

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17日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591246

研究課題名（和文） C/EBP 転写因子による顆粒球分化と増殖のカップリング調節

研究課題名（英文） Regulation of differentiation and proliferation of granulocytic precursors by C/EBP transcription factor

研究代表者

平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50315933

研究成果の概要（和文）：本研究においてわれわれは、マウス骨髄中の顆粒球造血を c-kit と Ly-6G の発現レベルによって5つの分化段階に区分する新規の方法を考案した。これを用いて *Candida albicans* の感染により、すべての分化段階で転写因子 C/EBP β の発現が亢進することと、C/EBP β は顆粒球前駆細胞の増殖を制御することによって感染時の顆粒球造血亢進に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）： We developed a novel flow cytometric method that successfully dissected mouse bone marrow cells undergoing granulopoiesis and found that C/EBP β is involved in the efficient amplification of early granulocyte precursors by regulating proliferation during candidemia-induced 'emergency' granulopoiesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：顆粒球、転写因子、C/EBP、分化、増殖

1. 研究開始当初の背景

造血細胞の分化および増殖は巧妙に調節されており、定常状態のみならず感染などの「緊急時」にも生体の恒常性を維持するために必要に応じた血球を絶えず産生している。

特に顆粒球は寿命が24-48時間と短いため骨髄での産生調節の意義は大きい。急性感染では顆粒球が増えるのみならず分葉核球に比して桿状核球が増加する「核の左方移動」という現象が知られており、緊急時の細胞の分

化・増殖の調節様式は定常状態とは異なると考えられる。

CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 転写因子ファミリーの一員であるC/EBP α は顆粒球分化を促進するのみならず細胞周期に対する強力な抑制作用を持つため定常状態における顆粒球造血のマスター遺伝子と考えられている (Zhang D. E. et al. PNAS 1996)。申請者らは感染などで多数の顆粒球を産生しなければならないような状況では同じファミリーに属するC/EBP β への依存度が高くなることを明らかにした (Hirai H. et al. Nature Immunology 2006)。しかし、このような転写制御の変化が顆粒球の分化および増殖にどのような意義があるかについては未解明である。

2. 研究の目的

本研究では定常状態のC/EBP α 依存性の顆粒球造血から感染など緊急時のC/EBP β 依存性の顆粒球造血への転写制御の変化がどのような意義を持つかを明らかにする。そのためにマウス骨髄での顆粒球造血の分化と増殖のカップリングについて注目し、その調節におけるC/EBP β 転写因子の機能を明らかにする。

定常状態および感染時の骨髄中の造血幹細胞から成熟顆粒球に至る分化の中間段階の細胞集団がどのような時間経過で推移するかを明らかにする。また各分化段階の細胞集団における細胞周期の解析を行い、顆粒球造血の分化段階と細胞周期のカップリングの変化を検討する。同様の解析をC/EBP β ノックアウトマウスを用いて行うことにより、そのカップリングの変化にC/EBP β がどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄中での顆粒球造血分化段階と増殖・細胞周期の解析

マウス骨髄細胞を蛍光抗体で染色し、造血幹細胞から成熟顆粒球にいたる各分化段階を同定する。造血幹細胞のマーカであるc-kitおよびCD34と顆粒球の分化指標の抗体を組み合わせ、それ以外の系統(赤血球系、B細胞系、T細胞)のマーカをlineage marker (Lin)として用い、フローサイトメトリを用いて解析する。Lin陰性の細胞集団中のc-kitと顆粒球の分化指標Ly-6Gの発現のパターンから顆粒球文化の中間段階に相当する細胞集団を検出する。顆粒球産生が亢進しているときに各分化段階と細胞増殖のステップがどのように対応しているかを検討するために、マウスに*Candida albicans*を尾静脈に投与し、経時的に骨髄中の顆粒球造血の分化段階のモニタリングを行う。各分化段階の細胞数、頻度、細胞周期と顆粒球の分化状態を反映する一次顆粒、二次顆粒、三次顆粒タンパク質の遺伝子の発現レベルなどを検討する。この一連の実験により顆粒球の分化段階と細胞増殖のステップとのカップリングがどのように制御されているかを明らかにすることができる。また各分化段階でのC/EBP β のmRNAおよびタンパク質の発現レベルをそれぞれリアルタイムPCRおよびウェスタンブロッティング法を用いて検討し、本分子がどの分化段階で重要な働きをしているかを明らかにする。

(2) C/EBP β ノックアウトマウスによる解析

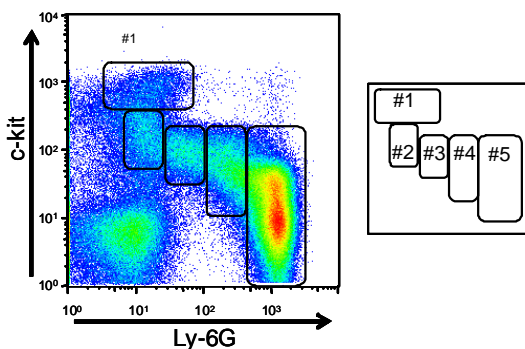
顆粒球造血刺激時の分化と増殖のカップリング調節におけるC/EBP β の機能を解析するためにC/EBP β ノックアウトマウスを用いた実験を行う。野生型マウスで行う実験と同様に*Candida albicans*の尾静脈投与で顆粒球分化の各ステップが野生型、ノックアウトマウスの間でそれぞれどのように制御されているかを検討する。また刺激により出現した骨髄中および末梢血中の顆粒球についてそれらの

形態、顆粒タンパク質を検討し、緊急時の顆粒球分化・増殖におけるC/EBP β の機能を検討する。

4. 研究成果

(1) フローサイトメトリによる顆粒球分化段階の評価法の確立

顆粒球造血における細胞周期や遺伝子変化を詳細に解析するためにマウス骨髄中の顆粒球の分化過程の細胞集団を分離することのできるフローサイトメトリの技術を開発した。顆粒球造血に関らないと考えられる巨核球・赤芽球系前駆細胞(c-kit+CD34-CD16/32-)、赤芽球(Ter119+)、B細胞(CD19+B220+)、T細胞(CD4+, CD8+)、好酸球(SSC^{high})を除外したのちに細胞を未分化な細胞の指標であるc-kitと顆粒球分化の指標としてLy-6Gで染色した。c-Kit陽性Ly-6G陰性の未分化な細胞からc-kit陰性Ly-6G陽性の成熟顆粒球までを図に示すように5つの亜分画(#1~#5)に分けた。ギムザ染色による細胞の形態およびcathepsinG、proteinase 3、myeloperoxidase、neutrophil elastase 2、lactoferrin、MMP9などの顆粒タンパク質の発現レベルを検討したところ#1~#5の亜分画は未分化な細胞から成熟顆粒球への分化を段階的に捕らえられているということが明らかとなった。



(2) 緊急時顆粒球造血における細胞周期と細胞分化のカップリング

(1)の方法を用いてマウスにおける*Candida albicans*感染モデルの病態を解析した。感染後2日目、4日目の各分化段階の顆粒タンパク質の発現パターンは定常状態と変化はなく、感染時(緊急)においても、今回開発したフローサイトメトリの手法が有用であることが裏付けられた。感染後すみやかに亜分画#5の頻度が低下し、迅速な動員が進行していることが示唆された。*In vivo* BrdU取り込みによる細胞周期の解析では#1および#2の亜分画で細胞周期の亢進が検出された。

(3) 緊急時顆粒球造血におけるC/EBP β の発現レベルの変化

われわれは過去の報告で緊急時の顆粒球造血においてC/EBP β が必須の役割を担っていることを明らかにしている。今回は、緊急時に顆粒球分化のどの段階でC/EBP β の発現が変化しているかについて検討した。リアルタイムPCRで検討したところ定常状態においてC/EBP β は#1で低く、顆粒球分化が進行するにつれて高くなる発現パターンを示した。興味深いことに#1~#5のいずれの亜分画でも感染によるC/EBP β のmRNA発現の有意な変化は認められなかった。そこで感染前後の各亜分画をソーティングし、タンパク質を抽出、抗C/EBP β 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。タンパク質レベルでは#1~#5のすべての亜分画でC/EBP β の発現亢進が認められた。C/EBP β は感染に対して転写以降のレベルで制御されていることが示唆された。

(4) 緊急時顆粒球造血におけるC/EBP β の機能解析

上述の C/EBP β の発現レベルの変化が感染時の顆粒球造血においてどのような意義を持つかについて C/EBP β のノックアウトマウスを用いて検討した。定常状態においてはノックアウトマウスは野生型と同等の重分画の頻度であった。感染により野生型で観察される#1 および#2 の増加と#5 の減少がノックアウトマウスでは認められなかった。細胞周期の解析では感染後のノックアウトマウスでは#1 および#2 の重分画で BrdU が野生型マウスに比して低い傾向が認められたが、その差は有意ではなかった。

以上の結果から C/EBP β は感染に際して転写以降のレベルで調整されて発現が亢進し、顆粒球の増殖と分化を制御している可能性が示唆された。今後、C/EBP β は感染症の病態の評価や制御の標的として検討していく必要があると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Tanaka R, Kimura S, Ashihara E, Yoshimura M, Takahashi N, Wakita H, Itoh K, Nishiwaki K, Suzuki K, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Satake S, Hirai H, Sawada K-I, Ottmann OG, Melo JV, Maekawa T: Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. *Cancer Letter* 116: 2089-2095, 2011. 査読有。 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.08.009

2. Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, Kimura S, Nakagawa Y, Tanaka R, Yao H, Nagao

R, Hayashi Y, Hirai H, Maekawa T. Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci* 102:591-596, 2011. 査読有。 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01813.x

3. Sakai K, Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Yamauchi A, Yao Y, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi T, Hirai H, Kimura S, Hirashima M, Yoshimura N, Maekawa T: Galectin-9 ameliorates acute Graft-versus-host disease through the induction of T-cell apoptosis. *Eur J Immunol* 41:67-75, 2011. 査読有。 DOI: 10.1002/eji.200939931

4. Nagao R, Ashihara E, Kimura S, Strovel JW, Yao H, Takeuchi M, Tanaka R, Hayashi Y, Hirai H, Padia J, Strand K, Maekawa T. Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia-adaptation by AV65--a novel Wnt/ β -catenin signaling inhibitor. *Cancer Lett.* 2011 Dec 15;312(1):91-100. 査読有。

DOI: 10.1016/j.canlet.2011.08.002

5. Kamio N, Hirai H, Ashihara E, Tenen DG, Maekawa T, Imanishi J: Use of bicistronic vectors in combination with flow cytometry to screen for effective small interfering RNA target sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 498-503, 2010 査読有。

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.033

6. Guibal FC, Alberich-Jorda M, Hirai H, Ebralidze A, Levantini E, Di Ruscio A,

Zhang P, Santana-Lemos BA, Neuberg D, Wagers AJ, Rego EM, Tenen DG : Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 114(27): 5415-5425, 2009. 査読有。 DOI: 10.1182/blood-2008-10-182071

7. Okamoto M, Hirai H, Taniguchi K, Shimura K, Inaba T, Shimazaki C, Taniwaki M, Imanishi J: Toll-like receptors (TLRs) are expressed by myeloid leukaemia cell lines, but fail to trigger differentiation in response to the respective TLR ligands. *Br J Haematol*, 147(4):585-587. (2009) 査読有。 DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07858.x

8. 平位秀世: C/EBP ファミリー転写因子による好中球産生の制御機構。 *医学のあゆみ TOPICS*, 23 (12) : 1199-1200, 2009. 査読無。 DOI: 該当なし

[学会発表] (計9件)

1. Hayashi Y, Hirai H, Yao H, Yoshioka S, Satake S, Kamio N, Miura Y, Ashihara E, Fujiyama Y, Tenen DG, Maekawa T: BCR/ABL-Mediated Myeloid Expansion Is Promoted by C/EBP β , a Regulator of Emergency Granulopoiesis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, US, December 11-13, 2011

2. Hayashi Y, Hirai H, Kamio N, Yao H, Satake S, Nagao R, Miura Y, Ashihara E, Maekawa T: Involvement of C/EBP β in BCR/ABL-dependent leukemogenesis.

第73回日本血液学会総会 (名古屋) 平成23年 10月 15日 (2011)

3. Satake S, Hirai H, Shime N, Nagao R, Tanaka R, Yao H, Hayashi Y, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Imanishi J, Maekawa T: Candidemia-Induced emergency granulopoiesis consists of successive dual waves triggered by the shift from C/EBP α to C/EBP β dependency. The American Society of Hematology 52st Annual Meeting and Exposition (ASH) (Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA) (December 6, 2010)

4. Kamio N, Hirai H, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M, Ashihara E, Maekawa T: A flow cytometry-based method for screening of effective small interfering RNA target sequences. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (栃木) 平成22年7月2日 (2010)

5. Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino S, Kimura N, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M, Ashihara E, Huang G, Tenen DG, Imanishi J, Maekawa T: Involvement of CREBs in the regulation of C/EBP β during "emergency" granulopoiesis. 第72回日本血液学会学術集会 (横浜) 平成22年9月24日 (2010)

6. 佐竹早紀子、平位秀世、志馬伸朗、長尾里奈、田中瑠璃子、八尾尚幸、林嘉宏、武内美紀、芦原英司、稲葉亨、藤田直久、今西二郎、前川平: 「骨髄系細胞の分化と機能制御」 敗血症における2相性”緊急”好中球造血

のフローサイトメトリーによる解析.
Candidemia-induced "emergency"
granulopoiesis consists of successive
biphasic waves.

第 72 回日本血液学会学術集会(横浜)
平成 22 年 9 月 24 日 (2010)

7. Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino
S, Kimura N, Satake S, Ashihara E, Maekawa
T, Tenen DG, Imanishi J: CREB Is Involved
in the Regulation of C/EBP β ; During
'emergency' Granulopoiesis. The
American Society of Hematology 51st Annual
Meeting and Exposition (New Orleans,
USA) (December 5, 2009)

8. Hirai H: Involvement of CREB in the
regulation of "emergency"
granulopoiesis through upregulation of
C/EBP β . Kyoto University Global COE
"Center for Frontier
Medicine" International
Symposium/Retreat 2009. (Hyogo, Japan)
(November 7, 2009)

9. 平位秀世: C/EBP family 転写因子による
顆粒球造血の制御. 第 15 回 血液科学セミ
ナー (東京) 平成 21 年 11 月 22 日 (2009)

[その他]

1. 平位秀世: 好中球造血の二つのモードと
疾患.

京都がん研究会メールマガジン 65 (9月号),
2009.

2. 京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療
部ホームページ

<http://dtm.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research>.

html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50315933

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

研究協力者

Daniel G Tenen (Harvard Stem Cell
Institute, Cancer Science Institute,
National University of Singapore)