

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 5月 24日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659183

研究課題名（和文） 骨髄における巨核球造血／脂肪細胞へのスイッチ制御機構の解明

研究課題名（英文） A study on cell-fate switching between megakaryocytes and adipocytes in bone marrow cells

研究代表者

池田 康夫（IKEDA YASUO）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00110883

研究成果の概要（和文）：巨核球と脂肪細胞の両方への分化能を有する細胞、そしてそれらどちらにも分化しない繊維芽細胞を用いた遺伝子発現解析において差異の認められたいくつかの因子の遺伝子導入細胞を種々のアプローチにより検討した結果、p45NF-E2/Maf G/Maf K が巨核球分化決定因子であり、脂肪分化決定因子 CEBPalphα の共発現の条件下では巨核球分化が抑制される事を認めた。したがって、p45NF-E2/Maf G/Maf K と CEBPalphα が巨核球と脂肪の分化スイッチ機構において重要な役割を有する事を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We carried out screening of megakaryocyte-inducing factors based on our previous findings; megakaryocytes and platelets were differentiated from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not its parent cell line 3T3 fibroblasts. Gene expression analysis of candidate transcription factors and gene transfection study showed that p45NF-E2, Maf G, and Maf K are determinant factors for megakaryocyte differentiation and platelet production. Megakaryocyte differentiation of p45NF-E2/Maf G/Maf K-expressing fibroblasts was inhibited by the co-expression of CEBP alpha, known to be a determinant factor for adipocytes. Thus, p45NF-E2/Maf G/Maf K and CEBPalphα are critical factors in cell-fate switching between megakaryocytes and adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

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：血栓止血学・再生医療

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

骨髄が脂肪変性におちいった時、造血機能が著明に低下することは、良く知られている事実であるが、その病態の分子機構は不明であり、従ってその治療法の開発は進んでいない。脂肪変性は加齢、化学療法後でしばしば観察されるが、血液難病のひとつで時に致死となる再生不良性貧血に於いては、骨髄生検で広汎な脂肪髄が観察され、特に巨核球の減少が顕著である。再生不良性貧血の原因として T リンパ球による造血幹細胞の傷害が挙げられ、近年では免疫抑制療法が奏功する症例の報告が相次いでいるが、重症例での治療はなお困難である。

本研究者は、少量の正常ヒト皮下脂肪組織から新規開発の分化誘導法にて大量の血小板を得られることを見いだした。これを端緒に本研究者は巨核球・血小板への分化は、造血幹細胞以外の他の細胞からも起こる可能性を考え、更に検討したところ、これまでに脂肪細胞に分化能を有するヒト骨髄間葉系幹細胞や脂肪前駆細胞が再現性良く、高い効率で巨核球・血小板分化に至ることを見いだした。これら知見を基に本研究は計画された。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄における巨核球造血/脂肪細胞への分化スイッチ制御機構の解明の為に、巨核球/脂肪細胞への細胞分化スイッチ関連因子を同定することを目的とする。造血能に重大な影響を及ぼす因子として、骨髄の脂肪変性があることは古くから知られているが、その分子機構については不明である。本研究者は、脂肪前駆細胞を巨核球・血小板分化誘導培地で培養すると巨核球・血

小板産生が起こることを見だし、その機序に脂肪分化関連因子が関与することを見いだしていた。本研究では、それを発展させ巨核球と脂肪細胞両方への分化能を有する細胞を用いて、そのスイッチ制御機構に影響を与える因子の同定を行い、骨髄脂肪変性と巨核球造血への運命決定機構を解明することにより、造血機能不全、特に血小板減少症の病態の分子機構の理解に基づく新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、巨核球・脂肪細胞の両方へ分化能を有することを本研究者が明らかにした数種の細胞株や初代培養細胞、あるいはどちらへの分化能も有さない細胞株を用いて、巨核球や脂肪細胞への *in vitro* 分化誘導実験において予備検討で絞り込んだ巨核球/脂肪細胞への分化制御のスイッチに関与すると考えられる候補因子の種々の条件下（阻害剤、遺伝子改変）で得られる結果から、それら細胞の分化方向を規定する因子を同定する。

これまでの報告において、細胞分化の決定には転写因子が重要な役割を有していることが示されているが、本研究者の知見は異なる系統での分化スイッチの為、これまでにその役割の報告は全く無いが、自験データではこのスイッチにおいても転写因子の深い関与が示唆されている。したがって本研究においても、脂肪細胞への分化、巨核球の分化それぞれに重要と考えられる転写因子に着目した検討を主に行った。

スクリーニングの為の検討で得られた結果を基にマウス p45NF-E2、MafG、MafK、CEBP alpha を単独あるいは組み合わせでマウス

3T3 繊維芽細胞株に導入し、巨核球・血小板の分化誘導培地で培養した。それら細胞の巨核球分化の評価は表面抗原マーカーの CD41 発現、CD42b 発現、多倍核化にて行った。その結果 p45NF-E2、MafG、MafK 遺伝子導入細胞が効率良く巨核球分化を示したため、次にヒト皮膚繊維芽細胞にヒト p45NF-E2、MafG、MafK を導入して巨核球・血小板の分化誘導培地で培養した。それら細胞の巨核球分化の評価は表面抗原マーカーの CD41 発現、CD42b 発現、多倍核化にて行った。ここで得られた細胞が *in vivo* で血小板産生を行うかどうかを検討するために、巨核球サイズの細胞を BSA gradient 法にて分離し、免疫不全 (NOG) マウスに放射線照射した血小板減少 NOG マウスに輸注し、末梢血液中のヒト血小板の割合を CD41 抗体で検出した。この血小板が機能を有するかどうかを検討するために、流動状態下で血栓形成への関与をフローチャンバー装置を用いて解析した。

巨核球・血小板の細胞運命決定因子となる p45NF-E2、MafG、MafK をヒト皮膚繊維芽細胞に導入する際に脂肪細胞決定因子の CEBP alpha を同時に導入し CD41、CD42b の発現解析を行い、p45NF-E2、MafG、MafK の働き CEBP alpha の影響を受けるかどうかを検討した。

4. 研究成果

巨核球・脂肪細胞の両方へ分化能を有することを本研究者らが明らかにした数種の細胞株や初代培養細胞、あるいはどちらへの分化能も有さない細胞株を用いて、その分化スイッチ機構を制御する因子の同定を行い、上述細胞から巨核球や脂肪細胞に *in vitro* にて分化誘導を行う際、その細胞分化決定のスイッチに関与すると考えられる候補因子の遺伝子導入を行い、ヒトあるいはマウスの巨核球や脂肪細胞への分化能への影響を検討した。種々のアプローチによる検討の結果、巨核球造血

への運命決定因子として p45NF-E2/Maf G/Maf K を同定した。マウス繊維芽細胞株やヒト成人皮膚繊維芽細胞にこれら転写因子の組み合わせを遺伝子導入し、巨核球分化誘導培地にて培養を行うと巨核球分化・血小板産生が認められた。巨核球造血への運命決定因子はこれまで不明であり、本知見が初めてであった。次に脂肪分化への決定因子として既に報告されている転写因子 PPAR gamma や CEBP alpha と前述の p45NF-E2/Maf G/Maf K を単独あるいは種々の組み合わせでマウス繊維芽細胞株とヒト成人皮膚繊維芽細胞に遺伝子導入を行い、巨核球や脂肪細胞に *in vitro* 分化誘導を行った。種々の詳細な検討の結果、マウス繊維芽細胞株やヒト成人皮膚繊維芽細胞に p45NF-E2 と CEBP alpha を遺伝子導入し、巨核球分化誘導培地にて培養を行うと巨核球分化・血小板産生の抑制が認められた。転写因子データベースを用いたコンピューター予測では p45NF-E2 のプロモーター領域に CEBP alpha の結合部位が存在する事を認めた。本研究において、p45NF-E2 と CEBP alpha が巨核球と脂肪の分化スイッチ機構において重要な役割を有することを見いだした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1) [Matsubara Y](#), Murata M, [Ikeda Y](#). Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol.* 2012;788:249-58. 査読有り

2) Arai T, Kawamura A, [Matsubara Y](#), Yokoyama K, [Ikeda Y](#), Fukuda K, Murata M. Effect of chronic kidney disease on platelet reactivity to dual-antiplatelet therapy in patients treated with drug-eluting stents. *Heart Vessels.* 2011 Aug 12. [Epub ahead of print] 査読有り

3) Ono M, Matsubara Y, Shibano Y, Ikeda Y, Murata M: GSK-3beta negatively regulates megakaryocyte differentiation and platelet production from human bone marrow cells *in vitro*. Platelets. 22: 196-203, 2011 査読有り

4) Matsubara Y: Low Responsiveness to Antiplatelet Drugs. J Jpn Coll Angiol 51: 309-314, 2011 査読無し

5) Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402: 796-800, 2010 査読有り

6) 松原由美子: 巨核球・血小板の *in vitro* 分化誘導法 日本血栓止血学会誌 21 (5); 509-513, 2010 査読無し

[学会発表] (計 4 件)

1) Wang Y, Ono Y, Ikeda Y, Okamoto S, Murata M, Poncz M, Matsubara Y. Induction of Megakaryocytes from Fibroblasts by p45NF-E2/Maf. 53rd The American Society of Hematology. 2011 年 12 月 13 日 San Diego (USA)

2) Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. Differentiation of OP9 Bone Marrow Stroma Cells into Megakaryocytes and Platelets via a p45NF-E2-mediated Mechanism. XXIII The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2011 年 7 月 25 日 国立京都国

際会館 (京都)

3) Ono Y, Matsubara Y, Iida K, Suzuki H, Ikeda Y, Okamoto S, Murata M. Induction of Megakaryocytes from Fibroblasts by p45NF-E2/Maf 第 73 回日本血液学会 2011 年 10 月 15 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

4) Sonoda A, Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Matsuo K, Murata M: Generation of Megakaryocytes from Mouse Subcutaneous Adipose Tissues *in vitro*. 第 72 回日本血液学会 2010 年 9 月 24 日 横浜パシフィコ (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 康夫 (Ikeda Yasu)
早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号 : 00110883

(2) 研究分担者

松原 由美子 (Matsubara Yumiko)
慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号 : 70365427