

令和元年5月28日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08166

研究課題名(和文) 赤血球系細胞分化における転写制御因子ZFATの機能解析

研究課題名(英文) Elucidation of Zfat function in fetal erythropoiesis using a conditional knockout mouse

研究代表者

土井 佳子(DOI, Keiko)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10341538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子として同定したZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region)の赤血球分化における機能的役割の解明を目指して、コンディショナルZFAT欠失マウスを対象に胎児発生期における赤血球分化を中心にZFATの機能解析を進めた。ZFAT欠失マウスでは胎生12.5日の胎児肝臓において赤血球系細胞の細胞数の減少および赤血球の各分化段階での細胞数の減少等が示された。また、発現アレイ解析およびChIP-seq解析からZFAT転写制御標的遺伝子を同定し、ZFATの赤血球分化における機能的役割とその分子機序の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でのマウス個体におけるZFATの機能的役割を解明するアプローチは、ZFATの重要な機能制御ネットワークを明らかにすることが予想され、また生命維持機構における重要な転写制御ネットワークにおいて新たな知見を付加することが期待される。また、コンディショナルZFAT欠損マウスの表現型解析からは、胎児発生期の血球系分化におけるZFATの機能的役割が解明できることが予想され、免疫系の制御機構の破綻に起因する自己免疫疾患を含む免疫関連疾患とZFATの機能的役割との関連性から病因・病態の解明、さらには創薬ターゲットの探索による先駆的な治療法の開発への応用へ繋げることが期待される。

研究成果の概要(英文)：ZFAT, originally identified as a candidate susceptibility gene for autoimmune thyroid disease, has been reported to be involved in primitive hematopoiesis and T cell development. However, whether or not Zfat is involved in definitive erythropoiesis in the fetal liver during mammalian development remains unknown. Here, we analyzed the role of Zfat during mouse fetal erythropoiesis in the fetal liver using tamoxifen-inducible CreERT2 Zfat-deficient mice. Zfat-deficient mice exhibit moderate anemia with small and pale fetal liver through a decreased number of erythroblasts by E12.5. The apoptosis sensitivity in fetal liver erythroid progenitors was enhanced by Zfat-deficiency ex vivo. Moreover, Zfat knockdown partially inhibited the CD71^{-/low}Ter119⁻ to CD71^{high}Ter119⁻ transition of fetal liver erythroid progenitors with the impairment in the elevation of CD71 expression. These results thus demonstrate that Zfat plays a critical role for erythropoiesis in the fetal liver.

研究分野：細胞生物学

キーワード：赤血球 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写制御分子 ZFAT 遺伝子は魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子であり、これまでに、ZFAT 欠損マウスの解析から、ZFAT が胎児の初期発生、血島における血球分化に必須の分子であることを明らかにした。さらにコンディショナル ZFAT 欠損マウスの解析から、胸腺内 T 細胞分化において、ポジティブセレクションに必須であること、末梢 T 細胞においては、T 細胞の恒常性に必須の役割を担うことを報告してきた。また、国内外の報告では ZFAT 遺伝子多型が、多発性硬化症治療におけるインターフェロン β の応答性、高血圧症および日本人・韓国人の背丈に関連することに加え、ZFAT がヒト胎盤におけるインプリンティング遺伝子として同定され、ZFAT の重要性が示唆されていた。

研究開始当初、マウス胎児肝臓の造血が盛んな時期(胎生 12.5~13.5 日)において ZFAT が強発現していることが明らかとなり、当研究室で新規に樹立したタモキシフェン誘導による時期特異的コンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} mice)を用いた解析から、胎生 6.5 日にタモキシフェン投与後、胎生 12.5 日~13.5 日での胎児では、貧血所見が見られ、肝臓において細胞数の顕著な減少が示されていたが、その詳細なメカニズム解明には至っていなかった。そこで、これまでに得られた研究結果をもとにし、胎児肝臓において細胞数の顕著な減少が示された時期特異的コンディショナル ZFAT 欠損マウスを用いて、胎児発生期の肝臓での赤血球分化に関する詳細な表現型解析、ZFAT 転写制御ターゲット遺伝子の同定等を行い、マウス発生期の赤血球分化における ZFAT の機能的役割の解明とその機能発現のための分子機序の解明を試みた。

2. 研究の目的

自己免疫性甲状腺疾患(AITD)感受性遺伝子として同定した ZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region / zinc-finger with AT-hook)は転写制御因子として、これまでに T 細胞等における重要な役割を報告してきた。最近の研究から、新たにマウス胎児発生期の赤血球分化に重要な機能を有することが示唆された。ZFAT の転写制御メカニズムを解明することは、関連疾患の病因・病態の解明へと繋がり、さらに転写制御をコントロールすることが可能となれば先駆的な治療法の開発へと発展させることができると考えられる。このような将来的な目標を目指して、本研究では赤血球分化に焦点をあてた ZFAT の生物学的機能ネットワークの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1)ZFAT ノックインマウスによる ZFAT 発現解析

ZFAT のプロモーターに連動して ZsGreen が発現するように挿入したノックインマウス(Zfat^{ZsG/w} mice)を樹立し、ZFAT の発現量をフローサイトメトリー解析により ZsGreen の発現を測定することで検討した(Tsunoda T et al, *Int J Mol Med.*, 2018)。

(2) コンディショナル ZFAT 欠損マウスの樹立および表現型解析

ZFAT の exon 8 の両端に loxP 配列を挿入した Zfat^{lox/lox} マウス(Zfat^{fl/fl} mice)を樹立し、CreERT2 マウスと交配することで、タモキシフェン誘導による時期特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} mice)を樹立した。Zfat^{fl/w} mice (female)と CreERT2-Zfat^{fl/fl} mice (male)を交配させ、プラグを確認後、胎生 6.5 日(E6.5)に Zfat^{fl/w} mice (母体)の腹腔にタモキシフェン投与し、E12.5 の胎児 CreERT2-Zfat^{fl/w} embryo (control) および CreERT2-Zfat^{fl/fl} embryo の表現型を解析した。胎児肝臓のフローサイトメトリー解析により、赤血球分化段階の細胞数等について検討した。

(3) ex vivo 培養系における赤芽球系前駆細胞の ZFAT 機能解析

E12.5 の ZFAT 遺伝子改変マウス(Zfat^{fl/fl} マウス)およびコントロールマウス(Zfat^{fl/w} マウス)の胎児肝臓の細胞を抗 TER119 抗体および抗 CD71 抗体にて染色後、セルソーターにより、赤芽球系前駆細胞(c-Kit⁺-R1 領域細胞)をソーティングした。Cre ウィルスを用いて ZFAT 発現抑制後、EPO 等の添加により分化させ、ZFAT 発現抑制による赤血球分化への影響を検討した。また、E12.5 のコンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} マウス)およびコントロールマウス(CreERT2-Zfat^{fl/w} マウス)の胎児肝臓より、c-Kit⁺-R1 領域細胞をソーティングし、4OHT の細胞毒性を加味して、4OHT の濃度勾配による ZFAT 発現抑制後、アポトーシス細胞の割合を測定した。

(4) 発現アレイ解析および ChIP-seq(クロマチン免疫沈降シークエンス)解析

胎生 6.5 日(E6.5)にタモキシフェン投与された CreERT2-Zfat^{fl/w} embryo および CreERT2-Zfat^{fl/fl} embryo の肝臓から RNA を抽出し、ラベル化後、Affymetrix 社製 GeneChip Array にハイブリダイズした。変動遺伝子群の取得等のデータ解析は GeneSpring にて行った。

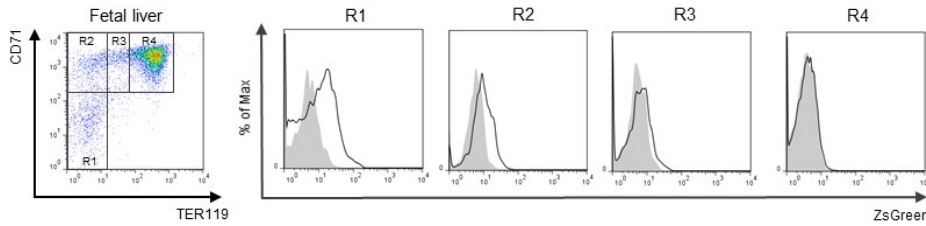
E12.5 の C57BL/6 embryo の肝臓を対象に、樹立した ZFAT モノクローナル抗体とコントロール IgG を用いてクロマチン免疫沈降し、ChIP DNA を精製後、シークエンスを行い、Avadis NGS

にて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス胎児発生期の赤血球細胞分化における ZFAT の発現検討

ZFAT の発現を検討するために、ZFAT のプロモーターに連動して ZsGreen が発現するように挿入したノックインマウス (*Zfat*^{ZsG/w} mice) を対象に、マウス胎児肝臓の赤血球細胞の各分化段階における ZFAT の発現量をフローサイトメトリー解析により ZsGreen の発現を測定することで検討した。E12.5 の *Zfat*^{ZsG/w} マウスの胎児肝臓における赤芽球系前駆細胞(R1)、前赤芽球(R1, R2)、好塩基性赤芽球(R3)での ZsGreen の発現が示され、胎児肝臓の赤血球細胞の初期の分化段階において ZFAT が発現することが明らかとなった (図 1)。CD71 の発現量が上昇する前後の分化段階では細胞増殖が盛んであることから、ZFAT が細胞増殖にも関連した赤血球分化に関与することが示唆された。(Tsunoda T et al, *Int J Mol Med.*, 2018)



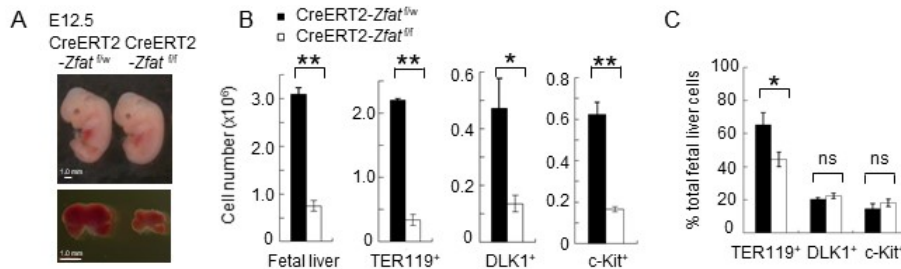
【図 1】 *Zfat*^{ZsG/w} マウス胎児肝臓における ZFAT の発現解析

フローサイトメトリー解析により、TER119 および CD71 で分離後、ZsGreen を検出し、赤血球分化過程における ZFAT の発現を検討した。赤芽球系前駆細胞(R1)、前赤芽球(R1, R2)、好塩基性赤芽球(R3)において、ZsGreen 発現細胞が存在することが示された。Gray-filled: *Zfat*^{w/w} (control), Line: *Zfat*^{ZsG/w}

(2) マウス胎児発生期の赤血球細胞分化における ZFAT の機能解析

① タモキシフェン誘導による時期特異的コンディショナル ZFAT 欠損マウス (*CreERT2-Zfat*^{fl/fl} mice) を用いた表現型解析

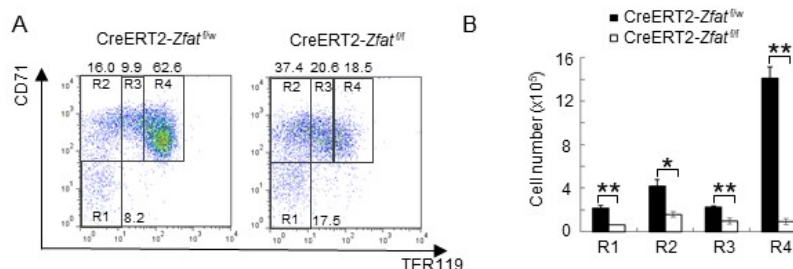
胎生 6.5 日 (E6.5) にタモキシフェン投与後、E12.5 のコンディショナル ZFAT 欠損マウス (*CreERT2-Zfat*^{fl/fl} マウス) における肝臓の細胞数の減少が示された。フローサイトメトリー解析により、造血が盛んな時期となる E12.5 の胎児肝臓における赤血球系細胞 (TER119⁺)、造血系前駆細胞 (c-Kit⁺) および肝芽細胞 (DLK1⁺) の細胞数について検討した結果、いずれの細胞も減少しており、赤血球系細胞 (TER119⁺) が著しく減少した。胎児肝臓の細胞におけるそれぞれの割合では c-Kit⁺ 細胞および DLK1⁺ 細胞に変化はなく、TER119⁺ 細胞では 1.48 倍の減少を示した (図 2)。



【図 2】 コンディショナル ZFAT 欠損マウス (*CreERT2-Zfat*^{fl/fl} マウス) 胎児肝臓における ZFAT 発現抑制による各細胞数等への影響

(A) 胎生 6.5 日 (E6.5) にタモキシフェン投与後、E12.5 のコンディショナル ZFAT 欠損マウス (*CreERT2-Zfat*^{fl/fl} マウス) およびコントロールマウスの胎児と肝臓 (B) 胎児肝臓における各細胞数 (C) 胎児肝臓における各細胞数の割合

さらに、TER119 および CD71 表面抗原の抗体を用いたフローサイトメトリー解析により、赤血球の各分化段階における *CreERT2-Zfat*^{fl/fl} マウスの細胞数を検討した結果、TER119 および CD71 の発現量の低下をとまう、赤芽球系前駆細胞(R1)、前赤芽球(R1, R2)、好塩基性赤芽球(R3)、多染性赤芽球(R4)、正染性赤芽球(R4) および網状赤血球(R4) の細胞数の減少が示され、R2 と R3 領域での割合が増大することで、R3 以降の分化抑制が明らかとなった (図 3)。



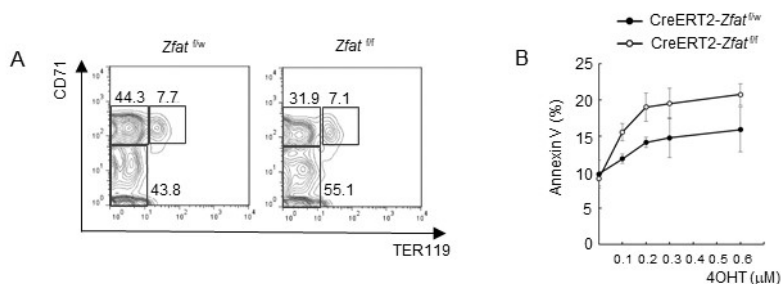
【図3】 コンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} マウス)胎児肝臓における ZFAT 発現抑制による赤血球分化過程への影響を検討

(A) 胎生 6.5 日(E6.5)にタモキシフェン投与後、E12.5 のコンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} マウス)およびコントロールマウス(CreERT2-Zfat^{fl/wt} マウス)の胎児肝臓を抗 TER119 抗体および抗 CD71 抗体による染色後のフローサイトメトリー解析 (B) A の解析における R1~R4 領域の赤血球分化段階での各細胞数

② ex vivo 培養系における赤芽球系前駆細胞の ZFAT 機能解析

また、コンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} マウス)胎児肝臓において赤血球分化抑制が細胞内因性によるものかを検討するために ex vivo 培養系を試みた。E12.5 のマウス胎児肝臓から赤芽球系前駆細胞を分離後、4-Hydroxytamoxifen (4OHT) および Cre ウィルスを用いて、分化培養系での ZFAT 発現抑制の影響を検討した結果、ZFAT 発現抑制により c-Kit⁺-R1 領域細胞からの P2 領域への分化抑制傾向が明らかとなり、c-Kit⁺-R1 領域細胞ではアポトーシス感受性の増大が示された。ZFAT が c-Kit⁺-P1 領域細胞が P2 領域へ分化するまでのアポトーシス感受性に関与していることが示唆された。

ZFAT はマウス発生 E12.5 の時期での胎児肝臓において赤血球造血に必須の役割を果たしていることが明らかとなった (図 4)。



【図4】マウス胎児肝臓由来の赤芽球系前駆細胞の ex vivo 培養系における ZFAT 発現抑制による赤血球各分化への影響を検討

(A) E12.5 の ZFAT 遺伝子改変マウス(Zfat^{fl/fl} マウス)およびコントロールマウス(Zfat^{fl/wt} マウス)の胎児肝臓より c-Kit⁺-R1 領域細胞をソーティングし、Cre ウィルスを用いて ZFAT 発現抑制後、EPO 等の添加により分化させた。(B) E12.5 のコンディショナル ZFAT 欠損マウス(CreERT2-Zfat^{fl/fl} マウス)およびコントロールマウス(CreERT2-Zfat^{fl/wt} マウス)の胎児肝臓より c-Kit⁺-R1 領域細胞をソーティングし、各濃度の 4OHT を用いて ZFAT 発現抑制後、アポトーシス細胞の割合を測定した。

(3) 発現アレイ解析および ChIP-seq(クロマチン免疫沈降シークエンス)解析

CreERT2-Zfat^{fl/fl} embryo および CreERT2-Zfat^{fl/wt} embryo (コントロール)の肝臓において ZFAT 発現抑制時の網羅的発現プロファイル取得のため、発現アレイ解析を行った。1.25 倍の発現上昇した遺伝子が 30 genes、発現低下した遺伝子が 84 genes 得られ、Gene ontology 解析では、免疫および細胞小器官に関連する遺伝子群が示された。さらに、ZFAT の機能発現における分子メカニズムを明らかにするために、ChIP-seq 解析を試みた。樹立した抗 ZFAT 抗体を用いて、ChIP (chromatin immunoprecipitation: クロマチン免疫沈降)法の実験条件を最適化し、E12.5 の C57BL/6 embryo の肝臓において ChIP-seq 解析を行い、ZFAT のゲノム結合候補領域を同定した。同定した ZFAT のゲノム結合領域のうち FDR (False Discovery Rate) と Fold enrichment により抽出した 37 genes には免疫関連遺伝子およびエピジェネティック関連遺伝子が含まれていた。発現アレイ解析からの発現変動遺伝子群との重複する遺伝子から 9 genes の ZFAT 転写制御遺伝子を同定し、詳細な分子メカニズムの解析を進めている。

今後、同定した ZFAT 転写制御遺伝子と ZFAT 発現抑制時の表現型解析結果および発現変動遺伝子群とを統合したデータ解析等により、ZFAT が担う分子制御機構のさらに詳細な解明へと繋げていくことが必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Zfat expression in ZsGreen reporter gene knock-in mice: Implications for a novel function of Zfat in definitive erythropoiesis.

*Tsunoda T, *Doi K, Ishikura S, Luo H, Nishi K, Matsuzaki H, Koyanagi M, Tanaka Y, Okamura T, Shirasawa S. - *Int J Mol Med*. (2018 Nov;42(5):2595-2603.) *Contributed equally
DOI: 10.3892/ijmm.2018.3806.

② Molecular mechanisms of transcriptional regulation by the nuclear zinc-finger protein Zfat in T

cells.

Ishikura S, Tsunoda T, Nakabayashi K, Doi K, Koyanagi M, Hayashi K, Kawai T, Tanaka Y, Iwaihara Y, Luo H, Nishi K, Okamura T, Shirasawa S. - *Biochim Biophys Acta*, (2016, 1859(11):1398-1410.)

DOI: 10.1016/j.bbagr.2016.08.010.

- ③ Marked reduction in FoxO1 protein by its enhanced proteasomal degradation in Zfat-deficient peripheral T-Cells.

Iwaihara Y, Ishikura S, Doi K, Tsunoda T, Fujimoto T, Okamura T, Shirasawa S. - *Anticancer Res.* (2015, 35: 4419-23)

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/8/4419.long>

- ④ Zfat-deficient CD4⁺ CD8⁺ double-positive thymocytes are susceptible to apoptosis with deregulated activation of p38 and JNK.

Ishikura S, Ogawa M, Doi K, Matsuzaki H, Iwaihara Y, Tanaka Y, Tsunoda T, Hideshima H, Okamura T, Shirasawa S. - *J Cell Biochem* (2015, 116: 149-157.)

DOI: 10.1002/jcb.24954.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 土井佳子、石倉周平、角田俊之、小柳緑、田中陽子、中林一彦、白澤専二

末梢 T 細胞の TCR 刺激時における転写制御分子 Zfat の機能メカニズムの解明

日本人類遺伝学会第 63 回大会 2018 年

- ② 土井佳子、角田俊之、小柳緑、石倉周平、田中陽子、白澤専二

T細胞における転写制御分子Zfatの機能発現機構の解明

第22回バイオ治療法研究会学術集会 2018年

- ③ 土井佳子、角田俊之、小柳緑、石倉周平、田中陽子、白澤専二

T細胞における転写制御分子ZFATの分子機構の解明

日本人類遺伝学会第62回大会 2017年

- ④ Keiko Doi, Toshiyuki Tsunoda, Midori Koyanagi, Shuhei Ishikura, Yoko Tanaka, Kazuhiko

Nakabayashi, Senji Shirasawa

Identification of the genes regulated by ZFAT in T cells through ChIP-seq analysis

第13回国際人類遺伝学会 2016年

- ⑤ 土井佳子、角田俊之、小柳緑、石倉周平、田中陽子、中林一彦、白澤専二

ChIP-seq解析によるT細胞におけるZFATの転写制御標的分子の同定

人類遺伝学会第60回大会 2015年

- ⑥ 土井佳子、角田俊之、小柳緑、石倉周平、田中陽子、白澤専二

T細胞における免疫系転写制御分子Zfatの転写制御標的分子の同定

第19回バイオ治療法研究会学術集会 2015年

[図書]

該当なし

[産業財産権]

○出願状況

該当なし

○取得状況

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：白澤専二

ローマ字氏名：Senji Shirasawa

研究協力者氏名：角田俊之

ローマ字氏名：Toshiyuki Tsunoda

研究協力者氏名：小柳緑

ローマ字氏名：Midori Koyanagi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。