

ヒト巨核球多倍体化過程における 細胞周期制御蛋白の解析

課題番号 10670970

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）研究成果報告書



平成 12 年 3 月

研究代表者 寺村正尚

東京女子医科大学医学部講師



ヒト巨核球多倍体化過程における 細胞周期制御蛋白の解析

課題番号 10670970

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 寺村正尚
東京女子医科大学医学部講師

研究組織

研究代表者 : 寺村正尚 (東京女子医科大学医学部講師)

研究分担者 : 小林祥子 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成 10 年度 1,600 千円

平成 11 年度 1,400 千円

計 3,000 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1) Kobayashi S, Teramura M, Ito K, Iwabe K, Inaba T, Mizoguchi H: Transcription factor NF-E2 is essential for the polyploidization of a human megakaryoblastic cell line, Meg-J. *Biochem Biophys Res Commun* 247:65-69, 1998

2) Iwabe K, Teramura M, Yoshinaga K, Kobayashi S, Hoshikawa Y, Maeda T, Hatakeyama M, Mizoguchi H: K-252a-induced polyploidization and differentiation of a human megakaryocytic cell line, Meg-J: transient elevation and subsequent suppression of cyclin B1 and cdc2 expression in the process of polyploidization. *Br J Haematol* 102:812-819, 1998

3) Shiotsu Y, Akinaga S, Yamashita K, Murakata C, Tamaoki T, Ishida Y, Kuriya S, Teramura M, Mizoguchi H: In vitro and in vivo effects of KT6352, a derivative of indolocalbazole compounds, on murine

megakaryocytopoiesis. Exp Hematol 26:1195-1201,1998

(2) 口頭発表

1) 吉永健太郎、岩部弘治、寺村正尚、溝口秀昭：トロンボポエチンの巨核球系細胞への作用とシグナル伝達についての検討. 東京女子医科大学雑誌 68: 426-427, 1998

2) 寺村正尚、吉永健太郎、岩部弘治、溝口秀昭: c-Mpl リガンドの巨核球産生に対する作用. 東京女子医科大学雑誌 68:424 :1998

3) 小林祥子、寺村正尚、伊藤慶子、吉永健太郎、岩部弘治、溝口秀昭：巨核球系細胞の成熟過程における転写因子の検討. 東京女子医科大学雑誌 68:432-433,1998

4) 山下錦也、塩津行正、金井文彦、生稲洋二、村形力、秋永士朗、玉沖達也、寺村正尚、溝口秀昭：ACNU 誘導血小板減少モデルに対する Carbazole 系化合物 KF41399 の作用(1) Int J Hematol, 69(Suppl.1):188 ,1999

5) 塩津行正、山下錦也、金井文彦、生稲洋二、村形力、秋永士朗、玉沖達也、吉永健太郎、岩部弘治、寺村正尚、溝口秀昭：ACNU 誘導血小板減少モデルに対する Carbazole 系化合物 KF41399 の作用(2). Int J Hematol, 69(Suppl.1):188, 1999

6) 小林祥子、寺村正尚、伊藤慶子、岩部弘治、吉永健太郎、溝口秀昭, 巨核球系細胞における NF-E2 の関与. Int J Hematol. 69(suppl.1) : 118,1999

(2) 出版物

1) 寺村正尚：インターロイキン-11 KEY WORD 1998-2000 血液 溝口秀昭ほか編 先端医学社 P34-35,1998

2) 寺村正尚、溝口秀昭：エリスロポエチン 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 57:386-388,1999

3) 寺村正尚：血小板増多症 外来診療のすべて(改訂第2版) メジカルビュー社,東京,250-251,1999

4) 寺村正尚：血小板減少症 外来診療のすべて(改訂第2版) メジカルビ

ュー社, 東京 252-253, 1999

5) 寺村正尚, 溝口秀昭: 貧血・赤血球系 認定医・専門医のための内科学レビュー' 99、総合医学社、東京 170-173、1999

研究成果

以下のとおり

はじめに

1994年、トロンボポエチン (TPO、c-Mpl リガンド) がクローニングされた、TPO 欠損マウスにおいては血小板数が正常の 15% に減少することから、TPO は血小板減少時の血小板産生のみでなく、恒常的な血小板産生においても不可欠な因子であることが明らかにされている。TPO の発見により血小板産生の刺激因子については、ほぼ解明されたと考えられる。しかし、巨核球を増殖、成熟させるシグナル伝達機構、巨核球多倍体化の機序、血小板の放出機構などについては明らかになっていない。本研究は、これらの巨核球-血小板産生機構のうち、特に TPO による巨核球の多倍体化機序を解明することを目的とする。巨核球は TPO の刺激により多倍体化し巨大な細胞になることにより、効率的に血小板を産生すると考えられる。TPO が他のサイトカインと異なり、どのような機序で巨核球を多倍体化させるのかについては興味深い点であるが、現在のところその機序は全く不明である。我々は、巨核球の多倍体化機構は細胞周期関連蛋白、とくに G₂/M 期に関連した cdc2 キナーゼ、wee1 キナーゼ、cdc25b、CDC25c、サイクリン B1 などの蛋白が変化し、M 期を完遂することなく G₁/S 期へ移行するという現象がおきた結果であると考え、研究を進めている。まず、我々は骨髄中に極めて少数しか存在しない巨核球の多倍体化機構の解析を進めるためには、巨核球の多倍体化および

成熟のモデル系を確立することが必要と考え、そのモデル系の作成に取り組んだ。その結果、我々が樹立したヒト巨核芽球性白血病細胞株 (Meg-J) に TPO と K252a を添加することにより、モデル系の確立に成功した。そこで、このモデル系を用いて多倍体化過程に関与する細胞周期関連蛋白や転写因子などについて解析を進めている。さらに、このモデル系により得られた結果に基づいて、正常ヒト巨核球を用いた検討を行い、正常ヒト巨核球の多倍体化の機序を解明したいと考えている。近い将来、TPO が臨床の場で用いられるようになると思われ、その標的細胞である巨核球の分化機構を解明することは重要であると考えられる。

(1) ヒト巨核球の多倍体化の実験モデル系を用いた細胞周期制御蛋白の解析

1) 方法および材料

1. 試薬

ヒト遺伝子組み替え型トロンボポエチン(TPO)はキリンビール(高崎)より供与された。K-252a(フナコシ)は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解後、20°C にて暗所で保存した。Propidium iodide(PI)は Sigma 社より購入した。血小板糖蛋白(glycoprotein : GP)IIb/IIIa 及び GPIb に対する FITC 標識モノクローナル抗体はイムノテック社製を用いた。cyclin B1 に対するモノクローナル抗体はファーミンジェン社製を、cdc2 と 15 番目のチロシン残基がリン酸化された cdc2 に対するモノクローナル抗体はニューイングランドバイオラブ社製を用いた。

2. 細胞株および培養法

ヒト巨核球性白血病細胞株である Meg-J 細胞は慢性骨髄性白血病急性転化患者の末梢血より樹立した。Meg-J 細胞は 10%ウシ胎児血清(FCS)転化 RPMI 1640 培地(GIBCO 社)を用いて培養した。

3. DNA 量定量、表面抗原の解析

巨核球の形質も持つ Meg-J 細胞を K-252a (0.3 μ M) 単独もしくは TPO(10ng/ml)を同時添加して、液体培養し、Ploidy の変化および巨核球の分化抗原である GPIIb/IIIa, GPIb の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 寒天培地上での形態変化

Meg-J 細胞を K-252a (0.3 μ M) 単独もしくは TPO(10ng/ml)を同時添加して、寒天培地で培養し、形態の変化を調べた。

5. Western blotting, Kinase assay

Meg-J 細胞をヒドロキシウレア存在下で 15 時間培養し、early S 期に同調させた。その後、同調を解除して 10%FCS 含有 RPMI1640 培地で液体培養し、12 時間、18 時間、24 時間、36 時間後に経時的に細胞を harvest し、それらからタンパクを抽出した。また、同調を解除すると同時に K-252a (0.5 μ M) を添加して 10%FCS 含有 RPMI1640 培地で液体培養し、12 時間、18 時間、24 時間、36 時間後経時的に細胞を harvest し、それらからタンパクを抽出した。これらを用いて M 期の進行に必須であると考えられている細胞周期関連タンパク cyclin B1 及び cdc2 の発現の経時的な変化をウエスタンブロッティング法にて解析した。同時に免疫沈降法によって cdc2 キナーゼ活性の経時的な変化についても検討を行った。

2) 結果

1. K-252a および TPO の Meg-J 細胞に対する作用

Meg-J 細胞に K-252a を添加して培養すると細胞の増殖は阻害され、細胞は大型化すると同時に多倍体化が認められた。また、これら多倍体化した細胞の核は多核ではなく単核であり、成熟し、多倍体化した正常のヒト巨核球と形態的に類似していた。生理的な因子である TPO はこの多倍体化を促進し、K-252a と TPO を同時添加して 5 日間液体培養すると 18.8%の細胞が 32N 以上の ploidy を有していた。これらの細胞では巨核球の分化抗原である

GPIIb/IIIa 及び GPIb の発現の増加が認められた。また、K-252a を Meg-J 細胞に添加して寒天培地で培養すると pseudopodia 様の突起形成が認められ、TPO を同時添加すると、pseudopodia 様の突起は分枝してより複雑になり、また、proplatelet formation も認められるようになった(図 1)。なお、K-252a は CMK、MEG-01、UT-7、HEL や K562 などの Meg-J 以外の巨核芽球性白血球細胞株や巨核球の形質を持つ細胞株についても多倍体化を誘導し、巨核球の分化抗原である GPIIb/IIIa および GPIb の発現の増加を増加させた。

2. 巨核球多倍体化の過程における細胞分裂関連蛋白、キナーゼの発現の変化

Meg-J 細胞はヒドロキシウレアを添加して培養することにより、約 90%の細胞が、early S 期に同調する。同調解除 12 時間後には K-252a を添加して培養した細胞および無添加で培養した細胞はその多くが 8N の ploidy を持つ細胞であった(図 2-A)。ここで、我々は両細胞群で、M 期の進行に必須であると考えられている cyclin B1、cdc2 の発現および cdc2 キナーゼ活性の変化を調べた。すでに明らかにされているように、cyclin B1 と cdc2 は S 期から M 期にかけて複合体を形成し、161 番目のスレオニン残基が CAK によってリン酸化された後、14 番目のスレオニン残基、15 番目のチロシン残基が順次脱リン酸化され、活性型の cdc2 キナーゼとなる。なお、これらのリン酸化の状態の異なった cdc2 は、cdc2 キナーゼに対する抗体を用いたウエスタンブローティング法でやや長めに泳動を行うことにより、泳動度の差として表すことが出来る [図 2-B-b]。つまり、泳動度の最も遅いバンド(S)は 14 番目のスレオニン残基と 15 番目のチロシン残基の両者がまだ脱リン酸化されていないものを、真ん中のバンド(I)は 14 番目のスレオニン残基のみが脱リン酸化されたもの、そして最も泳動度の速いもの(F)は、14 番目のスレオニン残基、15 番目のチロシン残基の両者が脱リン酸化されたものを表している。ちなみに、15 番目のチロシン残基がリン酸化された cdc2 に対する抗体を用いて cdc2 の場合と同様に泳動すると、最も泳動度の速いバンドがほとんど消失して見える [図 2-B-c]。これらと、cyclin B1 の抗体を用いたウエスタンブローティング [図 2-B-a] およびヒストン H1 を基質とし

た cdc2 キナーゼアッセイの結果 (図 2-C) から、両群の細胞に cyclin B1、cdc2 の高発現および cdc2 キナーゼ活性の上昇が同調解除 12 時間後に一過性に認められた。K-252a を添加して培養した細胞群ではこれらのバンドのうち、最も泳動度の遅い泳動度を示す cdc2 の発現、つまり、新しく産生される cdc2 が、無添加の細胞群に比べて減少していた。K-252a 無添加の細胞は、同調解除 18 時間後にはほぼ正常な ploidy の分布に戻ったが、K-252a を添加して培養した細胞の ploidy の分布は同調解除 18 時間後、24 時間後、36 時間後で同調解除 12 時間後の状態とほとんど変わらない ploidy の分布を示し、8N の細胞が分裂せず、arrest していることが示唆された。この細胞群では cyclin B1 および cdc2 の発現は 12 時間後をピークに急速に減少し、24 時間後、36 時間後には K-252a 無添加の細胞群と比べても極めて少量しか検出されなかった。特に cdc2 の最も遅い泳動度を示すバンドは、24 時間後にはほとんど消失していた。cyclin B1、cdc2 の発現および cdc2 キナーゼ活性のが十分に低下した後の同調解除 48 時間後には、これらの arrest した細胞の中から、16N の ploidy を持つ多倍体化した細胞が出現した。

3) 考察

K-252a は巨核芽球性白血病細胞株 Meg-J 細胞に分化と多倍体化を誘導した。多倍体化した細胞は多核ではなく、単核であり、これは正常の多倍体化した巨核球と形態的に類似しており、K-252a は巨核球に対して生理的な多倍体化を誘導する作用があるものと考えられた。また、K-252a を添加して寒天培地で培養すると、細胞は大型化するだけでなく、pseudopodia や proplatelet formation が認められるなど、巨核球系への分化成熟が認められた。なお、K-252a は、急性骨髄性白血病細胞株 HL 60 細胞や、急性リンパ性白血病細胞株 MOLT 4 細胞などの他の系統の血球系細胞には、明らかな多倍体化を誘導しなかった。以上のことから、K-252a は血球系細胞の中でも特に巨核球に特異的に多倍体化を伴う分化を誘導するものと考えられた。

次に我々はこれらの細胞が多倍体化する際の mitotic cyclin である cyclin B1 や、cdc2 の発現の変化、cdc2 キナーゼ活性の変化について調べた。cdc2 キナーゼは M 期への進入に必須であると考えられている。ここで

我々は、K-252a によって分裂せずに多倍体化する細胞においても一過性に cyclin B1、cdc2 の発現、および cdc2 キナーゼ活性の上昇が起こることを見いだした。つまり、これらの細胞では、cdc2 キナーゼの活性が上昇し、細胞は M 期に進入できるにもかかわらず、M 期の最終過程である細胞質分裂を完了しないまま、次の DNA 合成を行うということになる。cdc2 キナーゼは、14 番目のスレオニン残基と 15 番目のチロシン残基が脱リン酸化されることによって活性化されるが、それは次のような 2 つのステップからなっていることが報告されている。まず初めに 14 番目のスレオニン残基が脱リン酸化され、続いて 15 番目のチロシン残基が脱リン酸化される。そして 14 番目のスレオニン残基が脱リン酸化され、15 番目のチロシン残基が脱リン酸化されていない cdc2 は十分な cdc2 キナーゼとしての活性を持つという。我々が樹立した巨核球多倍体化の系においては、多倍体化した細胞は、15 番目のチロシン残基が脱リン酸化を受けていない形の cdc2 キナーゼ、特に 14 番目のスレオニン残基もまだ脱リン酸化を受けていない形の cdc2 キナーゼの発現が速やかに認められなくなり、また、cyclin B1 の発現も著しく減少した。これは、これらの細胞では新たな cdc2 そして cyclin B1 の産生が行われなくなると同時に、経時的に分解された結果、12 時間後をピークにこれらの発現が急速に減少したものと考えられる。多倍体化は、これらの発現が極めて低下してから起こっていることから、cyclin B1 および cdc2 の一過性の上昇と、それに続く急速な低下が巨核球の多倍体化に重要な役割を果たしているものと考えられた。巨核球の多倍体化過程における cyclin B1、cdc2 および cdc2 キナーゼの変動については、TPA を用いた系において、cyclin B1 と cdc2 の発現には変化が認められないものの、cdc2 キナーゼ活性は欠如しており、それは cdc25C のダウンレギュレーションによるものであるという報告がある。また、Sch.pombe の系において、cdc13(cyclin B1)の発現の低下が多倍体化の原因であるとの報告や、やはり Sch.pombe の系において cdc2 のインヒビターである rum1 が過剰発現することが多倍体化の原因であるとする報告もある。しかし、我々の得た結果では、cyclin B1、cdc2 の発現および cdc2 キナーゼ活性のすべてに一過性の上昇が認められた。最近になって、正常の巨核球が多倍体化する際にもやはり一過性に cyclin B1、cdc2

の発現、および cdc2 キナーゼ活性の上昇が起こり、細胞は M 期に入るものの、M 期を完全には完了しないまま次の DNA 合成が行われるらしいという知見が集積しつつある。これらのことから、K-252a によって誘導される巨核球の多倍体化は、M 期の進行に必須とされる細胞周期関連タンパクの多倍体化に際しての変動という点からも、正常の巨核球の多倍体化に近い、生理的なものであるということが出来る。このように、K-252a による巨核球多倍体化の系は、正常巨核球多倍体化のメカニズムの検索に有用だけでなく、広く細胞周期の M 期のメカニズムを研究する上で、非常に有用な系になりうるものと考えられた。

(図1) K-252a と TPO 添加による Meg-J 細胞の形態の変化

A : コントロールの Meg-J 細胞 (液体培養) E(メイギムザ染色)

B : TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞 (液体培養)

C : K-252a で 5 日間培養した Meg-J 細胞(液体培養)

D : K-252a および TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞(液体培養)

E : コントロールの Meg-J 細胞 (メイギムザ染色)

F : K-252a および TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞(メイギムザ染色)

G : K-252a で 5 日間培養した Meg-J 細胞 (寒天培地)

H : K-252a および TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞 ; (寒天培地)

I : K-252a および TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞 (寒天培地、
メイギムザ染色)

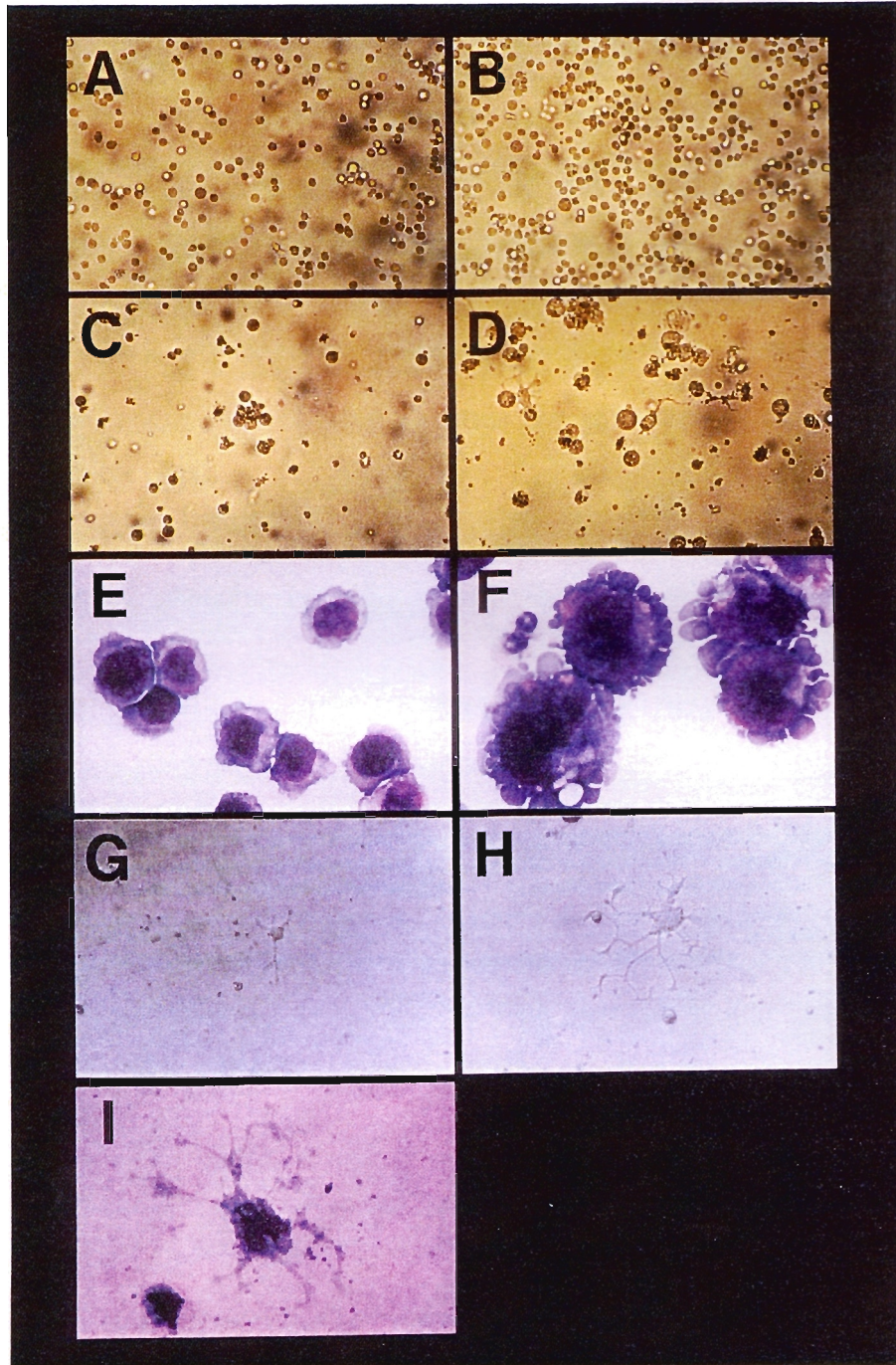


图 1

図2 G2/M期関連蛋白、キナーゼの変動

A : ヒドロキシウレアによる同調解除後、K-252a を添加、無添加で培養した Meg-J 細胞の核 DNA 量の経時的な変化

B : ヒドロキシウレアによる同調解除後、K-252a を添加、無添加で培養した Meg-J 細胞の G2/M 期関連蛋白の発現の経時的な変化

a) cyclinB1

b) cdc2

c) cdc2 phospho Tyr-15

C : ヒドロキシウレアによる同調解除後、K-252a を添加して培養した Meg-J 細胞の cdc2 キナーゼ活性の経時的な変化

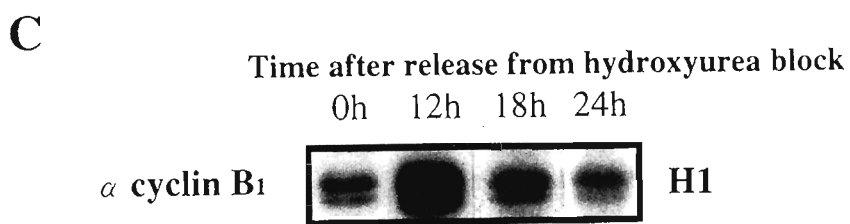
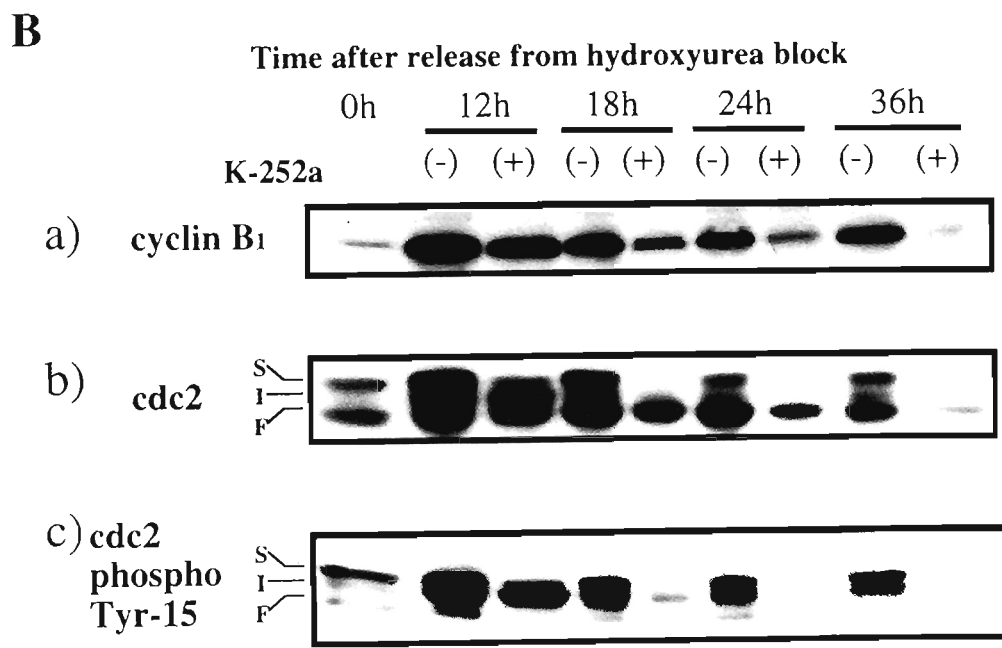
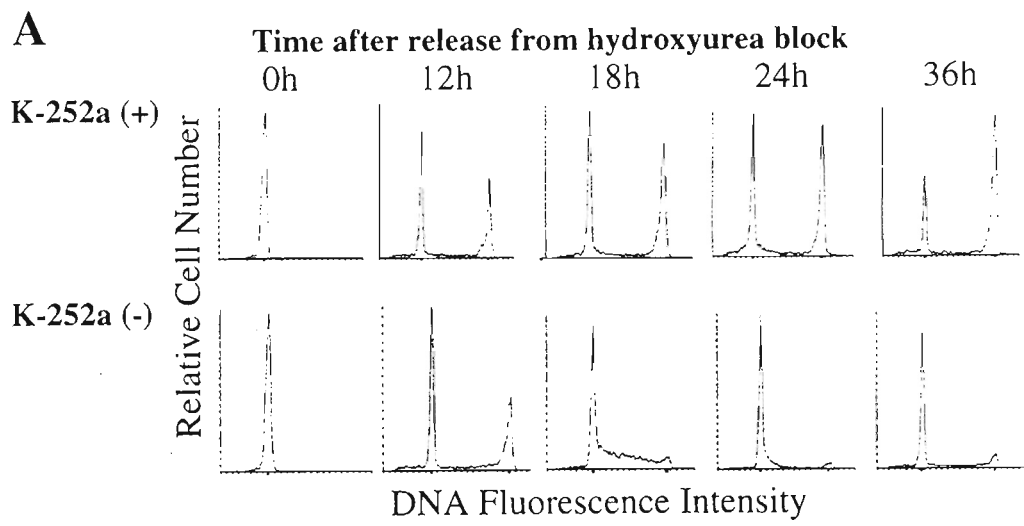


图 2

(2) ヒト巨核球の多倍体化過程における細胞周期制御蛋白の解析

最近、セリンスレオニンキナーゼである AIM-1 がクローニングされた。AIM-1 は anaphase B、telophase、cytokinesis の時期に、midzone に局在し、cytokinesis の開始における key regulator であると推測されている。そこで我々は AIM-1 が、anaphase B、telophase において発現が抑制されることが、巨核球の多倍体化という現象につながるのではないかと推測して、下記のごとく研究を進めている。

1. 方法

末梢血幹細胞採取時に得られた、末梢血単核細胞を、患者の同意を得た上で用いた。CD34 陽性細胞を、イムノビーズ法により純化した。得られた CD34 陽性細胞にインターロイキン-3(IL-3)、stem cell factor(SCF)を添加し液体培養した。AIM-1 のアンチセンスオリゴ、センスオリゴを作成し、この液体培養系に種々の条件で添加し、巨核球系細胞(CD41 陽性細胞)の多倍体化の有無について、フローサイトメトリーにて解析した。

2. 結果および考察

CD34 陽性細胞を SCF と IL-3 とともに液体培養し、同時に種々の濃度 AIM-1 のアンチセンスオリゴを添加したが、巨核球系細胞の多倍体化は認められなかった。巨核球の多倍体化の過程では、cytokinesis がおこらないという明確な現象があるので、AIM-1 が抑制されている可能性は非常に高い。現在までのところ、AIM-1 がヒト巨核球の多倍体化に関与しているという知見が得られていないが、今後、実験系の種々の改善を試みて、さらに検討していく予定である。

(3) 多倍体化に関与する転写因子の検討

1) 方法および材料

1. 試薬

ヒト遺伝子組み替え型 TPO はキリンビール社(高崎)より供与された。K-252a(フナコシ)は dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解後、20°Cにて暗所で保存した。Propidium iodide(PI)は Sigma 社より購入した。血小板糖蛋白 IIb/IIIa(CD41a)および Ib(CD42b)に対する FITC 標識モノクローナル抗体は

イムノテック社製を用いた。

2. 細胞株および培養法

ヒト巨核芽球性白血病細胞株である Meg-J 細胞を用いた。Meg-J 細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum:FCS) 添加 RPMI6401 培地 (GIBCO 社) により維持した。

3. オリゴヌクレオチド

NF-E2 P45 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (5`-AGGTCTCCACAAGCACAAAGGATT-3`)、を作成した。Meg-J 細胞に 5 μ l/ml の NF-E2 p45 のセンスあるいはアンチセンスオリゴを添加し 5 日間培養した。

4. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Meg-J 細胞より RNA を抽出し表 1 に示すプライマーを用いて RT-PCR を行った。

5. Electrophoretic mobility shift assay

下記のオリゴヌクレオチドを用いて Electrophoretic mobility shift assay を行った。

NF-E2 p45 (5`-TGGGGAACCTGTGCTGAGTCACTCTGGAG-3`)

GATA-1 (5`-GGTAAAGAGATAAGGCCCAT-3`)

6. DNA 量定量

Meg-J 細胞に、propidium iodide 染色を行い、フローサイトメトリーを用いて核 DNA 量 (ploidy) を測定した。

7. 表面抗原の解析

Meg-J 細胞に血小板糖蛋白 IIb/IIIa(に対するモノクローナル抗体(CD42b) を添加し、フローサイトメトリーで解析を行った。

2) 結果

Meg-J 細胞の多倍体化過程に関与する転写因子について検討した。巨核球系細胞における存在が報告されている転写因子としては GATA-1, GATA-2, TAL1/SCL, Evi-1, NF-E2 (p45, MafK) などがあり、それらの因子の発現の変化について解析した。K-252a および TPO 刺激前後の Meg-J 細胞から total RNA を抽出し、それぞれ 10mg の RNA で reverse transcription を行ない、その後 GATA-1, GATA-2, TAL1/SCL, Evi-1, NF-E2 (p45, MafK)、またコントロ

ールとして、 β 2-ミクログロブリンのプライマーを用いて同一条件で PCR を行った。その結果、これらの中で、NF-E2 p45 の発現の増強が認められた。その発現の増強は、刺激 1 時間後に最大であった。GATA-1、GATA-2、TAL1/SCL、Evi-1、MafK においては発現の変化は認められなかった（図 3）

。さらに Electrophoretic mobility shift assay においても、K-252a と TPO を添加して 1 時間培養後の Meg-J 細胞においては明らかに NF-E2 の DNA 結合能が認められた。しかし GATA-1 については、K-252a と TPO を添加前後でして 1 時間培養後 DNA 結合能の変化は認められなかった（図 4）。

また、NF-E2 p45 の近縁の遺伝子である、NF-E2 related factor-1 (Nrf-1), Nrf 2 の発現を同様に RT-PCR で検討したところ、K-252a と TPO の添加培養により Nrf-1 の発現は増強したが、Nrf-2 は不変であった。

以上の実験結果より、Meg-J 細胞の多倍体化および血小板膜糖蛋白の発現増強などに NF-E2 P45 が関与している可能性が示唆された。そこで、NF-E2 p45 のアンチセンス、センスオリゴヌクレオチドを TPO および K-252a とともに Meg-J 細胞に添加して培養し、その影響について検討した。その結果、Meg-J 細胞の TPO および K252a 添加による多倍体化は NF-E2 P45 アンチセンスオリゴヌクレオチドにて完全に抑制された。また、さらに TPO および K-252a 添加による GPIIb の発現の増強についても、NF-E2 P45 アンチセンスオリゴヌクレオチド添加により抑制された（図 5）。

最近、GATA-1 のノックアウトマウスでは血小板減少、巨核球の成熟異常が認められ、GATA-1 が巨核球造血に重要な転写因子の一つであることが報告された。NF-E2 p45 のプロモーター領域には GATA-1 binding site が存在することがすでに知られており、GATA-1 の巨核球での選択的な発現抑制が NF-E2 p45 の発現を抑制している可能性も考えられる。そこで Meg-J 細胞に GATA-1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、TPO および K252a とともに添加培養し、GATA-1 および NF-E2 p45 の発現の変化を検討した。その結果、GATA-1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドは GATA-1 の発現を抑制するのみではなく TPO および K252a の添加による NF-E2 p45 の増強を抑制した。以上の結果より、GATA-1 の巨核球での選択的な発現抑制が NF-E2 p45 の発現を抑制している可能性が考えられる。

3) 考察

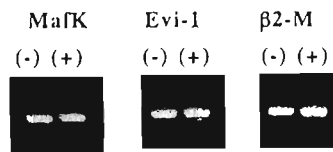
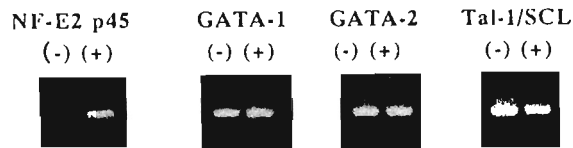
Meg-J 細胞の多倍体化は NF-E2 p45 のアンチセンスオリゴヌクレオチドにより抑制される。この現象は他の巨核球系細胞株においても認められる。以上の知見より NF-E2 は ploidy の増加を制御する転写因子であると考えられた。最近、NF-E2 p45 のノックアウトマウスでは血小板減少と巨核球の成熟異常を認めることが報告された。しかし、NF-E2 p45 のノックアウトマウスでは巨核球の多倍体化は正常にみられる。この結果は我々の結果と異なる。その理由については明らかではないが、ノックアウトマウスでは NF-E2 p45 の多倍体化誘導作用を代償する機構が働いている可能性も考えられる。

K252a と TP0 を NF-E2 のアンチセンスオリゴヌクレオチド添加により GP1b の発現が低下した。しかし、4N の ploidy を有する細胞に gating して解析すると GP1b の発現の変化はみられなかった。細胞が多倍体化すると細胞のサイズも大きくなり、その結果 GP1b の発現が高まることが知られており、NF-E2 のアンチセンスオリゴヌクレオチド添加による GP1b の発現が低下は多倍体化の抑制に伴う二次的な現象と考えられる。

表1 各種転写因子の RT-PCR に用いたプライマーの配列

GATA-1	Sense	5'-CAGTAAACGAGCAGGTA CTC-3'
	Antisense	5'-CATAAAGCCACCAGCTGGTC-3'
GATA-2	Sense	5'-AGCCGGCACCTGTTGTGCAA-3'
	Antisense	5'-TGACTTCTCCTGCATGCACT-3'
SCL/Tal-1	Sense	5'-TTGGGGAGCCGGATGCCTTC-3'
	Antisense	5'-CTCCCGGCTGTTGGTGAA-3'
Evi-1	Sense	5'-AGCAACGTCGAATCAAGACCTGCTTCAGAT-3'
	Antisense	5'-TCAGACTGTAAGAGCTCACTGGCCTCAGGT-3'
NF-E2 p45	Sense	5'-ACAGTACCATGGCCCCGTGTCCTC-3'
	Antisense	5'-AGACCAGCTCAATCTGTAGCCTCC-3'
MafK	Sense	5'-ATGACGACTAATCCCAAACCG-3'
	Antisense	5'-ACGGA ACTGGATGAGATTTC-3'

A)



B)

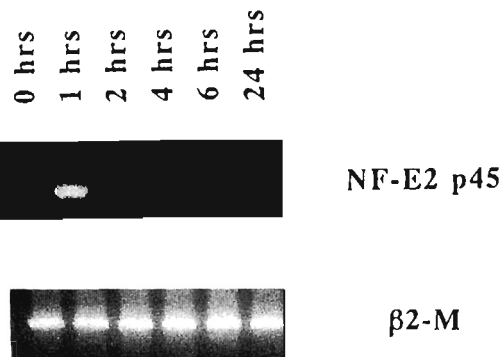


図3 各種転写因子の Meg-J 細胞における発現

- A) NF-E2 p45, GATA-2, Tal/SCL, MafK, Evi-1, β 2 マイクログロブリンの発現 (RT-PCR による)
(-) : 無処理の Meg-J 細胞, (+) : K-252a および TPO で 1 時間刺激した Meg-J 細胞
- B) K-252a および TPO で 1 時間刺激した Meg-J 細胞における NF-E2 p45 の発現の経時的変化

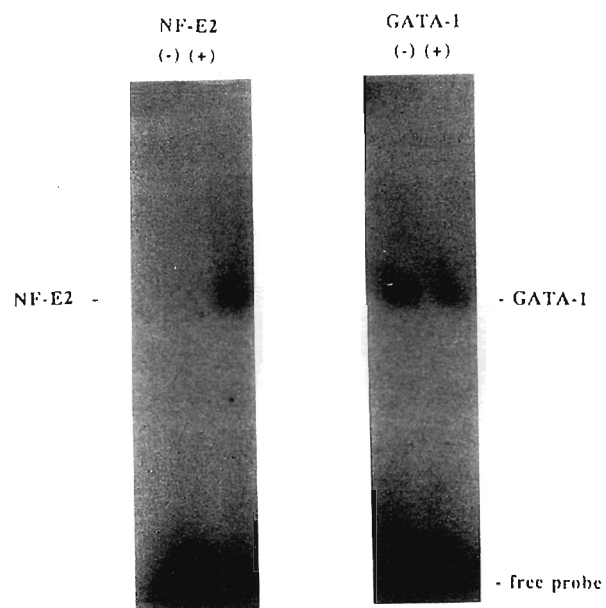
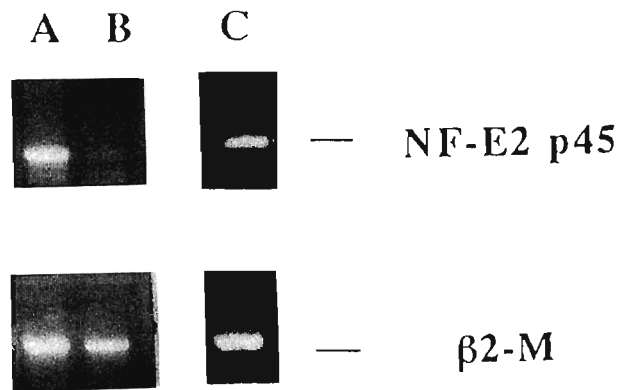


図4 NF-E2およびGATA-1のElectrophoretic mobility shift assay
 (-) : 無処理のMeg-J細胞
 (+) : K-252aおよびTPOを添加し1時間培養後のMeg-J細胞



Meg-J 細胞における NF-E2 p45 の発現の変化 (RT-PCR による)

- A : K-252a, TPO, および NF-E2 p45 のセンスオリゴヌクレオチドを添加し 1 時間培養後
 B : K-252a, TPO, および NF-E2 p45 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し 1 時間培養後
 C : K-252a および TPO を添加し 1 時間培養後

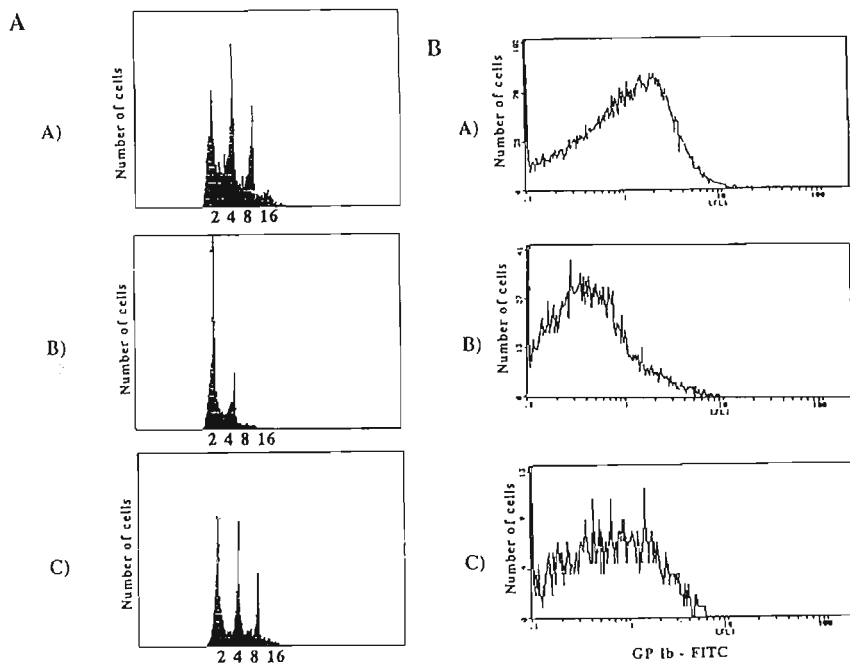


図 5 Meg-J 細胞の核 DNA 量および GPIb 発現の変化

- A. 下記に示す培養条件における Meg-J 細胞の核 DNA 量のヒストグラム
 B. 下記に示す培養条件における Meg-J 細胞の GPIb の発現
 A) K-252a および TPO で 5 日間培養した Meg-J 細胞
 B) K-252a, TPO, NF-E2 p45 アンチセンスオリゴヌクレオチドで 5 日間培養した Meg-J 細胞
 C) K-252a, TPO, NF-E2 p45 センスオリゴヌクレオチドで 5 日間培養した Meg-J 細胞

(4) 遺伝子導入法を用いた多倍体化の機序の検討

多倍体化機序における NF-E2 の関与をさらに検討するために、NF-E2 p45 を Meg-J 細胞へウイルスベクターを用い導入した。細胞の形態、ploidy には変化がみられなかったが、CD41 の発現が増強した。多倍体化が認められない推論としては、NF-E2 の transfectant では強発現が持続するためである可能性が考えられる。また、多倍体化には NF-E2 のみではなく、さらなる因子が必要である可能性も考えられる。また、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 trichostatin A の添加により多倍体化は認められなかったため、ヒストンアセチル化のため NF-E2 の転写が稼働しなかった可能性は低いと考えられた。また、CD41 の発現が増強した機序としては、CD41 の発現制御転写因子として知られている ETS が Gel shift assay で増強が認められたため、これを介していると考えられた。

巨核球の多倍体化において、Ras の関与が報告されており、Meg-J および Meg-J transfect に導入したところ、多倍体化傾向は認められた。しかしながら、K562 と TPO で誘導されるような多倍体化には至らず、Ras 以外の機構も関与していると考えられる。現在、さらに巨核球の多倍体化の機構の検討のため、CD34 陽性細胞に NF-E 2 を導入し、検討を進めている。