 83 回 日本感染症学会総会(東京)、平成 21 年 4 月 24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平位秀世 (HIRAI HIDEYO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

50315933

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

赤司浩一 (AKASHI KOICHI)

九州大学・大学院・医学研究科・教授

80380385