

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15日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790895

研究課題名（和文） エリスロポエチン遺伝子および赤血球造血における低酸素応答機構の研究

研究課題名（英文） The analysis of the hypoxia-induced regulation mechanism in erythropoietin gene expression and erythrocytosis.

研究代表者

小原 直（OBARA NAOSHI）

筑波大学・医療医学系・講師

研究者番号：70422178

研究成果の概要（和文）：

近年、骨髄ストローマ細胞の中に神経幹細胞のマーカーである Nestin を発現している細胞が存在し、造血に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。そこで、Notch シグナルの下流遺伝子である RBP-J コンディショナルノックアウトマウスとのかけあわせを行い、解析した。RBP-J を Nestin 発現細胞でノックアウトすると、ホモノックアウト胎児は胎生後期に高度の貧血を呈し、赤芽球の分化が障害され、胎児肝におけるエリスロポエチンの発現が著明に低下していた。胎児肝のエリスロポエチン産生細胞は Nestin を発現し、Notch シグナルが重要である可能性がある。また胎児肝のストローマ細胞は血球分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, the possibility has been suggested that there are bone marrow stromal cells expressing Nestin genes which are neural stem cell markers and that those cells play an important role in hematopoiesis. Therefore, we crossbred RBP-J conditional-knockout mice - RBP-J are downstream genes of Notch signaling-and NestinCre mice and analyzed the hematopoiesis of those mice with which Nestin-expressing-cell-specific RBP-J signaling was knocked out. The fetuses of the knockout mice suffered from severe anemia during embryonic stage, the differentiation of their erythroblasts was impaired and the onset of erythropoietin was significantly lowered. The erythropoietin productive cells of fetal livers developed Nestin and it was suggested that stromal cells of fetal livers may be important to hematopoietic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：血液内科学

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：Notch シグナル、Nestin、エリスロポエチン、造血不全、ストローマ細胞、赤血球造血

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己複製能および各血球への多分化能をあわせもち、細胞膜に Notch を発現している。骨髄の骨芽細胞では Notch リガンドが発現しており、リガンドによって造血幹細胞上の Notch 受容体が活性化され、分化抑制と自己複製に関与していると考えられている。

また、造血幹細胞は常に低酸素状態にあると考えられており、この低酸素状態および低酸素応答に重要な HIF-1 α が未分化性維持に寄与していると考えられている (Dev Cell 9:617, 2005)。最近の報告では低酸素による未分化性の維持が Notch の発現を抑制することで低下するとされている。一方、神経幹細胞において低酸素で安定化した HIF-1 α が Notch の細胞内ドメインと結合し、その安定性を高め、下流遺伝子の発現を促進していることが最近の報告で示唆された (Develop. Cell 9:617, 2005)。血管内皮は HIF の重要性が比較的明らかになっている組織であるが、Notch は血管内皮細胞・造血幹細胞の双方に発現している。この HIF と Notch の相互作用は造血幹細胞の未分化性の維持や血管内皮細胞の分化抑制などに極めて重要である可能性があるが、これらについてはほとんど解析されていないのが実情である。

2. 研究の目的

Notch は細胞の分化・増殖の運命を決定する細胞膜糖蛋白質として必須な分子である。また、生体の低酸素応答を仲介して造血・代謝・血管新生にかかわる転写因子として HIF (Hypoxia Inducible Factor) がある。近年、造血幹細胞の維持に低酸素環境の重要性が報告されており、一方で Notch と HIF の相互作用を示唆する報告もなされているが詳細は明らかではない。本研究では造血幹細胞と血管内皮細胞における Notch と HIF の相互作用の解明することで幹細胞の *ex vivo* 増幅や抗悪性腫瘍効果などの臨床応用への足がかりを構築する。特に造血幹細胞と血管内皮細胞に注目し、幹細胞の未分化性の維持・血管新生の制御機構およびシグナル伝達のネットワークについて包括的に解析していく。HIF については現在まで解析が進んでいる HIF-1 α のみならず、最近その重要性が明らかになりつつある HIF-2 α についても解析を進めていく。さらに、臨床応用への足がかりとして Notch-HIF シグナルを介した抗腫瘍効果について培養細胞およびマウスを用いて検

証する。

Epo 遺伝子などの低酸素応答遺伝子に重要な HIF 転写因子と Notch シグナルの関連・相互作用などを Epo 遺伝子発現調節機構と赤血球造血において明らかにする。

3. 研究の方法

Nestin 遺伝子の発現を解析するためにヒトおよび野生型マウスの骨髄検体を用いて免疫染色および RT-PCR 解析を行った。次に様々な造血器疾患の骨髄検体を用いて同様な解析を行った。解析にあたっては学内の倫理委員会の承認を得た後に、患者の同意をも取得した。また、マウスにおける骨髄 Nestin 陽性細胞を同定するために Cre 遺伝子発現細胞において GFP 遺伝子を発現するトランスジェンをもった Z/EG マウスと NestinCre マウスを掛け合わせ、GFP を指標に Nestin 発現細胞の局在の同定を試みた。

Notch シグナルの下流遺伝子である RBP-J コンディショナルノックアウトマウスと Nestin-Cre マウスを掛け合わせ、Nestin 発現細胞で RBP-J をノックアウトさせたマウスを作製した。胎生致死が予想されるので、胎児を解析することとした。解析方法は RT-PCR にて関連遺伝子の発現を行った。また、胎児肝のコロニーアッセイやフローサイト解析を用いて造血細胞の分化、造血幹細胞の増減などの解析を行うこととした。免疫染色では GFP を指標に Nestin 陽性細胞を同定しつつ多重染色を行うことで Nestin 陽性細胞の性質を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

ヒトおよびマウス骨髄検体における Nestin の発現を解析した。解析は免疫染色と RT-PCR を用いて行った。マウスおよびヒトにおける Nestin 遺伝子は RT-PCR にて発現を確認できた。免疫染色を行うと、骨髄中の Nestin 陽性細胞は骨表面に存在するもの、血管周囲に存在するものなどいくつかの種類が存在することが明らかになった。血管周囲の Nestin 発現細胞は CD31, CD34 など血管内皮マーカーを発現しておらず、血管内皮とは異なる細胞であることが明らかになった。

Notch シグナルの下流遺伝子である RBP-J コンディショナルノックアウトマウスとのかけあわせを行い、解析した。RBP-J を Nestin 発現細胞でノックアウトすると、ホモノックアウト胎児は胎生後期に高度の貧血を呈し、赤芽球の分化が障害され、エリスロポエチンの発現が著明に低下していた。胎児肝のエリスロポエチン産生細胞は Nestin を発現し、また胎児肝のストローマ細胞は血球文化に重要である可能性が示唆された。今後は、さ

らにコロニーアッセイ、免疫染色などで確認が必要である。また、成体で解析するために NestiCre-ERT2 マウスを用いた解析も計画している。

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 4 件)

1. Yokoyama Y, Suzukawa K, Okoshi Y, Nanmoku T, Obara N, Enami T, Hasegawa Y, Chiba S. Nine years interval between first and second bone marrow transplantations and subsequent long-term survival-a case of acute myeloid leukemia with MLL-AF6 fusion gene. *Annals of Hematology*, 査読有り, Feb4, 2011

DOI: 10.1007/s00277-012-1417-2

2. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia., *Nature*, 査読有り, 478, 64-69, 2011.

DOI:10.1038/nature10496

3. Suzuki N, Obara N, Pan X, Watanabe M, Jishage K, Minegishi N, Yamamoto M. *Molecular cell biology*, 査読有り, 31, 3896-3905, 2011.

DOI:10.1128/MCB.05463-11

4. Cui S, Kolodziej KE, Obara N, Amaral-Psarris A, Demmers J, Shi L, Engel JD, Grosveld F, Strouboulis J, Tanabe O. *Molecular cell biology*, 査読有り, 31, 3298-3331, 2011.

DOI:10.1128/MCB.05310-11

[学会発表] (計 9 件)

1. Tatsuhiro Sakamoto, Naoshi Obara, Rie Matsubara, Kuniyoshi Fukuda, Mayuko Koshino, Naoski Kurita, Hedekazu Nishikii, Yasuhisa Yokoyama, Mamiko Sakata, Yasuhi Okoshi, Kazumi Suzukawa, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba, Effect and safety of rabbit anti-thymocyte globulin (ATG) for aplastic anemia. 日本血液学会総会, 2011年10月14日、名古屋

2. Yasushi Okoshi, Naoki Kurita, Hidekazu Nishikii, Yasuhisa Yokoyama, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Naoshi Obara,

Kazumi Suzukawa, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba, Outcomes of splenectomy for adult patients with ITP - a single center retrospective analysis. 日本血液学会総会、2011年10月14日、名古屋

3. 福田匡芳、栗田尚樹、坂本竜弘、錦井秀和、横山泰久、坂田-柳元麻実子、小原直、大越靖、鈴川和己、長谷川雄一、千葉滋、静注 Busulfan による前処置後の移植後胃前庭部毛細血管拡張症、日本血液学会総会、2011年10月14日、名古屋

4. 小原直、佐藤晶子、千葉滋、二宮治彦、Detection of CD55- and CD59-negative immature reticulocytes may improves sensitivity/specificity to identify a minor population of PNH-type cells in patients with myelodysplastic syndrome/aplastic anemia、第2回 JSH 国際シンポジウム、2011年4月13日、長崎

5. 越野繭子、大越靖、坂本竜弘、福田匡芳、松原理絵、栗田尚樹、錦井秀和、横山泰久、坂田麻実子、小原直、鈴川和己、長谷川雄一、千葉滋、Adverse effects of intravenous morphine and fentanyl for stomatitis in patients receiving allogeneic HCT a single center retrospective analysis. 日本造血幹細胞移植学会、2011年3月9日、松山

6. 栗田尚樹、大越靖、福田匡芳、松原理絵、坂本竜弘、錦井秀和、横山泰久、坂田麻実子、小原直、鈴川和己、長谷川雄一、千葉滋、静注 Busulfan/Cyclophosphamide を移植前処置に用いた同種造血幹細胞移植 11 例の検討、日本造血幹細胞移植学会、2011年3月9日、松山

7. 松原理絵、小原直、坂本竜弘、福田匡芳、越野繭子、栗田尚樹、錦井秀和、横山泰久、坂田-柳元麻実子、大越靖、鈴川和己、長谷川雄一、千葉滋、Acute panmyelosis with myelofibrosis に対し同種造血幹細胞が有用であった1例、第165回 日本血液学会例会、2011年2月5日、東京

8. Yasunobu Nagata, Masashi Sanada, Kenichi Yoshida, Takeo Nakaya, Aiko Matsubara, Naoshi Obara, Ken Ishiyama Shuichi Miyawaki, Junko Takita, Shigeru Chiba, Lee-Yung Shih, H Phillip Koefler, Seishi Ogawa, Profiling of multiple gene mutations in myelodysplastic syndromes using high-throughput resequencing combined with barcode labeling, The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, 2010. 12. 4-7, Orland, USA

9. Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Yasunobu Nagata, Ryouichiro Kawahata,

Motohiro Kato, Aiko Matsubara, Junko Takita, Hirano Mori, Ken Ishiyama, Takayuki Ishikawa, Shuichi Miyawaki, Naoshi Obara, Shigeru Chiba, Seishi Ogawa, Whole exome analysis of myelodysplastic syndromes using next-generation sequencing technology. The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, 2010. 12. 4-7, Orland, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 直 (OBARA NAOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70422178