

GATA2 によるヒト間葉系幹細胞からの巨核球分化制御機構の解明

宇留賀友佳子

慶應義塾大学医学部 臨床研究推進センター

【研究の背景】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は骨髄、臍帯血や脂肪組織などから採取が可能な組織由来の体性幹細胞の一種であり中胚葉性細胞への分化のみならず、肝細胞や神経細胞への分化も報告されている。我々はこれまでに間葉系幹細胞 (特に脂肪組織由来) が、造血系の中でも特に巨核球分化に必要な遺伝子群 (*p45NF-E2*, *PF4*, *vWF*, *β tublin*, *TPO* など) を内在していることを見出し、これらの細胞を用いた組替えトロンボポエチン (Thrombopoietin; TPO) の添加を必要としない無血清培養系での巨核球/血小板分化誘導に成功した。このメカニズムの一つとして培地中に含まれる Transferrin をリガンドとした CD71 (Transferrin receptor) を介したシグナルにより TPO が細胞外に分泌され、巨核球分化能を有する MSC が巨核球へ分化誘導されることが明らかとなった。巨核球は諸説あるが造血幹細胞から骨髄系共通前駆細胞 (Common myeloid progenitor; CMP) → 巨核球・赤芽球系前駆細胞 (megakaryocyte/erythrocyte progenitor; MEP) を経て分化することが一般的に知られており、MEP からの巨核球、赤芽球へのコミットメントは転写因子の協調によって決定されると考えられている。特に GATA 転写遺伝子群は MEP からの巨核球・赤芽球への分化制御に重要な役割を果たしている。特に GATA2 の強制発現は巨核球分化を促進し、GATA1 欠損マウス ES 細胞を用いた検討では GATA1 欠損下においては GATA2 が巨核球の分化・維持、細胞増殖に重要な働きをしていることが示されている。

我々の検討では間葉系幹細胞である脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose tissue derived mesenchymal stromal/stem cells; ASC) は GATA1 遺伝子を有しておらず、一方で GATA2 の遺伝子発現を優位に認め、ASC における巨核球分化制御機構に GATA2 が中心的な役割を果たす可能性が示唆された。

【目 的】

MSC からの巨核球分化に際し、MSC (特 ASC) の有する巨核球分化関連の転写因子群の分化過程における発現変化を確認しているが、それぞれの発現調節や中心となる因子などその制御機構については不明点が多い。造血幹細胞や ES 細胞からの巨核球分化において、GATA2 が分化・維持、細胞増殖に重要な働きをしていることが示されていることに着目し、本研究では MSC からの巨核球分化調節機構における GATA2 の役割を解明することを目的とする。

【方 法】

1) MSC (特に ASC) からの巨核球分化誘導における各血球分化関連遺伝子の経時変化の検討

ヒト皮下脂肪組織から SVF を分離し、その後付着細胞を継代することで ASC を得る。ASC については国際細胞治療学会の規定する MSC の表面抗原である CD105, CD73, CD90 の発現の確認とともに、CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19, HLA-DR が発現しないことを確認する。

ASC を組替えトロンボポエチン不含、トランスフェリン含有の無血清培地を用いて巨核球への分化誘導を開始する。分化誘導開始後、経時的に巨核球サイズの細胞を回収し、巨核球に発現する細胞表面抗原である CD41, 42b の発現を確認する。また、分化誘導開始前/後に経時的に細胞回収、RNA 抽出を行い、血球分化関連遺伝子群である、GATA1, GATA2, p45NF-E2, PF4, KLF1, SPI1, FLI1, RUNX1 の発現変化を検討する。

2) MSC (特に ASC) からの巨核球分化誘導における GATA2 の役割の検討

ASC に対し GATA2 のノックダウンを行う。ノックダウンした細胞は上記で用いた巨核球への分化誘導培地中で培養を行う。

分化誘導後に細胞を経時的に回収し、巨核球サイズの細胞を得る。これらの細胞に対し巨核球に発現する細胞表面抗原である CD41, 42b の発現を確認する。また、分化誘導開始前/後に経時的に細胞回収、RNA 抽出を行い、GATA2 の発現確認によるノックダウン比率の検討及び巨核球/血小板分化関連遺伝子である p45NF-E2, TUBB1 など発現を確認し、GATA2 抑制による巨核球/血小板分化能への影響を検討する。巨核球血小板産生への影響が認められない場合(ノックダウン群と誘導効率が変わらなかった場合)には産生された血小板について CD62P 及び PAC-1 の発現比較、Fibrinogen binding ability の検討を行い、機能解析を行う。

【結 果】

1) MSC (特に ASC)からの巨核球分化誘導における各血球分化関連遺伝子の経時変化の検討

脂肪組織から樹立した ASC は数回継代を経たものを使用し、CD105, CD73, CD90 陽性, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, HLA-DR 陰性であることを確認した。分化誘導開始後、Day4, 7, 14 で CD41, 42b の発現を確認し、経時的な発現細胞の増加を認めた。血球分化関連遺伝子群の発現検討では、GATA1 の発現は認めず、GATA2, p45NF-E2, FLI1, RUNX1 といった巨核球血小板関連遺伝子群の発現変化を認めた。一方で KLF1 や SPI1 といった他血球関連遺伝子群の発現は認められず、組替えトロンボポエチン不含、トランスフェリン含有の無血清培地では巨核球血小板への分化能のみを有する可能性が明らかとなった。

2) MSC (特に ASC)からの巨核球分化誘導における GATA2 の役割の検討

GATA2 をノックダウンした脂肪組織由来間葉系幹細胞に対し、無血清分化誘導培地を用いた巨核球分化能を評価した。細胞表面抗原マーカーはコントロール群に比し、ノックダウン群にて CD41, CD42 の発現低下を認めた。また、遺伝子発現解析では、p45NF-E2, TUBB1 の発現がコントロール群に比しノックダウン群では低下していた。これらの結果から、ASC からの巨核球分化誘導は GATA2 ノックダウンにより抑制される可能性が示唆された。

【考 察】

間葉系幹細胞からの巨核球/血小板産生について、GATA2 発現低下により巨核球分化が抑制されたことから、GATA2 が巨核球分化を決定する重要因子である可能性が考えられた。今後は、これらの知見を発展させ GATA2 発現低下細胞群の詳細な発現解析を通じ巨核球と間葉系幹細胞のスイッチ機構について検討を行う。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

MSC からの巨核球、血小板としての性質を有した細胞への分化/産生は不明点が多い。巨核球のみへの分化誘導能を有する可能性がある MSC の特有の性質に着目し、GATA2 を中心とした MSC における脂肪/巨核球スイッチ機序の解明を今後も継続したいと考えている。得られた知見は GATA 遺伝子関連の造血異常や、骨髄不全症候群に対する新規治療法開発のためのツールとなりうる可能性があり、詳細な解析によって得られた情報をもとに新規治療法の開発を目指していきたい。

【参考・引用文献】

1. Ono-Uruga Y, Tozawa K, Horiuchi T, Murata M, Okamoto S, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin Journal of Thrombosis and Haemostasis, 14: 1285-1297