

【総説】

骨髓系細胞の分化と転写因子C/EBPファミリー

Involvement of transcription factor C/EBP family in myelopoiesis

金沢大学 医薬保健研究域医学系 再生分子医学
赤木紀之

はじめに

真核生物における遺伝子発現は、遺伝子のプロモーター領域に基本転写因子群とRNA合成酵素が作用し、DNAからmRNAが転写されることで達成される。この制御機構は、どの細胞にも共通のメカニズムとして存在するが、細胞特異的な遺伝子発現制御を担うのが、細胞特異的な転写因子群である。転写因子は、プロモーター領域、あるいはそこから数千bpも離れたエンハンサー領域に結合し、遺伝子発現の制御に関与する。プロモーターやエンハンサー領域には比較的頻繁にCCAAT配列が認められるのだが、この配列を認識して結合するタンパク質として同定されたのが、転写因子C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) である。

最初に同定されたC/EBPは1988年で、のちにこの転写因子はC/EBP α と分類される。また、1990年には本邦の審良らによってNF-IL6が同定され、のちにC/EBP β と分類される。1997年にはKoefflerらの研究グループによって骨髓系細胞特異的なC/EBP ϵ が同定された。現在ではC/EBPファミリーとして少なくとも6種類が知られている。このファミリーに属する転写因子は、全てC末端側に高く保存されたbasic-region leucine zipper (bZIP) 構造を有している。bZIP構造を介して、ホモもしくはヘテロダイマーを形成しDNAに結合する。その機能は、細胞特異的な遺伝子発現調節、細胞の分化や増殖制御、細胞周期や細胞死など多岐に渡っている。本稿では、C/EBP研究の歴史を振り返りながら、筆者らが機能解析に従事した内容とその関連領域を紹介したい。

骨髓系細胞の分化

造血幹細胞から生み出される骨髓系前駆細胞は、その後、単球系前駆細胞と顆粒球系前駆細胞とに分かれる。単球系前駆細胞からは単球およびマクロファージが生まれ、顆粒球系前駆細胞からは顆粒球として好酸球、好塩基球、好中球が生じる。中でも好中球の分化段階は詳細に分類されており、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球を経て成熟した好中球が生まれる(図1)。これらの骨髓系細胞の分化や、成熟した細胞の機能において、C/EBPファミリーはさまざまな役割を担っている。

骨髓系細胞におけるC/EBP β の役割

ヒトinterleukin 6 (IL-6) 遺伝子のプロモーター領域に結合する因子として同定されたNF-IL6 (nuclear factor for IL-6 expression) がC/EBP β である。C/EBP β はマクロファージの分化に伴い発現が強く誘導されることが知られている。これは、C/EBP β がマクロファージの機能に関与していることを示唆する知見であったが、ノックアウト (KO) マウスの解析からそれは実証された¹⁾。すなわち、本来マクロファージが備えている細菌やウイルスなどといった異物を取り込む能力(食作用)が、C/EBP β KOマウス由来のマクロファージでは大幅に低下していた。また、腫瘍細胞に対する細胞障害活性も減弱していた。このことから、C/EBP β はマクロファージの機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方で、好中球におけるC/EBP β の興味深い機能も知られている。一般に顆粒球分化にはC/EBP α が重要であり、C/EBP α KOマウスは好中球を含む顆粒球が欠損していることが知られている。しかし、これは通常の発段階における好中球分化の知見であった。生体が病原体などに感染すると、それを排除するために末梢血中の好中球の数が急激に上昇する。こういった“緊急時”の好中

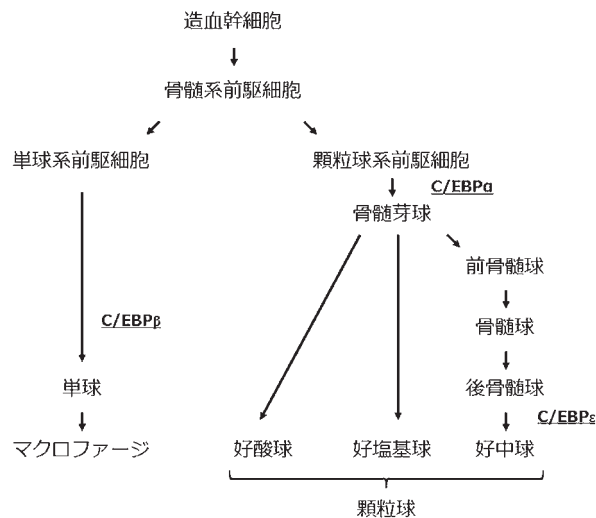


図1. 骨髓系細胞の分化の概略

球の産生に必須であるのがC/EBP β である。つまり、マウス個体に対して、人為的に感染症を誘発、もしくはサイトカインG-CSF刺激を行った場合、野生型マウスでは末梢血中の好中球の数が大幅に上昇するのに対し、C/EBP β KOマウスではその上昇が認められない²⁾。従って、定常時の好中球分化にはC/EBP α が、緊急時の好中球産生にはC/EBP β が作用するという使い分けが行われている。なお、緊急時に対応するC/EBP β の発現制御は、C/EBP β 遺伝子のプロモーター領域に存在するcyclic AMP responsive element (CRE) が関与しており、CREに結合するCRE binding protein (CREB) がC/EBP β の発現誘導に関与していることが知られている。また、好中球数の上昇は、顆粒球前駆細胞の段階からすでに制御が始まっており、C/EBP β KOマウスでは顆粒球前駆細胞数が、野生型に比べて十分には上昇していないという知見が報告されている。

さらに好中球の生存にもC/EBP β は関与しており、C/EBP β KOマウス由来の好中球は、細胞死(アポトーシス)が亢進していることを筆者らは見出した(図2)³⁾。これはC/EBP β がアポトーシスを抑制する機能を持っていることを示唆する。このような知見は好中球のみならず、ケラチノサイトや肝星細胞、単球でも認められていることから、C/EBP β は広く細胞の生存に関与していることが示唆されている。また、オスのC/EBP β KOマウスは正常な生殖が可能だが、メスのC/EBP β KOマウスは卵巣の機能不全により不妊マウスであることが知られている。以上のようにC/EBP β は、骨髄系細胞を含む様々な組織で重要な機能を果たしている。

好中球分化と C/EBP ϵ

上述したように、C/EBP β は生体内に広く発現していることから、そのKOマウスの表現型は組織や器官によって様々である。一方、C/EBP ϵ は骨髄系細胞より同定され、その発現も骨髄系細胞と一部のリンパ系細胞に限局している。そのため、C/EBP ϵ は主に血球系細胞で機能

している。C/EBP ϵ KOマウスの最大の特徴は好中球の分化不全で、成熟した好中球が産生されず、未分化な骨髓球や後骨髓球が蓄積している⁴⁾。そのため易感染を示し、出生後、感染症で死亡するマウス個体が多数生じる。また、C/EBP ϵ KOマウスの顆粒球(未熟な好中球を含む)はアポトーシスが亢進している。一方、マクロファージにも異常が認められており、マクロファージ特異的マーカーの発現量の低下や、形態的な未熟性、細菌に対する食作用活性の低下がC/EBP ϵ KOマウスで観察されている⁵⁾。このことから、C/EBP ϵ は好中球の最終分化や増殖、マクロファージの機能に関与していることが分かる。

C/EBP ϵ は、C/EBPファミリーの転写因子とホモダイマーやヘテロダイマーを形成するほか、様々な転写関連因子とタンパク質間相互作用をすることが知られている。例えば、Etsファミリーに属する転写因子PU.1や、Zinc fingerファミリーに属する転写因子Gata1と結合し、好酸球マーカー遺伝子であるMBP (major basic protein) の発現を誘導する。C/EBP ϵ はまた、転写因子c-Mybと相互作用し骨髄系特異的遺伝子のプロモーター活性を制御する。さらにはPMLやp300といった多機能な転写制御因子群や、細胞周期制御因子であるE2F1やRbとも相互作用し、細胞の分化や増殖を制御する機能が報告されている。

最近の研究から、エピジェネティックな制御機構やタンパク質の翻訳後修飾が、C/EBP ϵ の発現や機能を制御しているという新しい知見が報告された。ビタミンB群の1つであるニコチンアミド (NAM) は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤としての機能を持つ。NAMを骨髄系細胞に処理すると、C/EBP ϵ 遺伝子のプロモーター領域のヒストンアセチル化状態が亢進し、C/EBP ϵ の発現量が上昇する。その結果、好中球の機能も亢進し、細胞の殺菌能力が上昇する⁶⁾。この際、C/EBP ϵ タンパク質のアセチル化状態も亢進していたが、のちの研究からC/EBP ϵ のアセチル化が転写活性や細胞分化を促進することが示され、翻訳後修飾の重要性が示された⁷⁾。

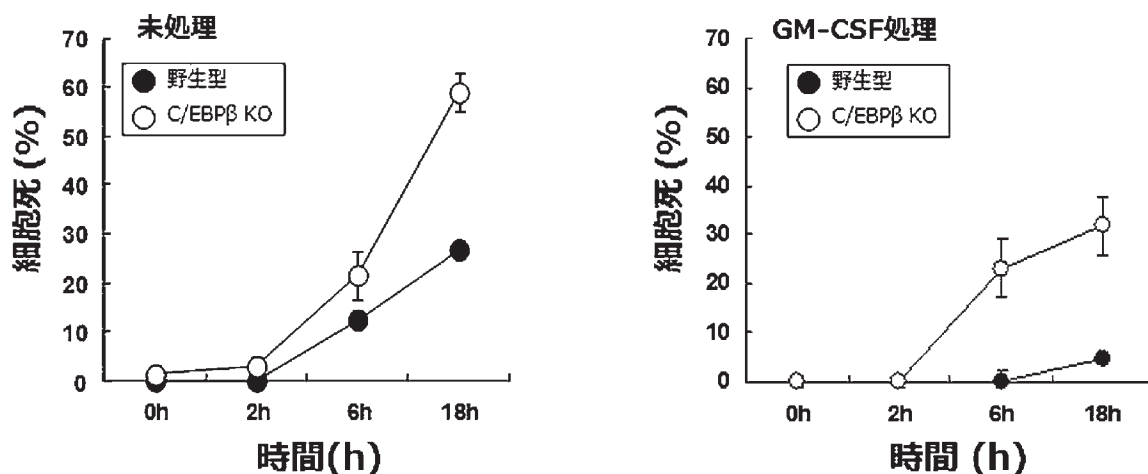


図2. 野生型マウスと C/EBP β KO マウスの好中球における細胞死 (アポトーシス) の頻度 (文献3より改変)

C/EBPファミリーの機能の重複性

C/EBPファミリーはbZIP領域のアミノ酸配列が保存されており、どの因子も同じDNA配列を認識して結合する。そのため、転写因子としては重複した機能を持っている。繰り返しになるが、C/EBP α は顆粒球分化に必須な因子であり、そのKOマウスは顆粒球が欠損している。興味深いことに、C/EBP α 遺伝子領域に人為的にC/EBP β を組み込む（つまり、C/EBP α はKOされているものの、そのプロモーター下でC/EBP β を発現させる）と、正常に顆粒球が生み出される。これはC/EBP β がC/EBP α に対して代替する機能を保持することを示している。それではC/EBP α とC/EBP β をダブルノックアウト (dKO) (便宜上、*aabb*と記載) すると、単に顆粒球とマクロファージが欠損するマウス個体が生まれてくるのだろうか？実は、*aabb*マウスは発生初期 (E10からE11) の段階で、胎盤形成異常のため死亡してしまうという、シングルKOマウス解析からは予期せぬ表現型が観察されている⁸⁾。

一方で筆者らはC/EBP β とC/EBP ϵ のdKOマウス (*bbee*) を作成し解析した⁹⁾。*bbee*マウスは、メンデルの法則に従って出生してきたことから、初期発生に異常は認

められないと考えられる。ところが、好中球に着目してみると、*bbee*マウスの好中球は、C/EBP ϵ シングルKOマウスよりもさらに未分化な形態を示していた (図3)。つまり、成熟した好中球は「ドーナツ型」という特徴的な核を形成するのに対し、*bbee*マウスの好中球は核に腔がほとんど認められなかった。その結果、より感染症に罹患しやすく、多くの個体が出生後数カ月以内に死亡してしまっただけでなく、また、骨髄細胞を用いたコロニーアッセイを行ったところ、*bbee*マウス由来の骨髄細胞はサイトカイン応答性が弱く、コロニー形成能が大きく減弱していた。一方でFACS解析からはc-Kit⁺、Sca-1⁺画分が増加していたことから、*bbee*マウスの骨髄では、造血幹細胞の分化の遅延あるいは停止が生じ、未分化な状態で蓄積していることが示唆された。

以上のような所見は、それぞれのシングルKOマウスでは認められなかった表現型である。このことから、初期発生や血球分化の過程において、C/EBPファミリーは重複した機能が維持されており、互いに機能を相補し合っている可能性が考えられる。

C/EBP ϵ と免疫疾患

今からおよそ40年以上前の1970年代前半、成熟した好中球が持つべき顆粒 (好中球特異的二次顆粒) が欠損し、未分化な好中球のみ保持する患者が発見された。この患者の好中球は機能異常が認められ、感染症を繰り返すという症例が報告された。その後、この疾患は「好中球特異的二次顆粒欠損症 (SGD)」と分類されたが、長らくその原因は不明であった。ところが1997年にC/EBP ϵ KOマウスが報告されたことにより、KOマウスとSGD患者の好中球の類似性が指摘された。その結果、1999年には5塩基欠損 (del 5bp) が、2001年にはスクレオチドAの挿入 (ins A) が、それぞれ独立したSGD患者のC/EBP ϵ 遺伝子で見出された。両変異とも、フレームシフトが生じ途中で停止コドンが出現する。そのため、C/EBP ϵ の全長が翻訳されず転写因子として機能不全となり、好中球分化が途中で停止すると考えられる。SGDの原因が判明したことにより、骨髄移植や遺伝子治療で根治は期待できるが、今のところ感染症の予防や治療を目的とした抗生剤等の投与による対処療法が現実的な治療法である。

SGDは常染色体劣性遺伝の疾患であることから、片アリルでも野生型C/EBP ϵ 遺伝子を持っていれば基本的には発症することはないと考えられる。しかし2007年、片アリルのみに1アミノ酸変異 (V218A) を持つSGD患者が報告された。この変異体は、転写因子としての機能欠損は認められず、むしろC/EBP ϵ の発現亢進により、その下流遺伝子の発現が異常をきたしSGDを発症する、という新しいタイプのようなのである。

最近になって、本学小児科の和田、谷内江らによって、新規変異型C/EBP ϵ を持つSGD患者が見出された¹⁰⁾。当該患者のもつ遺伝子変異は、bZIP領域に位置する247番目のアルギニン残基と、248番目のセリン残基が欠損 (Δ

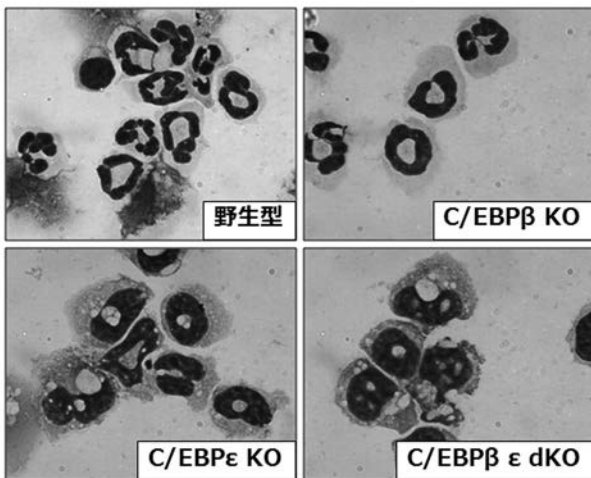


図3. さまざまな遺伝子破壊マウスの好中球の形態 (文献9より改変)

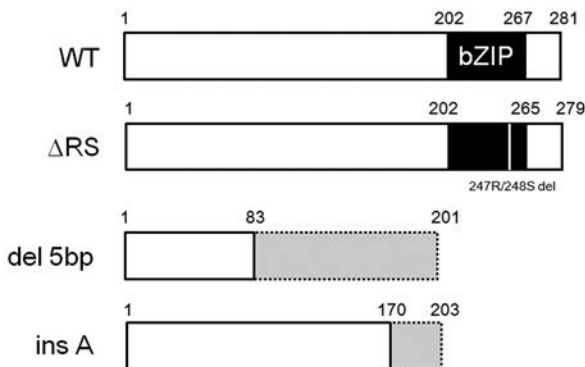


図4. 野生型および3種類の変異型C/EBP ϵ の構造 (文献10より改変)

RS) しており、それ以外は野生型 C/EBP ϵ と同じアミノ酸配列であった (図4)。筆者らが Δ RS の機能解析を del 5bp や ins A と比較しながら遂行したところ、この3種類の変異型 C/EBP ϵ はどれも転写活性化能は著しく低下していた。ところが、del 5bp や ins A は核移行能や DNA 結合能が欠損しているのに対し、 Δ RS は野生型同様、核移行能も DNA 結合能も維持されていた。では Δ RS の転写活性化能の低下はどこに起因するのか？先に述べたように、C/EBP ϵ は他の転写因子とタンパク質間相互作用を示す。そこで、PU.1 や Gata1 との相互作用を検討したところ、 Δ RS はこれらの因子と結合することができず、PU.1, Gata1, C/EBP ϵ の3因子が共同して誘導する遺伝子発現を、 Δ RS では誘導できなかった。このことから、核移行能や DNA 結合能が維持されていたとしても、C/EBP ϵ のタンパク質間相互作用ができなくなることで SGD を発症する、という新しい発症機序を提言することができた。

おわりに

本稿では、筆者らが機能解析に従事し内容とその関連領域を中心に、主に C/EBP β と C/EBP ϵ に焦点をあて概説した。C/EBP ファミリーに属する転写因子群は、様々な細胞や組織で発現し、しかも分化、増殖、生存、細胞周期など生命活動に関わる多くの場面で機能を発揮している。C/EBP がファミリーを形成し、互いに重複した機能をもっているという点では、ファミリーのいずれか1つがなんらかの理由で機能が欠損しても、他の因子が機能を相補することで、生命危機を回避する機構が備わっているのかもしれない。C/EBP の細胞内における機能解析は、まだまだ留まるところを知らないと考えられる。特に近年、ゲノム編集技術が一般化されたことにより、様々な細胞で自由に遺伝子が改変できるようになった。技術の進歩に伴い、転写因子の新たな機能の発見も期待され、今後の C/EBP 研究の進展に注目してゆきたい。

謝辞

本稿で紹介させて頂いた研究の一部は、H. Phillip Koeffler 教授 (シンガポール国立大学/UCLA 医学部シーダスサイナイ医療センター)、和田泰三臨床教授、谷内江昭宏教授 (本学小児科学)、横田崇教授 (本学再生分子医学) との共同研究の成果です。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長の井関尚一教授に厚く御礼申し上げます。全てのお名前を挙げるができないのが大変恐縮ですが、国内外を問わず多くの先生方の貴重なアドバイスやご協力に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80: 353-361, 1995
- 2) Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* 7: 732-739, 2006
- 3) Akagi T, Saitoh T, O'Kelly J, Akira S, Gombart AF, Koeffler HP. Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBP beta-deficient hematopoietic cells. *Blood* 111: 2999-3004, 2008
- 4) Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13187-13192, 1997
- 5) Tavor S, Vuong PT, Park DJ, Gombart AF, Cohen AH, Koeffler HP. Macrophage functional maturation and cytokine production are impaired in C/EBP epsilon-deficient mice. *Blood* 99: 1794-1801, 2002
- 6) Kyme P, Thoennissen NH, Tseng CW, Thoennissen GB, Wolf AJ, Shimada K, Krug UO, Lee K, Muller-Tidow C, Berdel WE, Hardy WD, Gombart AF, Koeffler HP, Liu GY. C/EBPepsilon mediates nicotinamide-enhanced clearance of Staphylococcus aureus in mice. *J Clin Invest* 122: 3316-3329, 2012
- 7) Bartels M, Govers AM, Fleskens V, Lourenco AR, Pals CE, Vervoort SJ, van Gent R, Brenkman AB, Bierings MB, Ackerman SJ, van Loosdregt J, Coffey PJ. Acetylation of C/EBPepsilon is a prerequisite for terminal neutrophil differentiation. *Blood* 125, 1782-1792, 2015
- 8) Begay V, Smink J, Leutz A. Essential requirement of CCAAT/enhancer binding proteins in embryogenesis. *Mol Cell Biol* 24: 9744-9751, 2004
- 9) Akagi T, Thoennissen NH, George A, Crooks G, Song JH, Okamoto R, Nowak D, Gombart AF, Koeffler HP. In Vivo Deficiency of Both C/EBP beta and C/EBP epsilon Results in Highly Defective Myeloid Differentiation and Lack of Cytokine Response. *PLoS ONE* 5: e15419, 2010
- 10) Wada T, Akagi T, Muraoka M, Toma T, Kaji K, Agematsu K, Koeffler HP, Yokota T, Yachie A. A Novel In-Frame Deletion in the Leucine Zipper Domain of C/EBPepsilon Leads to Neutrophil-Specific Granule Deficiency. *J Immunol* 195: 80-86, 2015