

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461452

研究課題名(和文) 転写因子Foxf1aの造血幹細胞機構・疾患病態生理への関与

研究課題名(英文) The role of Foxf1a for the function of hematopoietic stem cells

研究代表者

大森 司 (Ohmori, Tsukasa)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70382843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子Foxf1aの造血幹細胞(HSC)機能への役割を明らかにすることを目的とした。Foxf1aは血球細胞ではHSCと巨核球に発現を認めた。Foxf1a欠損マウスは胎生致死であるためにコンディショナル欠損マウスを作製した。作製したFoxf1a欠損マウスでは、骨髄細胞数が増加したが、末梢血の血球数に差は認めなかった。Foxf1a欠損HSCの造血幹細胞生着能、Long-term culture-initiating cellの割合が低下した。細胞周期解析ではHSCのS期の割合が増加した。以上より、Foxf1aはHSCの静止期を保ち、その生着能に寄与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Vinculin is indispensable for the maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs). Microarray analysis revealed that the expression of Foxf1a significantly reduced by the inhibition of vinculin. To examine the role of Foxf1a for HSC function, we developed conditional gene-deficient mice. In bone marrow, HSC and megakaryocytes expressed FoxF1a. While white blood cells, red blood cells, and platelets in peripheral blood were not affected, the number of bone marrow cells increased by the deletion of Foxf1a. Competitive repopulation assay of HSC showed that the deletion of Foxf1 deteriorated repopulation capacity of HSCs to reconstitute hematopoiesis. The frequency of long-term culture initiating cells also reduced. Finally, cell cycle analysis by the incorporation of BrdU in vivo revealed the increase in S phase of HSCs by the loss of Foxf1a. These data suggest that Foxf1a regulates quiescent of HSC in bone marrow niche to maintain the hematopoiesis.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 Niche 細胞周期 転写因子

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞骨格蛋白 Vinculin が造血幹細胞の骨髄内の維持機構に関与することを明らかにした (Ohmori *et al.*, J Biol Chem 2010; 科学研究費助成事業 (若手 B; 平成 20-21 年度)). この機序を明らかとするために、Vinculin 抑制による遺伝子発現変化をマイクロアレイにて解析した. 異なる 2 つの shRNA 配列に共通して Foxf1a という転写因子が、最も発現が抑制されていた.

最近では Foxf1a を含む 16 染色体長腕領域の大きな欠失 (Foxc2, Foxl1, など他の欠損を含む) が、致死的な新生児疾患である alveolar capillary dysplasia や左心形成不全, 食道閉鎖, 尿管奇形などの原因になりうること (AM J Hum Genet, 2009; Am J Med Genetics, 2010) が報告された. Foxf1a のノックアウトマウスは既に報告されており, E9 を越えて生存するホモマウスは存在しない (Development 2001). ヘテロマウスでも重篤な表現型をしめすため心・血管・造血の発生や疾患病態生理に, Foxf1a が関与するかどうかについては十分な解析がされていない.

2. 研究の目的

本研究では, Foxf1a コンディショナルノックアウトマウスを作製し, 臓器特異的なノックアウトマウスを用いて, Foxf1a の造血幹細胞機能を明らかにする.

3. 研究の方法

本研究は造血幹細胞機能, 及び造血器悪性腫瘍発症における転写因子 Foxf1a の役割と病態生理の関与を明らかにするために Foxf1a コンディショナルノックアウトマウスを作成し, 検討に用いた (Foxf1a^{flox/flox}). Foxf1a^{flox/flox} マウスを得た後に, インターフェロン誘導性に Cre を発現する Mx1-Cre マウスとの交配を行った (Mx-Cre: Foxf1a^{flox/flox}). Cre を誘導する polyI:C 投与後に造血幹細胞分画, 末梢血分画を観察し, Foxf1a が造血・血球分化に対する役割を検討した. 造血幹細胞領域をソーティングし移植を行い, 造血幹細胞の生着・維持への Foxf1a の役割を評価した. 長期にマウスを詳細に維持することで, 造血器悪性腫瘍・骨髄増殖性疾患の発症について観察した. 造血幹細胞の細胞周期, 血球分化能, 他の血球細胞の細胞機能を検討し, 造血幹細胞や血球細胞での Foxf1a の役割・その機序を同定した.

4. 研究成果

1) Vinculin 抑制による造血幹細胞 mRNA 変化: 造血幹細胞領域である c-kit 陽性, Sca1 陽性, Lineage 陰性 (KSL 分画) 細胞に対して, コントロール, Talin shRNA, 2 種類の Vinculin shRNA を発現するレンチウイルスベクターを感染させ, mRNA を採取し, マイクロ

アレイ解析を行った. インテグリンシグナルに無関係, かつ Vinculin 抑制に特異的な発現変化を確認するために, Talin で発現が抑制せず, Vinculin の異なる 2 つの shRNA 配列で効率よく抑制される mRNA を選択した (表 1). 同定済み遺伝子の中で, 最も発現が変化する mRNA として Foxf1a を同定した (表 1).

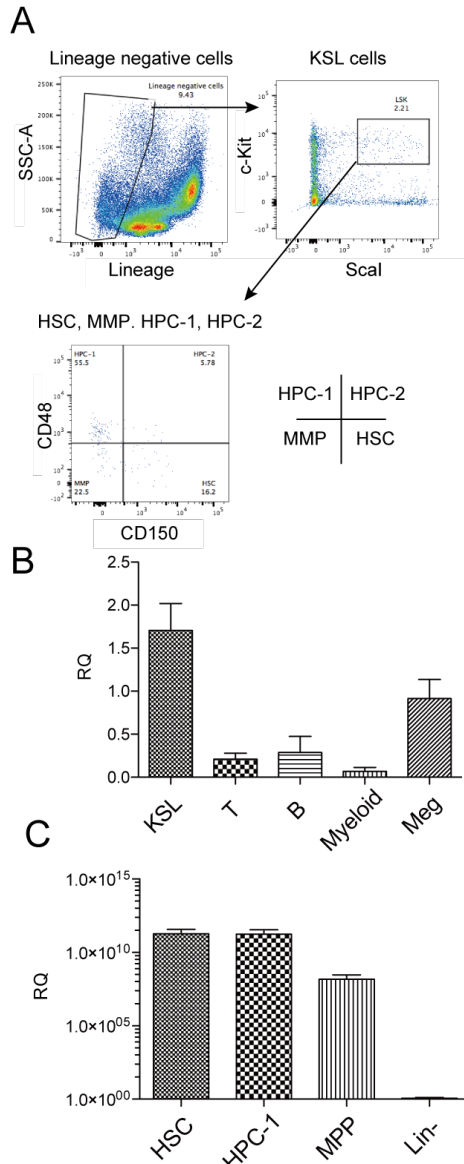
表 1 Vinculin 抑制により変化する mRNA

Number	Description	R vs		
		A	R vs B	R vs C
19621	Neurod2	0.41	-0.43	-0.49
26455	Foxf1a	0.34	-0.86	-0.87
26285	[AK044606]	0.26	-0.99	-0.99
30185	Sync	0.17	-0.46	-0.56
18505	[AK015310]	0.14	-0.39	-0.55
39970	Vlri8	0.07	-0.39	-0.57
28530	[AK009336]	0.04	-0.85	-0.84
7247	1200009O22Rik	0.03	-0.48	-0.44
26877	vinculin (Vcl)	0.01	-0.41	-0.35
45200	Fgf10	0.01	-0.53	-0.70
4252	[AK034355]	-0.01	-0.36	-0.32
21465	Myod1	-0.01	-0.38	-0.45
31717	Myod1	-0.03	-0.34	-0.41
22712	vinculin (Vcl)	-0.03	-0.40	-0.36
7403	Tmem163	-0.05	-0.43	-0.79
28242	[AK140043]	-0.06	-0.64	-1.05
27456	Olf154	-0.06	-0.37	-0.32
7050	Myod1	-0.09	-0.41	-0.49
20216	paxillin beta	-0.09	-0.56	-0.36
27822	[AK039273]	-0.11	-1.04	-0.78
33259	[AK090281]	-0.12	-0.82	-0.83
9457	Myog	-0.12	-0.44	-0.45
26044	[AK043419]	-0.13	-0.54	-0.39
18234	Fgf2	-0.16	-0.50	-0.38
10711	[AK017106]	-0.17	-0.71	-0.56
14893	Olf190	-0.20	-0.51	-0.32
24141	[AK018435]	-0.20	-0.59	-0.31
21421	L-Gulo	-0.20	-0.51	-0.51
5815	[AK037397]	-0.22	-0.78	-0.84
7100	Olf1495	-0.24	-0.58	-0.34

*Value was expressed as log10. R=control, A=Talin shRNA, B=Vinculin shRNA(B),

C=Vinculin shRNA (C).

2) 骨髄細胞の Foxf1a 発現：骨髄細胞を lineage 陰性分画に分け、さらに c-kit 陽性、ScaI 陽性分画、さらに CD48 と CD150 の発現により HSC, HPC, MMP 領域に分けた (図 1A)。骨髄細胞 mRNA は KSL 細胞発現を 1 とした場合、KSL 細胞、巨核球に Foxf1a の発現を認めた (図 1B)。さらに、KSL 細胞分画を展開すると、造血幹細胞である HSC, HPC-1, MMP 領

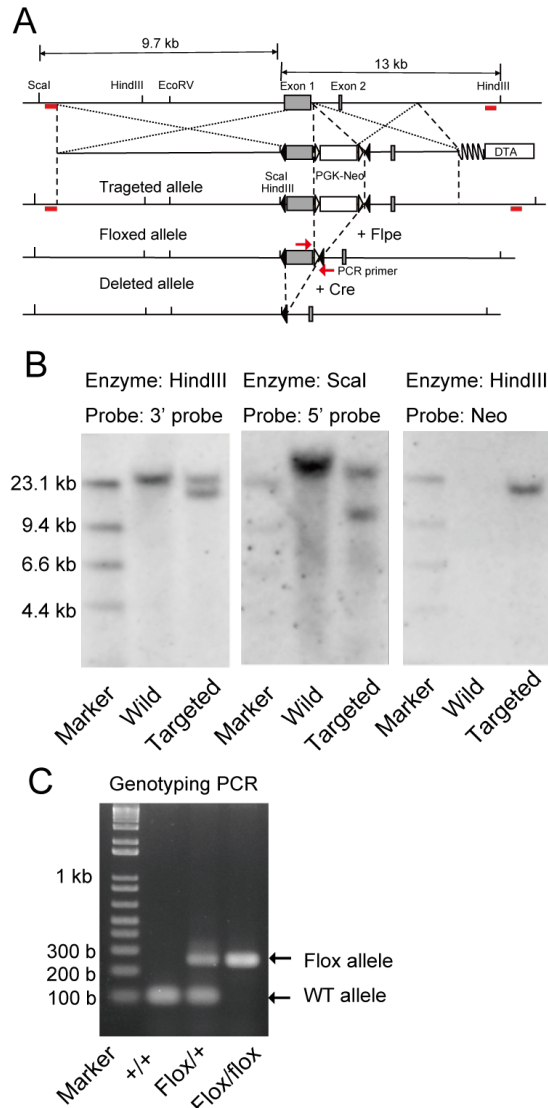


域に高い発現を認めた (Lineage 陰性分画を 1 と定義：図 1C)。

図 1 骨髄細胞 Foxf1a 発現

(A) 骨髄細胞を Lineage パネル陰性, c-kit 陽性, ScaI 陽性分画に分け (KSL), さらに CD48 と CD150 で展開を行った。(B) KSL 細胞, T 細胞, B 細胞, 好中球 (Myeloid), 巨核球 (Meg) から mRNA を抽出してリアルタイム PCR で mRNA 発現を定量化した。(C) KSL 領域をさらに HSC, HPC-1, MMP 領域に分け, mRNA 発現と Lineage 陰性細胞の mRNA と比較した。データは平均と標準誤差。

3) Foxf1a コンディショナルノックアウトマウスの作製 (図 2)：Foxf1a ノックアウトマウスは胎生致死であるためにコンディショナルノックアウトマウスを作製した。Foxf1a の exon 1 の両端に lox 配列と PGK-Neo を発現するターゲティングベクターを作製し (図 2A), ES 細胞にエレクトロポレーションをおこない, 相同組換えが生じている ES 細胞を得た (図 2B)。キメラマウス, F1 マウスを得た後に, Flpe マウスとの交配によって

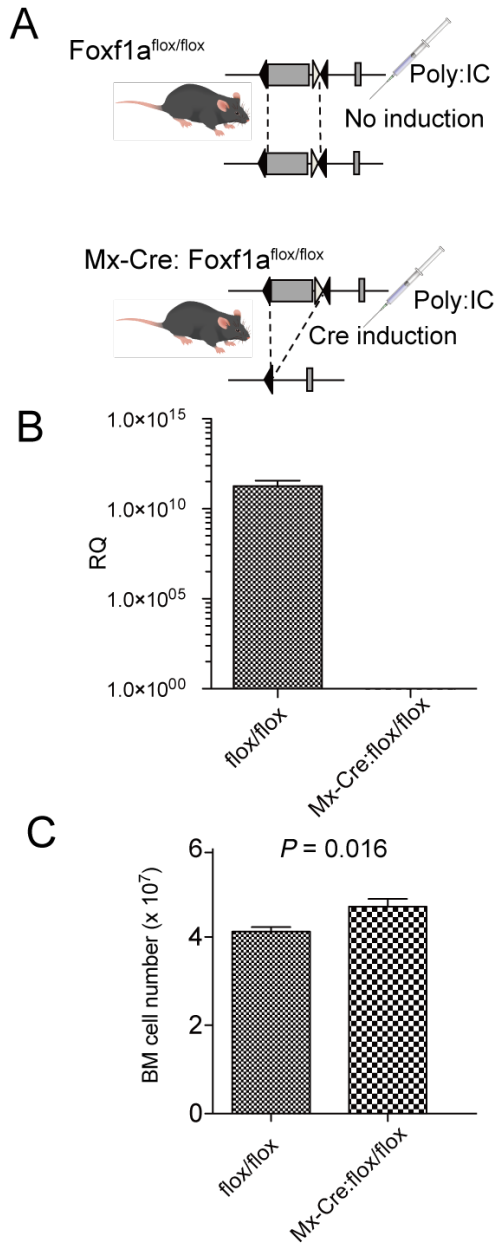


PGK-Neo を除去し, Foxf1a flox マウスを得た。ジェノタイピングにより Foxf1a^{flox/flox} を確認した (図 2C)。

図 2 Foxf1a^{flox/flox} マウスの作製

(A) ターゲティングベクターの構造と Foxf1a 遺伝子。(B) 相同組換えが生じた ES 細胞のサザン解析, 左から 3' プローブ, 5' プローブ, Neo プローブの順。(C) Flpe 交配後の PCR による遺伝子解析。ワイルド (+/+), ヘテロ (Flox/+), ホモ (Flox/flox) の順。

4) Mx-Cre マウスとの交配: 造血幹細胞の機能を観察するために polyI:C で Cre が誘導が可能な Mx-Cre マウスと交配を行った. polyI:C 300 µg をマウスに腹注し, Cre を誘導させた (図 3A). polyI:C 投与後に HSC (造血幹細胞領域) の Foxf1a の低下を確認した (図 3B). マウスの白血球数, 赤血球数, 血

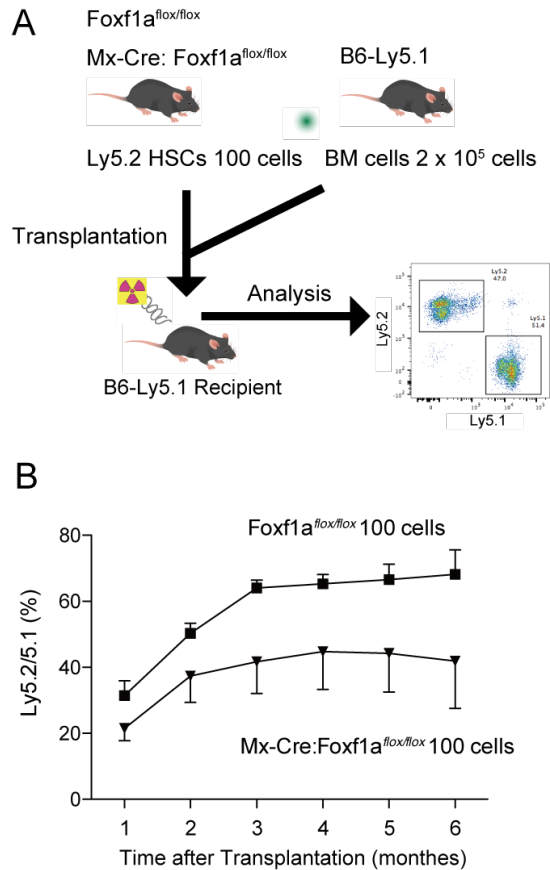


小板に変化を認めなかったが, 骨髄中の有核細胞数は有意に増加した (図 3C).

図 3 Foxf1a^{flox/flox} マウスの解析

(A) PolyI:C 投与により Foxf1a の exon 1 が除去される. (B) polyI:C 投与後に HSC 領域の mRNA 発現を Foxf1a^{flox/flox} と Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} で比較した. Foxf1a mRNA の発現低下を認めた. (C) 骨髄有核細胞 (両下肢, 下腿骨髄) 数を測定した. 有意に Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} で骨髄有核細胞数が増加した.

5) 造血構築能の解析: Foxf1a^{flox/flox} と Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウスより, フローサイトメトリーで HSC 領域を分離した (Ly5.2 細胞). 100 個の HSC を Ly5.1 マウスの骨髄細胞 2 × 10⁵ 細胞と同時に, 放射線照射を行ったマウスに投与し, 競合的骨髄移植を行った (図 4A). 造血構築能は有意にマウス由来骨髄で低下した (P = 0.0037) (図 4B). 長期観察に



においても, 造血器悪性腫瘍の発現は認めなかった.

図 4 競合的骨髄移植

(A) Foxf1a^{flox/flox} と Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウスより, フローサイトメトリーで HSC 領域を 100 個分離 (Ly5.2) し, Ly5.1 マウス由来の骨髄細胞 2 × 10⁵ 細胞と同時に放射線照射 (9.5Gy) を行ったマウスに投与した. 移植後の造血構築能は末梢血の Ly5.1 と Ly5.2 の比率で評価した. (B) 移植後の末梢血 Ly5.2 細胞の割合. Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウス由来 HSC の造血構築能が低下した (P = 0.0037).

5) Long-term culture initiating cell (LTC-IC) の割合: Foxf1a^{flox/flox} と Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウスより HSC を分離し, フィーダー細胞上で, 100, 50, 25, 10, 5 細胞の 4 週間培養を行い, その後のコロニー形成能を評価した. 12 well 中のコロニー形成能の割合をプロットした (図 5). Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} では, LTC-IC 細胞の割合が減少した.

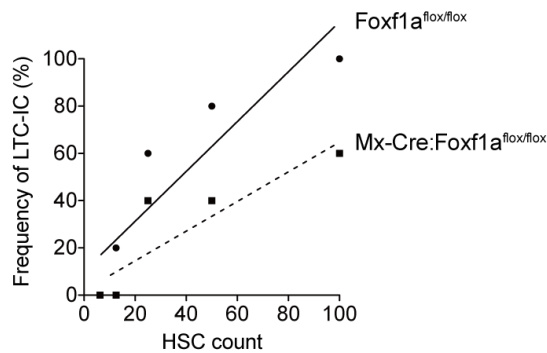


図5 LTC-ICの割合
種々の細胞数のHSCをフィーダー上で培養し
LTC-ICの割合を求めた。

6) 細胞周期解析：造血幹細胞領域における細胞周期を評価した。Foxf1a^{flox/flox} と Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウスに BrdU 投与後を行い、12時間後にサクリフェイスし、骨髓を分離した。造血幹細胞領域の細胞周期をフローサイトメトリーで測定した。Mx-Cre:Foxf1a^{flox/flox} マウスでは、造血幹細胞領域のS期の割合が有意に増加した(表2)。

表2 造血幹細胞 細胞周期解析

		Mean ± SD	P
G0/G1	Foxf1a ^{flox/flox}	62.35±6.60%	-
	Mx-Cre: Foxf1a ^{flox/flox}	66.66±8.10%	0.355
S	Foxf1a ^{flox/flox}	16.68±1.64%	-
	Mx-Cre: Foxf1a ^{flox/flox}	19.78±2.21%	0.025*
G2/M	Foxf1a ^{flox/flox}	15.82±4.62%	-
	Mx-Cre: Foxf1a ^{flox/flox}	8.328±5.11%	0.042*

*P < 0.05 (Student's t-test).

7) 結論
Foxf1a^{flox/flox} マウスを作製し、造血幹細胞の機能評価を行った。Foxf1a 欠損造血幹細胞は造血構築能、LTC-ICの低下を認め、細胞周期ではS期細胞の増加を認めた。一方、骨髓中の有核細胞数は増加した。以上より、Foxf1a は造血幹細胞を静止期に保ち、そのQuiescentを制御している因子であることが示唆された。一方、細胞周期に影響を及ぼしているメカニズムは、現段階では不明であり、今後は下流分子の解析を進め、さらにFoxf1aの機能を解析していきたい。

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 6 件)

- 1) Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Nishimura S. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia, J Thrombosis and Haemostasis. 2015;13:S133-S142.
- 2) Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, Italiano JE Jr, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K, Nagai R. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. J Cell Biol. 2015; 11;209:453-66.
- 3) Nishimura S, Nagasaki M, Okudaira S, Aoki J, Ohmori T, Ohkawa R, Nakamura K, Igarashi K, Yamashita H, Eto K, Uno K, Hayashi N, Kadowaki T, Komuro I, Yatomi Y, Nagai R. ENPP2 contributes to adipose tissue expansion in diet-induced obesity. Diabetes 2014;63:4154-4164.
- 4) Sakata A, Ohmori T, Nishimura S, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. Thrombosis J. 2014;12:1.
- 5) Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids in reduced in young Japanese individuals. J Med Virol. 2014;86:1990-1997.
- 6) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. Haemophilia . 2014;20:e40-44.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Ohmori T. ;CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing using an AAV8 Vector Improves Hemostasis in a Mouse Model of Hemophilia B in vivo, The 25thUS-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Maryland, Mar 9, 2017.
- 2) 大森 司、西村 智、富永 眞一、Forkhead box 転写因子 Foxf1a は血小板インテグリンの発現・機能に関与しない平成 28 年度 日本生化学会関東支部例会、栃木、2016 年 6 月 11 日
- 3) 大森 司：血友病遺伝子治療の現状と展望、平成 28 年度日本生化学会関東支部例会 ミニシンポジウム 遺伝子治療 UP TO DATE, 2016 年 6 月 11 日、栃木
- 4)

- 5) 大森 司:血友病遺伝子治療の現状と展望,第38回 日本血栓止血学会学術集会教育講演,2016年6月17日,奈良
- 6) 大森 司:ひとめでわかる凝固カスケードの仕組み~日常診療で抗血栓薬を理解して使用するために~第237回日本循環器学会関東甲信越地方会,東京,2015年9月26日.
- 7) 大森 司:血小板機能異常症の病態と診断へのアプローチ,第16回日本検査血液学会学術集会,名古屋,2015年7月11-12日
- 8) Ohmori T.: New approaches to gene and cell therapy for hemophilia, The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (State of the Art Symposium), Tronto, Jun 20-25, 2015
- 9) 大森 司,水上 浩明,片貝 祐子,坂田 飛鳥,小澤 敬也,坂田 洋一,西村 智:血友病Aに対するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発 第37回 日本血栓止血学会学術集会,山梨,2015年5月21-23日.
- 10) 大森 司:ITPの病態とITP治療におけるTPO受容体作動薬の役割.第36回日本血栓止血学会学術集会,大阪,2014年5月30日

[図書](計 14 件)

- 1) 大森 司.血小板機能異常症, *In*:小澤敬也,中尾眞二,松村 到 編,【血液疾患最新の治療 2017-2019】,東京,株式会社南江堂,(印刷中).
- 2) 大森 司. Ashwell-Morell受容体を介した血小板数調節メカニズム, *In*:高久史麿,小澤敬也,金倉譲,小島勢二,矢富裕 編,Annual Review 血液 2016,東京,中外医学社, p162-168.
- 3) 大森 司.出血傾向. *In*:矢崎義雄 総編集,【内科学 第11版】,東京,朝倉書店,(印刷中).
- 4) 大森 司.播種性血管内凝固症候群. *In*:山口徹,北原光夫 編,【今日の治療指針 2016】,東京,医学書院, p724-726.
- 5) 大森 司.先天性出血病の遺伝子・細胞治療, *In*:一瀬白帝,丸山征郎,家子正浩 編,新・血栓止血血管学,京都,金芳堂,2015, p91-98.
- 6) 大森 司.血友病治療の進歩-遺伝子治療と薬物療法, *In*:高久史麿,小澤敬也,坂田洋一,金倉譲,小島勢二 編,Annual Review 血液 2015,東京,中外医学社, p262-269.
- 7) 大森 司. von Willebrand病に対する治療, *In*:金倉 譲,木崎昌弘,鈴木律郎,神田善伸 編,【EBM 血液疾患の治療】,東京,中外医学社,2014, p419-421.
- 8) 大森 司.先天性血小板減少症・機能異常症, *In*:日本血液学会 編,【血液専門医テキスト】,東京,南江堂,2015, p393-395.
- 9) 大森 司.抗血小板薬, *In*:金倉譲 編,プリンシプル血液疾患の臨床,東京,中山書店,2014, p206-215.
- 10) 大森 司.静脈血栓症に果たす血小板の役割, *In*:高久史麿,小澤敬也,坂田洋一,金倉譲,小島勢二 編,Annual Review 血液 2014,東京,中外医学社,2014, p 198-203.
- 11) 大森 司.播種性血管内凝固症候群(DIC), *In*:金澤一郎,永井良三 編,【今日の診断指針 第7版】,東京,医学書院 2015, p1165-1168.
- 12) 大森 司.止血機構, *In*:木崎 昌弘 編,【カラーテキスト血液病学】,東京,株式会社中外医学社, p18-23.
- 13) 大森 司.血小板機能検査・凝固線溶系検査, *In*:木崎 昌弘 編【カラーテキスト血液病学】,東京,株式会社中外医学社, p163-166.

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:肝臓ゲノム上の凝固関連因子遺伝子を破壊するためのAAVベクター
 発明者:大森 司、長尾恭光、水上浩明、坂田 飛鳥、小澤敬也、村松慎一、富永眞一、花園豊、西村 智、坂田洋一
 権利者:学校法人自治医科大学
 種類:物の発明
 番号:特願2017-004198
 出願年月日:平成29年1月13日
 国内外の別:国内

○取得状況(計 0 件)

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 大森 司 (OHMORI, Tsukasa)
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号:70382843
 - (2) 研究分担者
 西村 智 (NISHIMURA, Satoshi)
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号:80456136
 - (3) 連携研究者
 該当なし
 - (4) 研究協力者
 該当なし