

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24年4月2日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390074

研究課題名（和文）

造血細胞の分化・成熟プログラムにおける生体内環境応答機構の役割

研究課題名（英文）

Role of stress response for differentiation and maturation of hematopoietic cells

研究代表者

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00282351

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体における代謝ストレス、酸化ストレスなどが造血細胞の増殖分化に及ぼす影響を、CNC-Maf 2 量体転写因子の機能から明らかにすることを目的とした。血小板形成の鍵因子である NF-E2 p45 は、酸化ストレス応答の鍵因子である Nrf2 の機能に拮抗することで、巨核球の終末分化を促進することを明らかにした。また、巨核球において NF-E2 p45 は血小板活性化に重要な因子群を直接活性化していることを見だし、担癌状態の巨核球では、p45 とその標的遺伝子である血小板関連遺伝子群の発現上昇がおこることがわかった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed at clarifying how metabolic and oxidative stresses influence the proliferation and differentiation of hematopoietic cells from the viewpoint of CNC-Maf transcription factors. I found that NF-E2 p45 antagonize with Nrf2 and promotes the terminal differentiation of megakaryocytes resulting in the increase of intracellular reactive oxygen species. I also found that NF-E2 p45 directly activates the genes encoding the factors involved in the platelet function. In tumor-bearing mice, expression of NF-E2 p45 and its target genes was robustly increased.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 平成21年度 | 6,100,000 | 1,830,000 | 7,930,000 |
| 平成22年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 平成23年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：医学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：転写因子、巨核球、血小板、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

小 Maf 群因子は、癌遺伝子 v-Maf の関連因子で、塩基性領域・ロイシンジッパー(bZip)構造を有し、それ自身でホモ 2 量体として、あるいは、p45 や Nrf2 などの CNC 群因子とのヘテロ 2 量体として、Maf 群因子認識配列 (Maf recognition element; MARE) に結合する。

これまでに我々が作成した遺伝子改変マウスの解析より、Nrf2-小 Maf 2 量体は異物代謝・酸化ストレス応答に、p45-小 Maf 2 量体は血小板形成に重要であることが明らかになった(Motohashi et al, 1998; Motohashi et al, 2000, Motohashi et al, 2004)。

p45 と Nrf2 は結合配列を共有するにもかか

わらず、生体におけるそれぞれの機能は大きく異なる。p45 は巨核球の終末分化に重要である一方、Nrf2 は分化初期の巨核球の増殖を促進することが観察されていた。巨核球では、MARE 配列に作用する転写活性化因子の違いが、細胞の増殖相と成熟相との変換もたらすと考えられた。また、我々による巨核球の解析では、Nrf2-小 Maf が、細胞内の ROS を低下させ、かつ、細胞増殖を促進することが示唆されている。近年、Nrf2 の機能亢進が肺癌と関連することが報告され、肺癌細胞の解析でも、Nrf2 依存的な ROS の低下と細胞増殖の促進が報告された。しかしながら、ROS の低下と細胞増殖促進との関係については、未だ明らかではない。また、巨核球の成熟をもたらす p45 の直接の標的遺伝子についても十分な解析はなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生体における代謝ストレス、酸化ストレスなどが造血細胞の増殖分化に及ぼす影響を、CNC-Maf 2 量体転写因子の機能から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 巨核球初代培養を用いた NF-E2 p45 の ChIP-seq 解析

胎生 13.5 日の胎児肝臓より巨核球を培養し、3 日目に ChIP-seq 解析用にサンプルを調製した。次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドな NF-E2 p45 の結合部位を決定し、典型的な Nrf2 の標的遺伝子との比較を行った。

(2) 野生型巨核球と NF-E2 p45 欠損マウス由来の巨核球を用いたトランスクリプトーム解析

胎生 13.5 日の胎児肝臓より巨核球を培養し、3 日目にマイクロアレイ用の RNA を調製した。マイクロアレイ解析により、両者の遺伝子プロファイルを比較した。

(3) NF-E2 p45 変異分子 p45 Δ NTR 発現マウスの作成とその巨核球の解析

NF-E2 p45 のアミノ末端領域を欠失した p45 Δ NTR を巨核球特異的に発現するトランスジェニックマウス、G1HRD-p45 Δ NTR マウスを作成し、NF-E2 p45 欠損マウスと交配して、NF-E2 p45 Δ ::G1HRD-p45 Δ NTR 複合変異マウスを作成した。同マウスの血小板数、巨核球における遺伝子発現、巨核球分化、血小板の活性化能などについて解析を行った。

(4) 担癌マウスにおける巨核球造血の解析

担癌状態では消費性の血小板減少が観察され、2 次的な巨核球造血の亢進が観察される。このような状態における巨核球の分化、

成熟、血小板機能、NF-E2 p45 の発現とその標的遺伝子の発現について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 巨核球において、NF-E2 p45 は、典型的な Nrf2 の標的遺伝子に結合していることがわかった。また、Nrf2 の標的遺伝子としては同定されていない遺伝子群にも結合していることがわかった。とりわけ、血小板の機能に関連する遺伝子群に多く結合が認められた。

(2) NF-E2 p45 欠損巨核球においては、Nrf2 の標的遺伝子の発現が上昇傾向にあることが観察された。p45 が Nrf2 の機能に拮抗しているというこれまでの観察と一致する結果である。また、血小板機能に関連する遺伝子群は、NF-E2 p45 欠損巨核球において有意に減少しており、ChIP-seq 解析の結果とあわせて解釈すると、NF-E2 p45 は、血小板機能に関連する遺伝子群を直接活性化しているといえる。

(3) NF-E2 p45 Δ ::G1HRD-p45 Δ NTR 複合変異マウスにおいては、ほぼ正常な巨核球分化がおこっていることが確認された。しかし、胞体突起形成が障害されており、血小板の軽度減少が認められた。さらに、血小板の機能を解析したところ、トロンビンに対する反応性が低下していることがわかった。このような巨核球における遺伝子発現を調べたところ、NF-E2 p45 の直接の標的遺伝子として同定された血小板機能関連遺伝子群の発現が低下していることがわかった。このことから、巨核球における NF-E2 p45 の活性は、血小板数のみならず、その機能も規定していることが *in vivo* の実験系で確認された。

(4) 担癌マウスでは、がん移植後 2 週間あたりから、血小板が減少し、肺の血管には微小血栓が多数認められた。このことより、担癌マウスにおいては、血小板の活性化が亢進状態にあることが示唆された。この状態においては脾臓における巨核球造血が亢進しており、巨脾と成熟巨核球の増加が観察された。脾臓から得られる巨核球では、NF-E2 p45 のタンパク質量が著増し、それに伴い、その標的遺伝子の発現も一様に増加していた。さらに、NF-E2 p45 の遺伝子発現自体も増加しており、その上流因子である Gata1 の発現も上昇していたことから、担癌ストレスにより巨核球が応答して、Gata1-NF-E2 p45 制御系が活性化されていることが明らかになった。

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 16 件)

原著論文

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)
2. Yamsazaki H, Katsuoka F, **Motohashi H**, Engel JD and Yamamoto M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking all three small maf proteins. **Mol Cell Biol** 32, 808-816, 2012.
3. Inoue D, Kubo H, Taguchi K, Suzuki T, Komatsu M, **Motohashi H***, and Yamamoto M*. Inducible disruption of autophagy in the lung causes airway hyper-responsiveness. **Biochem Biophys Res Commun** 405, 13-18, 2011 (* corresponding authors)
4. **Motohashi H***, Fujita R, Takayama M, Inoue A, Katsuoka F, Bresnick EH and Yamamoto M. Molecular determinants for small Maf protein control of platelet production. **Mol Cell Biol** 31, 151-162, 2011. (*corresponding author)
5. Fujii S, Sawa T, Ihara H, Tong KI, Ida T, Okamoto T, Ahtesham AK, Ishima Y, **Motohashi H**, Yamamoto M and Akaike T. The critical role of nitric oxide signalling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. **J Biol Chem** 285, 23970-23984, 2010.
6. Taguchi K, Maher JM, Suzuki T, Kawatani Y, **Motohashi H**, and Yamamoto M. Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1. **Mol Cell Biol** 30, 3016-3026, 2010.
7. Takayama M, Fujita R, Suzuki M, Okuyama R, Aiba S, **Motohashi H***, and Yamamoto M. Genetic analysis of hierarchical regulation for Gata1 and NF-E2 p45 gene expression in megakaryopoiesis. **Mol Cell Biol** 30, 2668-2680, 2010. (* co-corresponding author)
8. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou Y.-S., Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S.-i., Natsume T, Ueno T, Kominami E, **Motohashi H**, Tanaka K and Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress response transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nat Cell Biol** 12, 213-223, 2010.
9. **Motohashi H***, Kimura M, Fujita R, Inoue A, Pan X, Takayama M, Katsuoka F, Aburatani H, Bresnick EH and Yamamoto M. NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation. **Blood** 115, 677-686, 2010. (* corresponding author)
10. Kurokawa H, **Motohashi H**, Sueno S, Kimura M, Takagawa H, Kanno Y, Yamamoto M, and Tanaka T. Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors. **Mol Cell Biol** 29, 6232-6244, 2009.

総説論文

1. Uruno A and **Motohashi H**. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. **Nitric Oxide** 25, 153-160, 2011.
2. Taguchi K, **Motohashi H** and Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes Cells** 16, 123-140, 2011.
3. **Motohashi H** and Igarashi K. MafB as a type I interferon rheostat. **Nature Immunol** 11, 695-696, 2010.
4. 村上昌平、**本橋ほづみ**. 酸化ストレスシグナルと Keap1-Nrf2 システムの役割.細胞工学分学 31, 144-149, 2012.
5. 井上大輔、**本橋ほづみ**、山本雅之. 酸化ストレスと呼吸器疾患. 分子呼吸病 14 (1), 6-7, 2010.
6. **本橋ほづみ**. 巨核球分化過程におけるストレス応答とその調節機構. 生化学 81 (6), 511-519, 2009.

〔学会発表〕 (計 37 件)

招待講演

1. **Hozumi Motohashi**, MafG C-terminal region contains a nuclear matrix targeting signal and confers competence for transcriptional

regulation in megakaryocytes. The 27th RBC-NIRS International symposium "Chromatin dynamics and epigenetic memory in DNA damage response", Co-op Inn Kyoto, Kyoto, December 9-10, 2011

2. **本橋ほづみ**, がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 第12回 WAKO つくばフォーラム 転写と代謝のクロストーク: 病態バイオロジーの新展開 筑波和光ホール つくば 2011年11月29日

3. **本橋ほづみ**, 環境応答の分子機構とその破綻による炎症性病態形成 日本耳科学会聴覚生理研究会特別講演 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市 2011年11月26日

4. **本橋ほづみ**, 細胞増殖における酸化ストレス応答機構の役割 千里ライフサイエンスセミナー「ストレス応答の分子メカニズム」 千里ライフサイエンスセンタービル 大阪 2011年11月14日

5. **本橋ほづみ**, 増殖細胞におけるストレス応答と代謝制御のクロストーク 「転写代謝システム」キックオフミーティング 大手町サンケイプラザ 東京 2011年10月19日

6. **Hozumi Motohashi**, Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 第11回日本NO学会学術集会 シンポジウム 昭和薬科大学、町田、2011年5月13-14日

7. **Hozumi Motohashi**, Electrophiles as potential anti-platelet reagents through modulation of gene expression in megakaryocytes. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Kyoto International Conference Center (ICC Kyoto). June 14 (Mon.) – 18 (Fri.), 2010.

8. **Hozumi Motohashi**, Stress response mechanisms by Keap1-Nrf2 regulatory system. Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Fontenay-aux-Roses, France, February 9, 2010.

9. **Hozumi Motohashi**, Modulation of megakaryocytic gene expression by electrophiles as a potential anti-platelet therapy. INSERM, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, February 8, 2010.

10. **Hozumi Motohashi**, Modulation of

megakaryocytic gene expression by electrophiles as a potential anti-platelet therapy. NAPA 2009. Jeju, Korea, Dec. 12-15, 2009.

11. **本橋ほづみ**, 巨核球分化と酸化ストレス応答 東京大学先端科学技術研究センター・エピゲノミクスセミナー 東京、2009年11月20日

ワークショップ、シンポジウム

12. **Hozumi Motohashi**, Rie Fujita, Hironori Satoh, Hiroyuki Aburatani, Masayuki Yamamoto. Stress response of megakaryocytes alters inherent reactivity of platelets. BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日 (シンポジウム 4S4-5)

13. **本橋ほづみ**, 藤田理恵、鈴木隆史、Kit T. Tong、黒河博文、山本雅之. 生体における Keap1/Nrf2 制御系の機能貢献と応答機構. 第62回日本酸化ストレス学会学術集会. 九州大学百年講堂. 2009年6月11-12日

一般演題

14. Nanako Fujikawa, Keiko Taguchi, **Hozumi Motohashi** and Masayuki Yamamoto. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine. Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece. October 6-8, 2011.

15. Yoichiro Mitsuiishi, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto, and **Hozumi Motohashi**. Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine. Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece. October 6-8, 2011. (oral presentation)

16. 藤田理恵、辻本昌理子、油谷浩幸、**本橋ほづみ**、山本雅之 転写因子 NF-E2 p45 による血小板機能制御メカニズムの解明 第84回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011年9月21-24日 (一般講演 2T14p-6、ポスター 2P-0461)

17. 光石陽一郎、田口恵子、油谷浩幸、貫和敏博、**本橋ほづみ**、山本雅之 転写因子 Nrf2 はペントースリン酸経路とグルタミン代謝を制御して細胞増殖に貢献する 第84回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011年9月21-24日 (一般講演 2T16p-12、ポスター 2P-0542)

18. Rie Fujita, Mariko Takayama, **Hozumi Motohashi**, Masayuki Yamamoto. Regulation of platelet function by NF-E2 p45. Gordon Research Conference on Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets. Galveston, Texas. 21-25 March, 2011.
19. Yamamoto M, Kurokawa H, Suzuki T, Taguchi K, and **Motohashi H**. The Nrf2-Keap1 stress response pathway: Molecular basis of adaptive responses and pathogenesis. Anniversary annual meeting & ToxExpo. Washington, DC. March 6-10, 2011.
20. 藤田理恵、高山昌理子、**本橋ほづみ**、山本雅之 Regulation of platelet reactivity by transcription factor NF-E2 p45 in megakaryocytes. BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日 (ポスター2P-0549)
21. 中野星児、佐々木陽丞、**本橋ほづみ**、中山啓子 Geminin は造血幹細胞の維持と巨核球の分化を制御する BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日 (一般講演 3T5-11、ポスター3P-0899)
22. 藤井重元、澤智裕、居原秀、Kit I Tong、井田智章、岡本竜哉、Ahmed Khandaker Ahtesham、**本橋ほづみ**、山本雅之、赤池孝章 ニトロ化環状ヌクレオチドによるタンパク質 S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序 BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日 (一般講演 2T9-9、ポスター2P-0156)
23. Shohei Murakami, **Hozumi Motohashi**, Masayuki Yamamoto. Analysis of the Role of Nrf2-Keap1 System in Hematopoietic Stem Cell. 9th Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium 2010/ 5th International Symposium on GATA factors. Gonryo-Hall, Sendai, November 17-19, 2010
24. Rie Fujita, Mariko Takayama-Tsujimoto, **Hozumi Motohashi**, Masayuki Yamamoto. Functional Roles of NF-E2 p45 in the Regulation of Platelet Activity. 9th Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium 2010/ 5th International Symposium on GATA factors. Gonryo-Hall, Sendai, November 17-19, 2010
25. Fumiki Katsuoka, Hiromi Yamazaki, **Hozumi Motohashi**, James Douglas Engel, Masayuki Yamamoto. Embryonic lethality and fetal liver hypoplasia in mice lacking all three small Maf proteins. 9th Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium 2010/ 5th International Symposium on GATA factors. Gonryo-Hall, Sendai, November 17-19, 2010
26. Mikiko Suzuki, Harumi Y. Mukai, **Hozumi Motohashi**, James Douglas Engel, Masayuki Yamamoto. Hereditary persistence of fetal hemoglobin and the *HBS1L-MYB* locus. 9th Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium 2010/ 5th International Symposium on GATA factors. Gonryo-Hall, Sendai, November 17-19, 2010
27. 光石陽一郎、**本橋ほづみ**、貫和敏博、山本雅之. 転写因子 Nrf2 はヒト肺線癌細胞株 A549 で osteopontin の発現を増加させる. 第69回日本癌学会総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪. 大阪 2010.9.22-24.
28. 藤田理恵、**本橋ほづみ**、油谷浩幸、山本雅之. Identification of the target genes of transcription factor NF-E2 p45 in megakaryocytes. 第32回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 2009. 12.9-12.
29. 沖田結花里、鴨志田敦、鈴木裕之、伊東健、**本橋ほづみ**、五十嵐和彦、山本雅之、加藤光保. TGF-beta suppresses transcription of Heme Oxygenase-1 through induction of MafK and Bach1. 第32回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 2009. 12.9-12.
30. 勝岡史城、中山博未、**本橋ほづみ**、山本雅之. Nrf2 is degraded by Keap1-independent proteasome pathway in the absence of small Maf proteins. 第32回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 2009. 12.9-12.
31. Mariko Takayama, Rie Fujita, **Hozumi Motohashi**, Masayuki Yamamoto. *NF-E2 p45 N-terminal Region Is Essential for Transactivation Mediating Thrombogenesis*. Tohoku University Global COE for Conquest of Signal Transduction Diseases with "Network Medicine", Sendai, December 7-8, 2009
32. Fumiki Katsuoka, **Hozumi Motohashi**, Hiromi Nakayama, Masayuki Yamamoto. *Nrf2 is degraded by Keap1-independent degradation pathway in the absence of small Maf proteins*. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, October 26-27,

2009

33. 中山博未, 勝岡史城, 本橋ほづみ, 山本雅之. マウス胎生期における小 Maf 群因子の機能. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2009. 10.21-24.

34. 高山昌理子, 井上あい, 藤田理恵, 本橋ほづみ, 山本雅之. 血小板形成における転写因子 NF-E2 p45 N 末端領域の重要性. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2009. 10.21-24.

35. Masayuki Yamamoto, Tatsuhiro Shibata, Ohta Tsutomu, Kit Tong, Hirofumi Kurokawa, Takafumi Suzuki, Keiko Taguchi, and Hozumi Motohashi. *Double-edged Sword of the Nrf2-Keap1 Stress Response System; Carcinogenesis and Cancer Chemoprevention*. 第 68 回 日本癌学会学術総会シンポジウム パシフィコ横浜 2009 年 10 月 1 日～3 日

36. Hozumi Motohashi, Mariko Takayama, Rie Fujita, Ai Inoue, Fumiki Katsuoka, and Masayuki Yamamoto. MafG C-terminal region contains a nuclear matrix targeting signal and confers competence for transcriptional regulation. The 24th NAITO Conference on Nuclear Dynamics and RNA[II] . Sapporo, Japan. June 23-26, 2009

37. 本橋ほづみ, 藤田理恵, 鈴木隆史, Kit T. Tong, 黒河博文, 山本雅之. 生体における Keap1/Nrf2 制御系の機能貢献と応答機構. 第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会. 九州大学百年講堂. 2009 年 6 月 11-12 日

[図書] (計 1 件)

1. Morita M and Motohashi H. Survival Strategy and Disease Pathogenesis According to the Nrf2-Small Maf Heterodimer. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates. Wiley-Blackwell. Edited by Farooqui T and Farooqui AA. 2011.

[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

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 00282351

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :