

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390075

研究課題名(和文) 巨核球 血小板炎症サイクルの分子機構と病態形成メカニズム

研究課題名(英文) Contribution of megakaryocytes and platelets to pathogenesis of chronic inflammation

研究代表者

本橋 ほづみ (Motohashi, Hozumi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、巨核球における転写因子NF-E2 p45の機能解析を軸として、血小板とその母細胞である巨核球が、炎症の病態形成に果たす役割の解明を目的とした。巨核球におけるNF-E2 p45の標的遺伝子プロファイルを明らかにし、NF-E2 p45が血小板形成のみならず、血小板の活性化に重要な遺伝子を制御することを見いだした。炎症の際、NF-E2 p45の制御下でこれら遺伝子の発現が亢進することが予想される。

研究成果の概要(英文)：A goal of this research was to clarify a role of platelets and megakaryocytes during the pathogenesis of chronic inflammation through examining the function of NF-E2 p45 in proliferation and differentiation of megakaryocytes and platelet production. We clarified a profile of NF-E2 p45 target genes in megakaryocytes and found that NF-E2 p45 not only promotes platelet production but also confers sufficient reactivity on platelets. It is plausible that these NF-E2 target genes are upregulated during inflammation and contribute to the pathogenesis.

研究分野：転写因子による遺伝子発現制御機構とその生体内機能の解明

キーワード：転写因子 血小板 巨核球 炎症 ストレス

1. 研究開始当初の背景

血小板は止血機構に重要な細胞性血液成分であるが、近年、創傷治癒、免疫応答、がん細胞の転移、切除肝の再生など、多様な生命現象におけるその重要性が報告されている。また、様々な病的条件下における血小板の機能亢進が報告されており、血栓症の原因や炎症の増悪因子の一つとされている。したがって、血小板の数と活性を適切な範囲で調節することは、生体にとって非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、巨核球における転写因子 NF-E2 の機能解析を軸として、血小板とその母細胞である巨核球が、炎症の病態形成に果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 巨核球における NF-E2 p45 の標的遺伝子の同定

巨核球において NF-E2 p45 の下流の遺伝子を明らかにするために、NF-E2 p45 欠損マウス由来の巨核球と野生型マウス由来の巨核球のトランスクリプトームを、マイクロアレイ解析により比較した。また、野生型マウスの胎児肝臓からトロノポエチン存在下で培養して得られる巨核球を用いて、NF-E2 p45 抗体による ChIP-sequence 解析を行った。

さらに、NF-E2 p45 が生体内で血小板の反応性獲得に関与していることを検証するために、NF-E2 p45 の機能不全型変異体である NF-E2 p45 Δ NTD を作成し、当該分子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスと NF-E2 p45 欠損マウスとを交配して、野性型 p45 の代わりに NF-E2 p45 Δ NTD を発現する遺伝子改変マウス (p45^{-/-}: Δ NTD Tg マウス) を作成し、その血小板の活性化能を検討した。

(2) 担癌状態における血小板の活性化能の検討

研究開始当初、担癌状態のマウスでは、脾臓に成熟巨核球が蓄積していることを見いだしていた。この巨核球では、細胞内の活性酸素種が上昇し、p45 の発現量、その下流で制御されている P セレクチンやセロトリントランスポートターの発現量が著増していたことから、巨核球における NF-E2 活性は、担癌状態にตอบสนองして増大するとの仮説をたて、異なるがん細胞の移植による検証を試みた。しかし、がん細胞株の培養が不調であり、実験系の構築が不調であった。

そこで、担癌状態ではなく、慢性炎症においてサイトカインなどの刺激に巨核球が応答し、より反応性が高い血小板を産生する様子を形態学的に捉えるための実験系の確立を行うことにした。

(3) 炎症モデルマウスを用いた血小板活性

化状態の検討

我々は以前に、皮膚ケラチノサイトに活性化型ダイオキシン受容体を過剰発現するトランスジェニックマウス (K14-AhR-CA マウス) を作成した。同マウスは、生後 3 週目前後からアトピー性皮膚炎様の症状を自然発症する。このマウスにおける巨核球分化と血小板の活性化状態を検討した。

また、異なる炎症モデルマウスとして、Scurfy マウスを採用した。Scurfy マウスは、Treg 細胞の分化不全による重度の自己免疫疾患を発症して生後 3 週目あたりに致死となる。このマウスの血小板について同様に解析を行った。

4. 研究成果

(1) 巨核球における NF-E2 p45 の標的遺伝子の同定

NF-E2 p45 欠損マウス由来の巨核球と野生型マウス由来の巨核球のマイクロアレイ解析の結果、NF-E2 p45 欠損マウス由来の巨核球では、トランスポートターや接着因子、細胞間認識の受容体、シグナル伝達系因子、血小板顆粒内の生理活性物質の合成に関わる酵素群など、血小板の機能に直結する因子の発現が低下していることがわかった。また、野生型マウスの巨核球を用いた NF-E2 p45 抗体による ChIP-sequence 解析の結果、トランスクリプトーム解析で見いだされた遺伝子の多くが、NF-E2 p45 による直接の制御を受けていることが明らかになった。これにより、NF-E2 p45 が、血小板の反応性獲得にも重要な貢献を果たしているものと考えられる。

p45^{-/-}:DNT Δ Tg マウスの血小板活性化能を検討した結果、p45 Δ NTD を発現するマウスの血小板では、トロノピンに対する反応の顕著な低下が認められた。したがって、巨核球における NF-E2 の活性の変化が、そこから産生される血小板を質的に変化させており、血小板の反応性を規定すると結論された。

(2) 担癌状態における血小板の活性化能の検討

巨核球の成熟と血小板形成の様子を、形態学的に観察するシステムを確立して、血小板形成の超微細構造の観察を行った。具体的には、大気圧走査電子顕微鏡を用いて、培養液中で、巨核球の初代培養細胞から、胞体胞体突起が形成されて血小板が産生される様子を観察した。その結果、チュブリンが形成途上の血小板を取り囲み、またその内側で P セレクチンを含む α 顆粒の周辺を取り囲む様子が観察された。金粒子でラベルした P セレクチン抗体を用いることにより、形成途上の血小板中の α 顆粒の大きさ、数の観察が容易になることがわかった。

この成果は、巨核球が外界からの刺激を受けた場合に、産生される血小板の性質がどのように変化するかを明らかにするために、有

力なアプローチになると考えられる。

(3) 炎症モデルマウスを用いた血小板活性化状態の検討

K14-AhR-CA マウスの骨髄を解析したところ、造血幹細胞の活性化、前駆細胞の増加、顆粒球系と単球系への分化の亢進が観察された。血小板数はあまり変化していなかった。活性化能を調べるために末梢血から platelet rich plasma の調製を試みたが、活性化が亢進しているためかあまり純度が高いものが得られなかった。フローサイトメトリーによる血小板活性化状態の検討では、通常状態において白血球と結合している platelet-leukocyte aggregate が増加する傾向が認められた。

Scurfy マウスの骨髄を解析したところ、やはり、造血幹細胞の活性化、前駆細胞の増加、顆粒球系と単球系への分化の亢進が観察され、さらに、T 細胞への分化亢進が認められた。このマウスにおいても血小板数の大きな変化はみとめられなかった。我々は、転写因子 NRF2 の活性化は巨核球の分化成熟過程において p45 機能を抑制し、血小板の活性化に重要な遺伝子発現が低下することを見だしている。そこで、NRF2 の活性化により、産生される血小板の過剰な活性化が抑制される可能性があると考えた。手始めに、全身で NRF2 が活性化している *Keap1* ノックダウンマウスを Scurfy マウスと交配したところ、軽度ながら炎症の改善と延命効果が得られた。この結果が巨核球-血小板における NRF2 活性化の効果によるかどうかは、巨核球特異的な *Keap1* 遺伝子ノックアウトの結果を待たなければならない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件、うち、主な 19 件)
文献 16 と文献 19 以外はすべて査読あり

1. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakudara A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H*, and Yamamoto M*. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 103,760-766, 2012. (*corresponding authors)
doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x.
2. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M*, and Motohashi H*. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66-79, 2012. (*corresponding authors)
doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
3. Takaya K, Suzuki T, Motohashi H, Onodera K, Satomi S, Kensler TW and Yamamoto M.

Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system.

- Free Rad Biol Med* 53, 817-827, 2012.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023.
4. Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H and Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 13561-13566, 2012.
doi: 10.1073/pnas.1121572109.
 5. Suzuki M, Yamazaki H, Mukai HY, Motohashi H, Shi L, Tanabe O, Engel JD and Yamamoto M. Disruption of the Hbsl1-Myb locus causes hereditary persistence of fetal hemoglobin in mouse. *Mol Cell Biol* 33, 2402-2412, 2013.
doi: 10.1128/MCB.00065-13.
 6. Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M*, and Motohashi H*. NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. *Mol Cell Biol* 33, 2659-2670, 2013.
(*corresponding authors)
doi: 10.1128/MCB.01274-12
 7. Hirano K, Kinoshita T, Uemura T, Motohashi H, Watanabe Y, Ebihara T, Nishiyama H, Sato M, Suga M, Maruyama Y, Tsuji NM, Yamamoto M, Nishida S, and Sato C. Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM. *Ultramicroscopy* 143, 52-66, 2014.
doi: 10.1016/j.ultramic.2013.10.010.
 8. Murakami S, Yamamoto M*, and Motohashi H*. Hematopoietic stem and progenitor cell activation during chronic dermatitis provoked by constitutively active aryl-hydrocarbon receptor driven by Keratin14 promoter. *Toxicol Sci* 138, 47-58, 2014.
(*corresponding authors)
doi: 10.1093/toxsci/kft273
 9. Murakami S, Shimizu R, Romeo P-H, Yamamoto M*, and Motohashi H*. Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells. *Genes Cells* 19, 239-253, 2014.
(*corresponding authors)
doi: 10.1111/gtc.12126
 10. Onodera Y, Motohashi H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, and Suzuki T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocr Relat Cancer* 21, 241-252, 2014.
doi: 10.1530/ERC-13-0234.
 11. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M,

Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H*, and Yamamoto M*. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol* 34, 900-913, 2014. (*corresponding authors) doi: 10.1128/MCB.01384-13

12. Shirasaki K, Taguchi K, Unno M, Motohashi H*, and Yamamoto M*. Nrf2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch ligation in mice. *Hepatology* 59, 2371-2382, 2014. (*corresponding authors) doi: 10.1002/hep.27020

13. Kanamori M*, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Yamamoto M, Motohashi H*, and Tominaga T. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro-Oncology* 17, 555-565, 2015. (*corresponding authors) doi: 10.1093/neuonc/nou282

14. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, Motohashi H, Yamamoto M, Edwards PA. MAFK Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab* 21, 298-310, 2015 doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.007

15. Goto M, Kitamura H, Alam MM, Ota N, Haseba T, Akimoto T, Shimizu A, Takano-Yamamoto T, Yamamoto M and Motohashi H*. Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from nonalcoholic steatohepatitis. *Genes Cells*, in press. (*corresponding author)

16. 藤田理恵, 本橋ほづみ, 山本雅之. 巨核球分化・血小板産生制御に貢献する転写調節機構. *日本血栓止血学会誌* 23, 539-543, 2012. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjsth/23/6/_contents/-char/ja/

17. Mitsuishi Y, Motohashi H*, and Yamamoto M*. The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* 2, Article 200, 2012. (*corresponding authors) doi: 10.3389/fonc.2012.00200

18. Suzuki T, Motohashi H, and Yamamoto M*. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 340-346, 2013. doi: 10.1016/j.tips.2013.04.005.

19. 佐藤主税, 渡邊要平, 丸山雄介, 佐藤真理, 山本雅之, 辻典子, 本橋ほづみ. 巨核球による血小板産生と樹状細胞による細菌貪食の液中電顕観察. *顕微鏡* 49(1) 14-17, 2014

http://www.microscopy.or.jp/magazine/49_1/49_1j06cs.html

〔学会発表〕(計 59 件、うち、主な 24 件)

1. 村上昌平、本橋ほづみ、山本雅之。造血幹細胞・前駆細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割の解明。第 35 回日本分子生物学会年会。福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市) 2012 年 12 月 11-14 日
2. 藤田理恵、辻本昌理子、藤井聡、皿井明倫、油谷浩幸、本橋ほづみ、山本雅之。転写因子 NF-E2 p45 による血小板機能調節遺伝子の転写活性化。第 85 回日本生化学会大会。福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市) 2012 年 12 月 14-16 日
3. 光石陽一郎、田口恵子、山本雅之、本橋ほづみ。がん細胞における酸化ストレス応答機構の役割と代謝リプログラミングへの貢献。第 85 回日本生化学会大会。福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市) 2012 年 12 月 14-16 日 シンポジウム
4. Hozumi Motohashi, Tsuyoshi Higa, Keiko Taguchi, Yoichiro Mitsuishi, Masayuki Yamamoto. Functional expansion of Nrf2 under the sustained activation of proliferative signals. Keystone Symposium on Nutrition, Epigenetics and Human Diseases. Hilton Santa Fe Historic Plaza Hotel, Santa Fe, New Mexico, USA. February 19-24, 2013.
5. 村上昌平、本橋ほづみ、山本雅之。造血幹細胞・前駆細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割の解明。日本生化学会東北支部第 79 会例会(宮城県仙台市) 2013 年 5 月 11 日(ポスター発表)
6. Rie Fujita, Hiroyuki Aburatani, Emery H Bresnick, Masayuki Yamamoto, Hozumi Motohashi. NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. 42nd Annual Scientific Meeting of ISEH. The Imperial Riding School Renaissance Hotel, Vienna, Austria. August 22-25, 2013.
7. Hozumi Motohashi, Keiichi Shirasaki, Yoichiro Mitsuishi, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto. Contribution of Nrf2 pathway to metabolic reprogramming during cell proliferation. 第 86 回日本生化学会大会。パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2013 年 9 月 13 日 シンポジウム International Session 3IS01p-1
8. Hozumi Motohashi, Keiichi Shirasaki, Yoichiro Mitsuishi, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto. Contribution of Keap1-Nrf2 pathway to metabolic reprogramming and cell proliferation. France-Japan Cancer, International Scientific Coordination Network, Toulouse, France, November 22, 2013.
9. 本橋ほづみ、白崎圭一、光石陽一郎、田口恵子、山本雅之。細胞増殖における Keap1-Nrf2 酸化ストレス応答機構の役割。

第36回日本分子生物学会年会。神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2013年12月5日 ワーショップ3AW13-3
10. Shohei Murakami, Masayuki Yamamoto, Hozumi Motohashi. Functional analysis of Keap1-Nrf2 system in hematopoietic stem cells. The Environmental Response IV. Tohoku University Sakura Hall, Sendai. February 28-March 2, 2014.
11. Jun Takai, Makiko Hayashi, Hozumi Motohashi, Takashi Moriguchi, Masayuki Yamamoto. Real-time in vivo monitoring of inflammatory status exploiting human interleukin-6 BAC luciferase transgenic mice. The Environmental Response IV. Tohoku University Sakura Hall, Sendai. February 28-March 2, 2014.
12. 村上昌平、山本雅之、本橋ほづみ。Keap1-Nrf2 制御系の造血幹細胞における役割の解明。日本生化学会東北支部例会(秋田県秋田市) 2014.5.10。口頭発表
13. 林真貴子、高井淳、于磊、本橋ほづみ、森口尚、山本雅之、ヒト IL-6 遺伝子 BAC(大腸菌人工染色体)レポーターマウスを用いた in vivo イメージングによる炎症状態モニタリングシステムの開発とその利用、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館、(京都府京都市) 2014.10.15-18 (ポスター/口頭発表)
14. Hozumi Motohashi. Cross-regulation of redox homeostasis and anabolic metabolism by the Keap1-Nrf2 pathway. The 33rd NAITO Conference on "Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases.", Chateraise Gateaux Kingdom SAPPORO, Sapporo, June 26-29, 2012.
15. 本橋ほづみ。巨核球におけるレドックス制御と血小板機能 第24回日本生体防御学会学術総会 くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市) 2013年7月12日
16. Hozumi Motohashi. Crosstalk between redox regulation and cell proliferation. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics. Kanazawa Excel Tokyu Hotel, Kanazawa, Ishikawa. January 23-24, 2014.
17. Hozumi Motohashi. Future of the Keap1-Nrf2 pathway. The Environmental Response IV. Tohoku University Sakura Hall, Sendai, Miyagi. February 28-March 2, 2014.
18. Hozumi Motohashi. Transcriptional regulation driving megakaryocyte maturation and platelet production. IAS Research Conference 2014 and IAS Lecture 2014 "Chromatin Decoding". International Institute for Advanced Studies, Kyoto, Kyoto. May 12-15, 2014.
19. 本橋ほづみ。Contribution of a transcription factor NF-E2 to megakaryocyte differentiation and platelet production. 第36

回日本血栓止血学会 SPC シンポジウム 2014 大阪国際交流センター。(大阪府大阪市) 2014年5月29日
20. 本橋ほづみ。新たな治療標的としての Nrf2 によるストレス応答と代謝制御 第19回日本がん分子標的治療学会 シンポジウム 仙台市情報・産業プラザ。(宮城県仙台市) 2014年6月26日
21. 本橋ほづみ。Keap1-Nrf2 制御系によるストレス応答と細胞増殖制御 第157回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会シンポジウム「細胞保護機構の多面性」北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市) 2014年9月10日
22. 本橋ほづみ。Keap1-Nrf2 system for redox regulation and metabolic reprogramming in cancers. 第73回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム"Cancer cell metabolism and cellular senescence" パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年9月27日
23. Hozumi Motohashi。Functional nexus between Keap1-Nrf2 system and cellular metabolism. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer: Signaling Network in Tumor Microenvironment. EPOCHAL TSUKUBA, Tsukuba, Ibaragi. January 13, 2015.
24. 本橋ほづみ。Megakaryocyte differentiation and platelet production regulated by CNC transcription factor family. 第87回日本生化学会大会 シンポジウム 国立京都国際会館(京都府京都市) 2014年10月15日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本橋ほづみ(Hozumi Motohashi)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 00282351

(2)研究分担者

()
研究者番号:

(3)連携研究者

()
研究者番号: