

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870486

研究課題名(和文) Zfp521ノックアウトマウスは造血器および脳神経の発生分化機構の解明に寄与する

研究課題名(英文) The role of zinc finger protein 521 in hematopoiesis and neural differentiation.

研究代表者

松原 悦子 (Matsubara, Etsuko)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70571082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Zfp521欠損マウスを作製した。Zfp521欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれたが、週齢を重ねるとコントロールマウスに比べて小型になり、早期に死亡した。Zfp521欠損マウスは、リンパ網内系組織の委縮が顕著であり、リンパ濾胞の形成不良や多系統にわたる血液細胞の分化の異常がみられた。Zfp521欠損マウスは、多動などの明らかな行動異常が見られた。Zfp521欠損マウスの歯状回で層構造の異常が見られ、神経幹細胞のマーカーであるSox1陽性細胞が減少していた。以上の結果から、Zfp521は神経幹細胞の分化を制御し、脳歯状回の形成に関わること、マウス個体の行動に関わる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We generated mice lacking of the Zfp521 gene. The birth ratio of Zfp521 / mice was consistent with Mendel's laws. Zfp521 / mice displayed significant weight reduction as they grew. Especially, the thymus and spleen of Zfp521 / mice were more than 40% lighter than those of the controls. Zfp521 / mice displayed abnormal behavior, such as hyper-locomotion, lower anxiety and impaired learning. The border of the granular cell layer of the dentate gyrus of Zfp521 / mice was indistinct and granular neurons were reduced in number. Sox1-positive neural progenitor cells in the dentate gyrus and cerebellum were significantly reduced in number. These findings suggest that Zfp521 affects the formation of the neuronal cell layers of the dentate gyrus, and Zfp521 / mice displayed schizophrenia-relevant symptoms.

研究分野：血液内科

キーワード：Zfp521 ノックアウトマウス 幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

ヒトzinc finger protein 521 (ZNF521)は、30のKruppel-like zinc fingerを持つ転写因子である。ZNF521は、ヒトCD34陽性造血幹細胞および前駆細胞に高発現し、血液細胞の分化に伴い発現が低下する。多くの骨髄性白血病細胞において高発現し(Bond HM, et al. Blood, 2004)、急性リンパ球性白血病においてBリンパ球分化に必須のPAX5と融合遺伝子を形成し(Mullighan CG, et al. Nature, 2007)、骨髄単球系白血病においてMLLとの関連性が報告されている(Jo A, et al. Br J Haematol, 2009)。これらよりZNF521は造血幹細胞の維持や腫瘍化との関連が注目される。私達は、造血細胞におけるZNF521遺伝子の発現をRNA干渉により抑制することで、多分化能を有する未熟造血細胞が赤血球へと分化することを報告した。さらに、ZNF521は赤血球分化に必須の転写因子であるGATA-1と直接結合し、GATA-1の転写活性を負に制御することによって造血細胞の分化を抑制することを明らかにした。これらより、ZNF521が造血幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を担うことを報告した(Matsubara E, et al. J Biol Chem, 2009)。

2. 研究の目的

Zinc finger protein 521 (Zfp521)はZNF521のマウスホモログである。Zfp521は2003年にB細胞の分化を抑制すると最初の報告(Warming S, et al. Blood, 2003)がなされて以来、軟骨骨芽細胞の分化(Correa D, et al. Dev Cell, 2010)、ES細胞から外胚葉性神経幹細胞の分化(Kamiya D, et al. Nature, 2011)など、種々の細胞の分化に重要と報告された。また、Zfp521はB細胞腫瘍との関連が報告されており(Warming S, et al. Oncogene, 2004; Hentges K. E, et al. Oncogene, 2005; Yamasaki N, et al. 2012, Oncogene, 2012)、ヒトZNF521においても造血器腫瘍との関連が報告されているため、Zfp521遺伝子改変マウスはZNF521に関連するヒトの疾患を解明するモデルマウスとして有用であると考えた。

研究開始当初はZNF521に関する遺伝子改変マウスの報告はなく、生体内での役割は未知であった。

そこで、私達は、Zfp521欠損マウスを作製し、細胞レベルから個体レベルの行動解析までを行い、Zfp521が生体において造血器および脳神経の発生分化機構に与える役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)Zfp521欠損マウスの作製

Zfp521キメラマウスを作製し、C57BL/6Jマウスと10世代以上戻し交配を行い、背景をC57BL/6J化したZfp521欠損マウスを作製した。Zfp521欠損マウスは胎生致死ではなく出生し得ることを確認した。サザンプロット法およびノーザンプロット

法を行い、Zfp521欠損マウスの作製方法に問題がないことを確認した。

(2)表現型の検討

作製したZfp521欠損マウスとコントロールマウスとについて表現型を比較検討した。

(3)血液細胞の分化の解析

Zfp521欠損マウスを用いて、Zfp521非存在下における血液細胞の分化を解析した。免疫組織染色やフローサイトメトリー、DNAマイクロアレイによる網羅的解析などにより検討した。

(4)行動解析

Zfp521欠損マウスとコントロールマウスの行動を観察した。Zfp521欠損マウスに異常な行動がみられたため、オープンフィールド試験や高架式十字迷路試験などを行い、定量的に解析した。

(5)脳神経細胞の分化の解析

Zfp521欠損マウスの脳を用いて、Zfp521非存在下における神経の分化を解析した。神経幹細胞のマーカーであるSox1などの抗体を用い、免疫組織染色や、イムノプロット法による発現の定量などを行った。

4. 研究成果

(1)Zfp521欠損マウスの作製

私達の作製したZfp521欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれた。Zfp521欠損マウスは、サザンプロット法でZfp521が欠損していることを確認し、ノーザンプロット法でZfp521の発現がないことを確認した。

(2)表現型の検討

Zfp521欠損マウスは、出生時はコントロールマウスとの体重差はなかったが、2週齢頃からはコントロールマウスに比べて明らかに小型であった(図)。臓器別では、脳、肺、脾臓、腎臓、副腎の重量が有意に軽かった。また、発育が悪く早期に死亡することがわかった。



図. 同腹仔

(左) ZFP521欠損マウス

(右) コントロールマウス

(3) 血液細胞の分化の解析

Zfp521 欠損マウスは、コントロールマウスに比べて脾臓、胸腺、リンパ節などのリンパ網内系組織の委縮が顕著であった。病理組織学的にリンパ濾胞の形成不良や多系統にわたる造血器の分化の異常がみられた。DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析では Zfp521 と血球系統特異的遺伝子や骨髄微小環境などとの関連性が示唆された。

(4) 行動解析

Zfp521 欠損マウスは、多動などの明らかな行動異常が見られたため、行動異常について定量的に精査をおこなった。オープンフィールド試験ではコントロールマウスに比べ移動距離が増え、中央エリアで過ごす時間が増えるなどの不安行動の減弱が見られた。さらに、学習能力や記憶力の減弱が示唆された。また、同様の結果は高架式十字迷路試験などでも得られた。これらの結果は統合失調症のマウスの行動と類似がみられた。

(5) 脳神経細胞の分化の解析

次に、行動異常に関わる脳の構造変化について組織学的に解析した。12 週齢の Zfp521 欠損マウスの脳はコントロールマウスに比べていずれも小さかったが、外観に異常はなかった。Zfp521 欠損マウス脳の切片を作製し HE 染色したが、層構造などに明らかな異常はみられなかった。5 週齢の Zfp521 欠損マウスの脳に外観上の異常はなかったが、歯状回において顆粒細胞の減少や層構造の不明瞭化が見られた。胎生 19.5 日において、コントロールマウスの海馬は正常であったが、一方で、Zfp521 欠損マウスの海馬は形成不良がみられた。

さらに、神経細胞の分化について、神経幹細胞のマーカーである Sox1 の検討をおこなった。5 週齢の Zfp521 欠損マウスの歯状回と小脳で、Sox1 陽性細胞の減少がみられた。また、イムノプロット法で、Sox1 の発現が Zfp521 欠損マウスの小脳で明らかに減弱していることを確認した。

以上の結果から、Zfp521 は神経幹細胞の分化を制御し、脳歯状回の形成に関わること、マウス個体の行動に関わることが明らかとなった。

Kamiya らの培養系実験報告では Zfp521 は神経細胞への分化に必須で Zfp521 を欠損すると胎性致死になる可能性が示唆されていたが、私達の Zfp521 欠損マウスは短命であるものの生存可能であり、発生・分化機構の解明に寄与するものであった。

< 引用文献 >

Etsuko Matsubara, Ikuya Sakai, Jun Yamanouchi, Hiroshi Fujiwara,

Yoshihiro Yakushijin, Takaaki Hato, Kazuhiro Shigemoto, Masaki Yasukawa. The role of zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein in erythroid differentiation. J Biol Chem. 2009; 284:3480-3487.

Daisuke Kamiya, Satoe Banno, Noriaki Sasai, Masatoshi Ohgushi, Hidehiko Inomata, Kiichi Watanabe, Masako Kawada, Rieko Yakura, Hiroshi Kiyonari, Kazuki Nakao, Lars Martin Jakt, Shinichi Nishikawa, Yoshiki Sasai. Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. Nature. 2011; 470: 503-509.

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 2 件)

Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Kazuto Takeuchi, Toshiyuki Niiya, Masaki Yasukawa. Successful treatment with rituximab in an elderly patient in his 80s with recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura. Jpn J Clin Hematol. 2016, inpress. 査読有.

Nobutaka Ohkubo, Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Rie Akazawa, Mamoru Aoto, Yoji Suzuki, Ikuya Sakai, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Seiji Matsuda, Masaki Yasukawa, Noriaki Mitsuda. Abnormal behaviors and developmental disorder of hippocampus in zinc finger protein (ZFP521) mutant mice. PLoS One. 2014; 9; e92848. 査読有.
DOI:10.1371/journal.pone.0092848

[学会発表](計 12 件)

松原悦子、山之内純、竹内一人、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。再発時にリツキシマブが著効した 80 歳代高齢者血栓性血小板減少性紫斑病の 1 例 第 113 回日本内科学会四国地方会。平成 27 年 12 月 6 日。サンポート高松(香川県・高松市)

松原悦子、酒井郁也、山之内純、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。A TET2-deficient leukemic cell line established from a patient with chronic neutrophilic leukemia. 第 77 回日本血液学会学術集会。平成 27 年 10 月 16 日。ホテル金沢(石川県・金沢市)

松原悦子、山之内純、山崎仁志、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。急性虫垂炎を初発症状とした急性骨髄性白血病の1例。第112回日本内科学会四国地方会。平成27年6月7日。高知市文化プラザかるぽーと(高知県・高知市)

Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Taichi Azuma, Hiroshi Fujiwara, Yoshihiro Yakushijin, Takaaki Hato, Masaki Yasukawa. Calreticulin mutation in essential thrombocythemia does not activate integrin IIb 3. The 6th JSH International Symposium 2015. 平成27年5月22日。Karuizawa Prince Hotel(Nagano・Karuizawa)

Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Yoshihiro Yakushijin, Takaaki Hato, Masaki Yasukawa. Evaluation of the predictive factors of MDS patients treated with azacitidine. The 13th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 平成27年5月1日。Washington D.C.(USA).

Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Taichi Azuma, Hideyuki Nakanishi, Hiroshi Fujiwara, Yoshihiro Yakushijin, Masaki Yasukawa. Activation status of integrin IIb 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. The 2015 Highlights of ASH in Asia. 平成27年2月28日。Bangkok (Thailand)

松原悦子、山之内純、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。アザシチジン早期中止後も長期間血液学的改善効果を維持する骨髄異形成症候群の1例。第111回日本内科学会四国地方会。平成26年11月30日。松山コミュニティセンター(愛媛県・松山市)

松原悦子、山之内純、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。The incidence of infections in hematologic patients with transfusional iron overload. 第76回日本血液学会学術集会。平成26年11月2日。大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

松原悦子、山之内純、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴。デフェラシロクスによる鉄キレート療法は致死的感染症および真菌症の発生を抑制する。第88回日本感染症学会学術講演会 第62回日本化学療法学会総会 合同総会。平成26年6月20日。ヒルトン福岡シーホーク(福岡

県、福岡市)

松原悦子、谷本一史、山之内純、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。骨髄異形成症候群患者におけるアザシチジン治療の予後予測因子に関する解析。第111回日本内科学会講演会。平成26年4月13日。東京国際フォーラム(東京都)

松原悦子、東太地、小林慎治、山之内純、成見弘、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴。アザシチジンで治療をしたMDS患者における revised IPSS と予後の関係。第75回日本血液学会学術集会。平成25年10月11日。ロイトン札幌(北海道・札幌市)

大久保信孝、赤沢里瑛、土居千晃、平田香穂里、青戸守、鈴木洋司、松原悦子、山之内純、酒井郁也、松田正司、安川正貴、満田憲昭。神経分化誘導因子 Zfp521 は海馬歯状回の形成と個体の行動に関わりがある。第65回日本生理学会中国四国地方会。平成25年11月3日。川崎医科大学 現代医学教育博物館(岡山県・川崎市)。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 悦子 (Matsubara, Etsuko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70571082

(2)研究分担者
なし