

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591121

研究課題名（和文） 毛細血管拡張性小脳失調症責任遺伝子 ATM による細胞分化制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of cell differentiation machinery regulated by ATM

研究代表者

朴 今花 (BOKU KONKA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・メディカルフェロー

研究者番号：70567750

研究成果の概要（和文）：毛細血管拡張性運動失調症では脂肪細胞分、リンパ球分化に障害が見られ ATM が細胞分化に必須であることが明らかとなった。その原因としてヒストンのアセチル化の障害や、DNA 損傷修復と細胞周期調節機構のアンバランスによることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Adipocyte differentiation and lymphocyte differentiation is attenuated in Ataxia Telangiectasia. ATM is essential for cellular differentiation machinery. Differentiation disorder is due to histone acetylation deficiency or discordance of genomic repair and cell cycle regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児腫瘍学 PARP阻害剤 急性リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性小脳失調症 Ataxia Telangiectasia (A-T) は小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を主徴とし、早老症や耐糖能異常を示し、悪性腫瘍を高率に合併する疾患である。責任遺伝子 ATM がコードするタンパク質は DNA 障害認識機構の上で中心的な役割を持ち、DNA2 重鎖切断などにより活性化され、下流に位置する p53 などのアポトーシスや細胞周期調節、DNA 修復に関連する数多くの因子をそのリン酸化することによって調節している。

現在まで ATM の機能と発がんについては数多くの研究が行なわれているが、A-T 患者における小脳失調、毛細血管拡張、耐糖能異常、脂質代謝異常、免疫不全の発症機構に関してはあまり研究が進んでいない。我々は ATM 欠損マウスも A-T 患者と同様に耐糖能異常を示し、ATM/アポリポプロテイン E(ApoE)ダブルノックアウトマウスは高度のメタボリック症候群により生後すぐに致死となることを見出した (Cell Metab. 2006)。ATM 欠損マウスが耐糖能異常を示す原因として ATM 欠損細胞は脂

肪細胞へ分化することができず、そのためインスリン感受性を促進させるアディポネクチンが分泌できないことがその一因と考えられた。この脂肪細胞分化障害の原因は ATM 欠損細胞では脂肪細胞分化に必須な転写因子 C/EBP α が誘導されないことが原因であることが明らかとなった。転写因子 C/EBP α は脂肪細胞の分化のみならず肝細胞分化、骨髄球系血液細胞分化に重要なことが知られている。このことは ATM が欠損することにより C/EBP α の誘導が、分化に必要な様々な細胞の分化に影響があることが考えられる。実際 A-T 患者では血中 α フェトプロテインが高値を示し、肝細胞の成熟が未熟であることが示唆されている。

2. 研究の目的

毛細血管拡張性小脳失調症 Ataxia Telangiectasia (A-T) 責任遺伝子 ATM による細胞分化調節機構を分子生物学的に明らかにすることを通して、個体発生、特に脂肪組織、肝臓および小脳の発生における ATM の役割を明らかにする。

細胞分化における ATM の役割を明らかにすべく研究を進める。ATM が細胞分化にどのようにかかわっているか、特に脂肪細胞、肝細胞、神経細胞に注目し *in vitro* の分化誘導系を用いて研究を行う。現在まで ES 細胞を用いた *in vitro* の様々な細胞への分化誘導系が確立されている。ATM 野生型および ATM が欠損した ES 細胞を用いて脂肪細胞、肝細胞、神経細胞への分化誘導を *in vitro* で細胞生物学的に比較検討するとともにその分子生物学的なメカニズムについて、特に ATM による細胞分化に必要な転写因子制御に主点を置き検討を行う。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト腎臓由来 293T 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) 、 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。ATM^{+/+} 並びに ATM^{-/-} マウス胎児線維芽細胞 MEF はさらに 0.1 mM non-essential amino acids 、 55 μ M 2-mercaptoethanol を添加し培養した。ATM^{+/+} 並びに ATM^{-/-} MEF は p19^{ARF} 欠損細胞である。p19^{ARF} 欠損による脂肪細胞分化能への影響は認められなかった。

In vitro における脂肪細胞への分化誘導

脂肪細胞へ分化誘導するため、増殖の接着阻止が起こるまで培養し。その 2 日後より 5 μ g/ml insulin、1 μ M dexamethasone、0.5 mM isobutyl methyl xanthine 含有 DMEM にて培養を開始し、2 日毎に培地交換を実施した。

Oil Red O 染色

脂肪細胞における脂肪滴を染色するため、細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し 10% formaldehyde で 30 分間固定した。その後、60% Oil Red O (0.15 g / 50 ml of 2-propanol) で 30 分間染色し、60% 2-propanol で軽く洗浄し、さらに PBS で洗浄後、観察した。

ウェスタンブロット

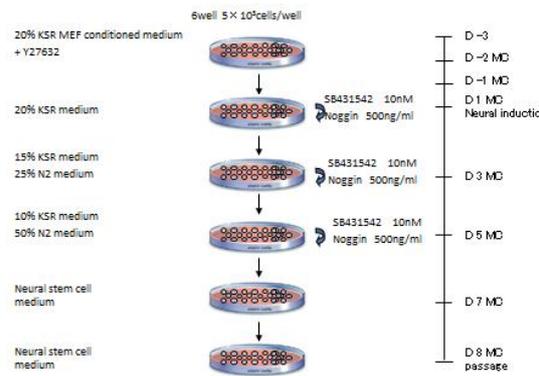
細胞を PBS で洗浄し、RIPA 緩衝液 (150 mM NaCl、1% NP40、0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]、0.1% sodium deoxycholate、5 mM EDTA、10 mM Tris-HCl, pH 7.4、Protease inhibitor) で溶解した後、SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE の後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、5% スキムミルクでブロッキングを行った。その後一次抗体を反応させ、HRP 結合型抗ラビット抗体または抗マウス抗体および ECL で検出した (GE Healthcare)。一次抗体は C/EBP α (14AA)(Santa Cruz)、 α -Tubulin (DM1A)(MERCK) を用いた。

iPS 細胞の作製

野生型および A-T 由来皮膚線維芽細胞にレトロウイルスを用いて pMX-L-myc、pMX-SOX2、pMX-KLF4、pMX-Gli3、pMX-Oct3/4 を感染させることにより iPS 細胞の作製を行った。

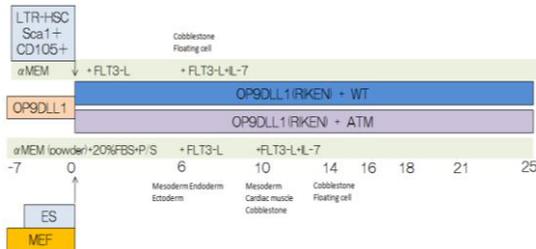
iPS 細胞の神経細胞への分化誘導

iPS 細胞塊を accutase で分散し MatrigelTM (Beckton Dickinson) コートディッシュ上に播種し FGF-2 (10ng/ml) 及び ROCK 阻害剤を添加し、培養を行った。3 日間培養後、10 μ M TGF- β 阻害剤 (SB431542)、Noggin (R&D) 500ng/ml 入り培地に交換し、また徐々に N2 培地の量を 2 日毎に増加し、MatrigelTM コートディッシュ上で neural stem cell medium (NSCM) containing DMEM/F12, N2 supplement (Invitrogen), B27 supplement, 1.5g/L D-glucose, 0.07g/L L-glutamine, 1.7g/L Sodium bicarbonate, 20ng/ml FGF-2, 20ng/ml EGF, and 1% penicillin streptomycin. で培養した。



マウス ES 細胞および骨髄造血幹細胞のリンパ球細胞への分化誘導

ATM 野生型および欠損 ES 細胞を OP9-DLL1 上で培養し FLT3 リガンドおよび IL7 を添加し培養しリンパ球への分化を誘導した。骨髄造血幹細胞は野生型マウスおよび ATM ノックアウトマウスの骨髄から MACS ビーズを用いて、CD105、Sca1 陽性の細胞 (LT-HSC) を抽出して、実験に用いた。



4. 研究成果

ATM 欠損細胞の脂肪細胞分化障害

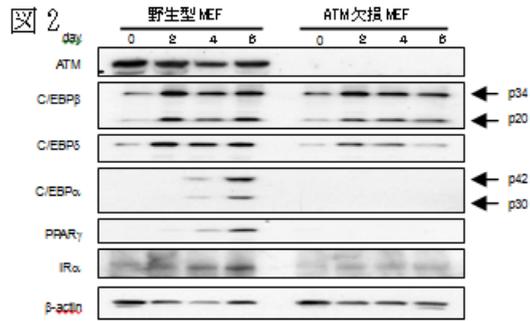
ATM 欠損マウスが耐糖能異常を示す原因として ATM 欠損細胞は脂肪細胞へ分化することができず (図 1)、そのためインスリン感受性を促進させるアディポネクチンが分泌できないことがその一因と考えられた。



野生型 MEF は分化誘導刺激後脂肪滴が Oil Red O で染色され、陽性を示すが、ATM 欠損 MEF は Oil Red O で染色されなかった。

この脂肪細胞分化障害の原因は ATM 欠損細胞では脂肪細胞分化に必要な転写因子

C/EBP α が誘導されないことが原因であることが明らかとなった (図 2)。



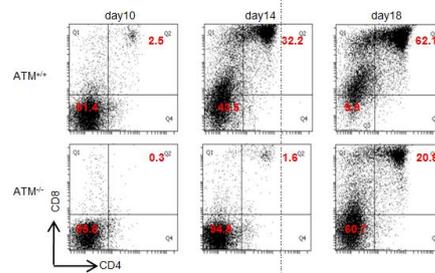
正常 MEF、及び ATM 欠損 MEF を分化誘導刺激後、脂肪分化にかかわる各種転写因子の発現状態をウェスタンブロット法により検討した。

ATM による C/EBP α 発現調節機構において ATM がヒストンアセチル化酵素である p300 と C/EBP α 発現の上流に位置する転写因子 C/EBP β と 3 量体を形成し、C/EBP α のプロモーターのアセチル化を促進することが必要なことが明らかとなった。

ATM 欠損細胞のリンパ球分化障害

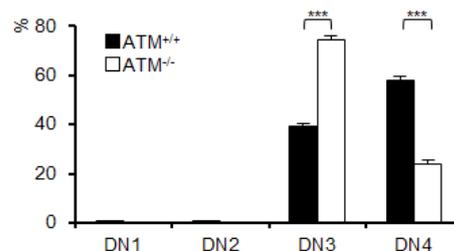
ES 細胞や ATM 欠損マウス造血幹細胞から in vitro でリンパ球へ分化誘導を行うと、ATM 欠損 ES 細胞では DN 期から DP 期への移行が遅れる遅れることが明らかとなった。また従来から報告されているように DP 期での細胞の集積が認められた (図 3)。

図 3



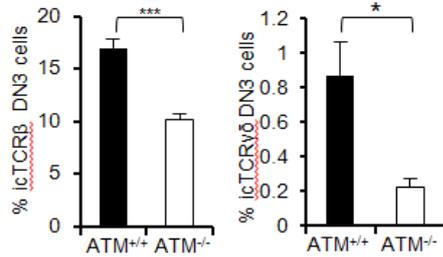
DN 期でのリンパ球分化障害は初めての知見であり、詳細に検討した。DN 期は DN1, DN2, DN3, DN4 と分類されるが、DN3 に集積傾向があることが判明した (図 4)。

図 4



DN3 期では TCR β の再構性が起こることが知られている。TCR β を発現した T 細胞が少ない

いことと合わせて、TCR γ δ 鎖を発現しているT細胞が少ないことがわかった(図5)。
図5



このことから ATM 欠損細胞では DN 期に TCR γ δ 鎖、TCR β 鎖の再構性が適切に起こらないため、分化障害に繋がっていると考えられた。

ATM 欠損細胞の神経細胞の解析

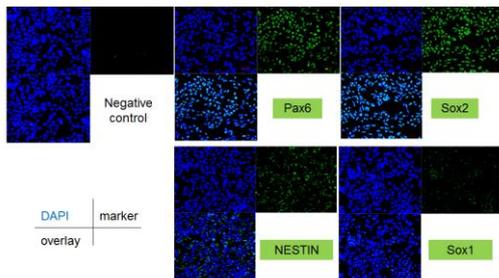
ATM 欠損細胞の神経細胞の分化を解析するため、正常ヒト iPS 細胞および A-T 由来 iPS 細胞より神経幹細胞へ分化誘導することを試み神経幹細胞への分化誘導に成功した(図6)。

図6

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S,



Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood*. 2012;120(4): 789-9.

doi: 10.1182/blood-2012-02-413195 (査読有)

- ② 高木正稔. 毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia と関連疾患 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 2012; 38(1) 17-20 (査読なし)

- ③ 金子節子, 高木正稔. Ataxia Telangiectasia におけるミトコンドリア異常 血液内科 2012; 65(6) 825-31(査読なし)

- ④ Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Sugimoto K, Maruyama M, Sugimoto M.

Cooperative role of the RNA-binding proteins Hzf and HuR in p53 activation.

Mol Cell Biol. 2011 101997-2009.

doi: 10.1128/MCB.01424-10. 413195 (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 日本臨床免疫学会会誌 34(4): 275-275, 2011.

- ② Isoda T, Takagi M, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. DN3 T-cell development failure in Ataxia telangiectasia (AT). 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋

- ③ 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 井川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 毛細血管運動失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会 2011年11月25-27日 前橋

- ④ Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. T-Cell Development Failure At β -Selection Checkpoint and TCR α/δ Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. 53rd American society of hematology, annual meeting. Dec. 10-13, 2011 San Diego

- ⑤ Kaneko S, Takagi M, Fukawatase Y, Umezawa A, Mizutani S. Derivation of neural stem cell via iPS cell from ataxia telangiectasia. 14th International workshop on Ataxia Telangiectasia. Delhi, India, Feb.7-11, 2012

⑥ Isoda T, Takagi, M, Piao J, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. 14th International workshop on Ataxia Telangiectasia. Delhi, India, Feb.7-11, 2012

⑦ 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷 修紀. ATM 欠損 T 細胞分化の DN 期における T リンパ球減少の原因と染色体転座の関係. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 今花 (PIAO JINHUA)
東京医科歯科大学・大学院・メディカルフェロー
研究者番号：70567750

(2) 研究分担者

高木 正稔 (TAKAGI MASATOSHI)
東京医科歯科大学・大学院・講師
研究者番号：10406267

(3) 研究分担者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO MASATAKA)
国立長寿医療センター・研究所・プロジェクトリーダー
研究者番号：50426491

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

