

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860776

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞における転写因子GATA-2の機能解析

研究課題名(英文) Role of GATA-2 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

沖津 庸子 (Okitsu, Yoko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80451558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 転写因子GATA2は造血幹細胞に発現し、その維持と増殖に必須の転写因子である。このGATA2は間葉系幹細胞にも発現していることが報告されており、造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞においてもその維持や分化に機能し、骨髄微小環境の機能に影響しうる可能性が考えられる。本研究を通じて、GATA-2の発現低下が間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導しうること、また造血幹細胞の支持能を低下させることをin vitroの検討により見出した。

研究成果の概要(英文)： The bone marrow microenvironment comprises multiple cell niches derived from bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). However, the molecular mechanism of BM-MSC differentiation is poorly understood. The transcription factor GATA2 is indispensable for hematopoietic stem cells (HSCs) function as well as other hematopoietic lineages, suggesting that it may maintain BM-MSCs in immature state and also contribute to their differentiation. To explore this possibility, we established BM-MSCs from human bone marrow. GATA2 loss- and gain-of-function analyses based on human BM-MSCs confirmed that decreased and increased GATA2 expression accelerated and suppressed BM-MSCs differentiation to adipocytes, respectively. When GATA2 knockdown BM-MSCs were cocultured with CD34+ cells, HSC frequency and colony formation decreased, indicating that decreased GATA2 expression induced BM-MSC differentiation, particularly into adipocytes, leading to the decreased hematopoietic supporting capacity.

研究分野：血液内科

キーワード：GATA-2 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血は汎血球減少を呈する骨髓不全症の代表疾患であり、造血細胞の減少と脂肪髄という特徴的な骨髓所見を呈する。これまで再生不良性貧血の発症機序として、造血幹細胞の減少が考えられてきたが、正常造血には造血細胞を支持する造血微小環境が必須であり、再生不良性貧血における脂肪髄化もその発症において重要な造血環境の変化と考えられる。

転写因子 GATA-2 は、主に造血幹細胞に発現し、その機能に必須の転写因子と考えられている。興味深いことに、申請者らを含めた複数のグループから再生不良性貧血症例の造血幹細胞において、GATA-2 の発現量が低下していることが報告されており、病態への関与が示唆されている(Fujimaki et al. *Br J Haematol.* 2001;113:52-57, Zeng et al. *Blood.* 2004;103:325-332)。

一方、造血微小環境は、骨芽細胞や血管内皮細胞、脂肪細胞などのストローマ細胞で構成されるが、それらは共通の前駆細胞である間葉系幹細胞が分化して形成される。申請者を含むグループは GATA-2 の発現低下が間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導しうることを *in vitro* の検討により見出した(Okitsu et al. *BBRC.* 2007;364:383-387)。さらに、Xu らは再生不良性貧血の間葉系幹細胞においても GATA-2 の発現が低下していることを報告した(Xu et al. *Exp Hematol.* 2009;37:1393-1399)。しかしながら、GATA-2 がいかに脂肪分化に寄与しうるかについての分子学的機序については不明な点が残されている。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞・造血幹細胞の機能に重要な転写因子 GATA-2 の標的遺伝子およびその制御因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髓間葉系幹細胞(BM-MSC)の作成

インフォームドコンセントが得られた成人健常ドナーの骨髓から Ficoll-Paque Plus Premium (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を用いた密度勾配遠心法にて単核球を分離し、 $5 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞を 6 ウェルマルチウェルセルカルチャープレート上で 20% 間葉系幹細胞用ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES) (Invitrogen) 10ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) 100 U/ml ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagles; DMEM) 培地 (Invitrogen) で培養し、樹立した。

脂肪分化誘導には、インスリン、イソブチルメチルキサンチン、デキサメタゾン、インドメタシン、L-グルタミン、Mesenchymal Cell Growth Supplement を含む hMSC Differentiation BulletKit -Adipogenic (Lonza, Walkersville, MD, USA) を用いた。

(2) GATA-2 ノックダウン

GATA2 siRNA を用いて GATA2 の発現を抑制し、それぞれ形態変化・機能解析を行った。GATA2 siRNA の配列は、GUGCUGAUGUAGUGACCAATT、UUGGUCACUACAUCAGCACTT である (B-Bridge International, Inc. Cupertino, CA, USA)。対照 siRNA として、AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた。BM-MSC への siRNA 導入は Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Invitrogen) を用いてリポフェクション法で行った。また得られたサンプルを用いて、

Human Genome U133 Plus 2.0 Array
(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) にて
cDNA マイクロアレイ解析を行った。

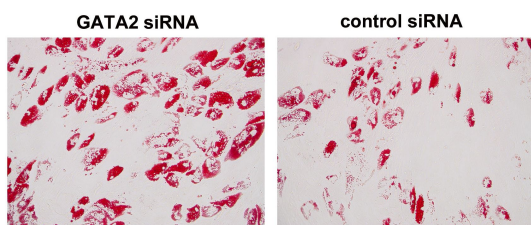
(3) ヒト CD34 陽性細胞と BM-MSC の共培養

BM-MSC を 6 ウェルマルチウェルセルカルチャープレート上において 2×10^4 /ml の細胞数で 1 日培養後、siRNA による RNA 干渉法で GATA2 の発現を抑制した。さらに 48 時間後、培養液を除去し、PBS で 1 回洗浄した BM-MSC 上にヒト CD34 陽性臍帯血単核球を 2.5×10^4 /ml になるように加え、7 日間培養し、回収した。さらに回収した CD34 陽性細胞を用いて Methocult™ H4435 Enriched (STEMCELL) を用いた半固形培地にて 14 日間培養を行い、コロニー数を計測した。

4 . 研究成果

(1) GATA2 の発現低下は BM-MSC を脂肪細胞分化へ誘導する

BM-MSC において GATA2 の発現を人為的に抑制し分化への影響を検討した。同細胞に GATA2 特異的 siRNA を導入し、48 時間後に細胞を回収し、GATA2 の発現低下を定量 RT-PCR で確認した。次に、この方法にて GATA2 の発現を低下させた BM-MSC を脂肪細胞へと分化誘導した。定量 RT-PCR で脂肪細胞分化関連遺伝子 (CEBP β 、CEBP α 、PPAR γ 、aP2、Adipsin) の発現量を確認したところ、CEBP α 、PPAR γ 、aP2 の有意な上昇が見られた。また、12 日目の分化細胞の脂肪的形成能を Oil red O 染色にて検討したところ、GATA2 発現抑制細胞では対照細胞と比較して脂肪細胞の増加が認められた(図 1)。



(図 1) GATA2 抑制 BM-MSC の脂肪染色

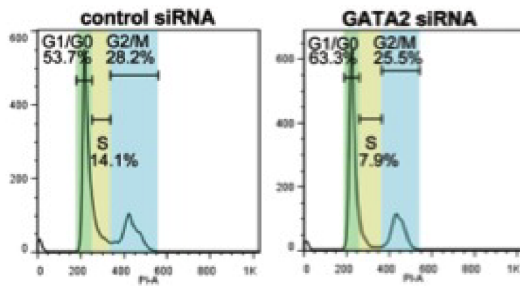
(2) BM-MSC での GATA2 制御遺伝子発現プロファイル解析

BM-MSC において GATA2 に制御される遺伝子群を明らかにするために、siRNA 干渉によって GATA2 発現を抑制した BM-MSC 検体を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、発現遺伝子プロファイルを検討した。2 検体の平均値で GATA2 発現抑制細胞において 2 倍発現上昇または低下した遺伝子を抽出したところ、発現が上昇した遺伝子は 90 遺伝子、発現が低下した遺伝子は 189 遺伝子であった。この cDNA マイクロアレイで発現が変動した脂肪細胞分化に関連する遺伝子は認められなかった。発現低下した遺伝子の中には LAMB1 や CD44 などの細胞接着因子や、骨芽細胞分化調節の報告のある ENPP1 が含まれていた。GATA2 制御遺伝子群の遺伝子オントロジー解析では GATA2 制御遺伝子群は細胞周期 (Cell cycle) 発生過程 (Developmental process) 細胞増殖および分化 (Cell proliferation and differentiation) などに関与することが明らかとなった。

(3) GATA2 は細胞周期を調節する

GATA2 抑制遺伝子の発現プロファイル解析にて細胞周期制御関連遺伝子、特にサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent cinase; CDK)/サイクリン系関連遺伝子の発現が対照細胞と比較して低下していたことから、GATA2 発現抑制 BM-MSC 細胞周期を解析することとした。

その結果、対照細胞と比較して GATA2 発現抑制 BM-MSC では G0/G1 期の細胞数が増加し、S 期の細胞数が低下していた(図 2)。この結果から、GATA2 は CDK/サイクリン系遺伝子を介して細胞周期調節にかかわっている可能性が示唆された。



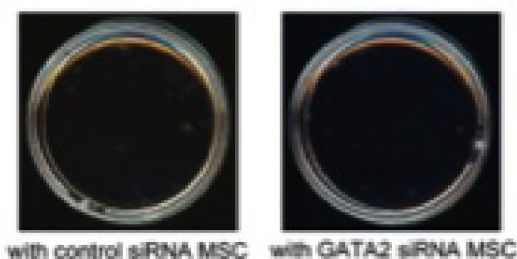
(図 2) GATA2 抑制 BM-MSC の細胞周期解析

(4) GATA2 発現低下 BM-MSC は骨髄支持能が低下する

BM-MSC は骨髄微小環境における骨芽細胞、脂肪細胞など間葉系細胞の前駆細胞であり、近年では BM-MSC 自身の造血細胞への関与が報告されている。このため BM-MSC における GATA2 発現変化が BM-MSC の造血支持能に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

GATA2 発現抑制 BM-MSC を支持細胞とし、ヒト CD34 陽性臍帯血単核球を 7 日間共培養し、回収したヒト CD34 陽性臍帯血単核球をフローサイトメトリーで解析した。対照細胞と比較し、GATA2 発現抑制 BM-MSC と共培養した CD34 陽性臍帯血単核球で HSC の数が低下していた。また、回収した CD34 陽性臍帯血単核球を用いてコロニーアッセイを行ったところ、対照細胞と比較して GATA2 発現抑制 BM-MSC と共培養した細胞でコロニー形成の低下がみられた (図 3)

この結果より、BM-MSC の GATA2 発現低下は骨髄支持能の低下に帰結する可能性が示唆された。



(図 3) GATA2 抑制 BM-MSC との共培養後のコロニーアッセイ

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 9 件 : 全て査読あり)

1. Saito Y, Fujiwara T, Ohashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. High-throughput siRNA screening to reveal GATA-2 upstream transcriptional mechanisms in hematopoietic cells. *PLoS ONE*. 2015;10:e0137079. doi: 10.1371/journal.pone.0137079.
2. Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454:102-108. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.050.
3. Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2014;99:1686-1696. doi: 10.3324/haematol.2014.105692.
4. Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. *J Biol Chem*.

- 2014;21:8121-8134.
doi: 10.1074/jbc.M114.548651.
5. Nakajima S, Fujiwara T, Ohguchi H, Onishi Y, Kamata M, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Harigae H. Induction of thymic stromal lymphopoietin in mesenchymal stem cells by interaction with myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2014;55:2605-2613.
doi: 10.3109/10428194.2014.881478.
6. Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profiling of ETO2-regulated miRNAs in erythroid cells: possible influence on miRNA abundance. *FEBS Open Bio*. 2013;3:428-432.
doi: 10.1016/j.fob.2013.10.004.
7. Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LMO2 in human erythroid cells. *Exp Hematol*. 2013;41:1062-1076.
doi: 10.1016/j.exphem.2013.09.003.
8. Fujiwara T, Ikeda T, Nagasaka Y, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tomosugi N, Harigae H. A low-molecular-weight compound K7174 represses hepcidin: Possible therapeutic strategy against anemia of chronic disease. *PLoS ONE*. 2013;8:e75568.
doi: 10.1371/journal.pone.0075568.
9. Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Role of transcriptional corepressor ETO2 in erythroid cells. *Exp Hematol*. 2013;41:303-315.
doi: 10.1016/j.exphem.2012.10.015.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. 転写因子 GATA2 による間葉系幹細胞の分化制御. 第 7 6 回日本血液学会 (大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日)
2. Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 REGULATES DIFFERENTIATION OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS. 第 1 9 回欧州血液学会 (ミラノ, イタリア, 2014 年 6 月 10 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔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
血液免疫病学分野ホームページ
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
沖津 庸子 (OKITSU, YOKO)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号 : 80451558

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：