

Title	Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation
Author(s)	飯田, 智
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46185">https://hdl.handle.net/11094/46185</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	飯田 智 <small>さとし</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20084 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation (好中球分化における新規 G-CSF 標的遺伝子 CCR2、flotillin-1/2、および gp49 の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一  (副査) 教授 金倉 謙 教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は好中球前駆細胞の増殖と分化を特異的に促進するサイトカインである。好中球前駆細胞上の G-CSF 受容体が G-CSF と結合すると、JAK-STAT 経路などを介してシグナルが伝達され好中球への分化が促されるが、好中球特異的遺伝子の発現制御の分子機構は未だ不明な点が多く残されている。そこで、DNA マイクロアレイによって G-CSF に発現が誘導される遺伝子を同定し、その遺伝子発現制御の分子機構の解明を目的に研究を行った。

#### 〔方法ならびに成績〕

IL-3 依存的に増殖するマウス骨髄球前駆細胞株 FDN1.1 は G-CSF で刺激すると、ミエロペルオキシダーゼなどの好中球特異的遺伝子の発現上昇が見られる。G-CSF 刺激 2、8、14 時間後の FDN1.1 細胞より RNA を調製し、DNA マイクロアレイの試料として使用した。その結果、既知の STAT3 標的遺伝子である SOCS3 などに加えて、raft 蛋白質 flotillin-1 および flotillin-2、免疫グロブリン様受容体 gp49、CC ケモカイン受容体 CCR2 の発現が G-CSF により誘導される事を見いだした。定量的 RT-PCR により発現の経時変化をより詳細に調べると、SOCS3 は刺激後 20 分以内、flotillin-1/2 と gp49 は 2～4 時間、CCR2 は 12 時間以後に発現開始が見られ、それぞれ異なる発現制御を受けている事が示唆された。一方、マウス骨髄細胞に HoxA9 を強制発現して不死化した細胞株 (HoxA9-immortalized myeloid progenitor cells: 以下 HIMP 細胞と略す) を樹立した。この細胞は GM-CSF または IL-3 存在下で培養すると安定に増殖するが、G-CSF 刺激により成熟好中球へと最終分化した。上記述べた SOCS3、flotillin、CCR2 遺伝子は HIMP 細胞を G-CSF 刺激した時も FDN1.1 細胞と同様のパターンで発現誘導され、G-CSF による成熟好中球への最終分化の際にも発現が誘導されることが示された。ところでマウス骨髄細胞より表面抗原 Gr-1 陰性の細胞を分離し、in vitro で G-CSF または GM-CSF で刺激すると、刺激二日後にはどちらも半分以上の細胞が Gr-1 陽性の好中球へと分化する。このとき、GM-CSF で刺激した細胞は刺激の前で CCR2 の発現がほとんど変わらないのに対し、G-CSF で刺激した細胞では CCR2 の発現が強く誘導された。つまり、生体内でも G-CSF による好中球分化の過程で

CCR2 の発現が誘導されることが示唆された。

次に G-CSF による CCR2 の発現誘導の分子機構について解析した。好中球の分化には転写因子 C/EBP ファミリーが関与していることが知られている。実際、CCR2 のプロモーター領域にも C/EBP のコンセンサス結合配列が存在していることから、まずこの領域に C/EBP $\alpha$  が結合するかどうかをゲルシフトアッセイによって調べ、結合することを確認した。次いでクロマチン免疫沈降アッセイによって細胞内で C/EBP $\alpha$  がこの領域に結合するかどうか検討した。その結果、FDN1.1 細胞を G-CSF で刺激することによってこの部位への C/EBP $\alpha$  の結合が 5~10 倍に上昇することを見いだした。以上より、G-CSF 刺激により C/EBP $\alpha$  が CCR2 遺伝子のプロモーター領域に結合し、この遺伝子の転写を活性化させると結論した。

#### [総括]

DNA マイクロアレイによって CCR2 や flotillin を G-CSF 標的遺伝子として新たに同定した。これら G-CSF によって発現が誘導される遺伝子の発現パターンは、SOCS3 など STAT3 によって直接発現が制御されるものの他に、flotillin など数時間で上昇するもの、CCR2 など 12 時間以上後に上昇するものなどがあり、それぞれ別の発現制御機構が関与していることが示唆された。これまで CCR2 はマクロファージなどに発現し、その走化性に関わることが示されているが、好中球に発現するという報告はほとんどなかった。本研究によってマウス骨髄好中球に CCR2 分子が発現していることがわかり、好中球の走化性にも関わるということが考えられた。

さらに、CCR2 遺伝子のプロモーターには G-CSF 刺激依存的に C/EBP $\alpha$  が結合することが明らかとなり、CCR2 の誘導的発現に C/EBP $\alpha$  が関与することが示唆された。C/EBP $\alpha$  は好中球分化に重要な役割を果たすことが知られているが、活性化の分子機構などは不明であり、G-CSF によりどのように活性化されるかは興味深い問題である。

#### 論文審査の結果の要旨

G-CSF は生体における好中球数の恒常的維持、および感染時の動員、活性化に重要な役割を果たすサイトカインである。本研究は、G-CSF により発現が誘導される遺伝子を探索し、その発現機構を解析したものである。まず、DNA マイクロアレイによってこれまで G-CSF に発現誘導されることが知られていなかった CCR2、flotillin、gp49 を同定した。これらの遺伝子は、既知の G-CSF 標的遺伝子 SOCS3 を含めると、刺激後発現が始まるまでの時間により 3 つのグループに分けられ、それぞれ別の発現制御機構が関与していると考えられた。次いで、CCR2 のプロモーター領域には転写因子 C/EBP 結合配列が存在し、G-CSF 刺激により C/EBP $\alpha$  の結合が誘導されることが明らかにした。さらに、この時 CCR2 遺伝子全域に渡ってヒストンが修飾されていることがわかり、クロマチン構造が変化していることが示唆された。

以上の知見は好中球分化の分子機構の理解に重要な情報をもたらすことが期待され、学位に値すると考えられる。