

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	マウスの胎生期造血における homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) の機能解析
Author(s)	大津, 直樹
Citation	
Issue date	2007-03-27
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/8222">http://hdl.handle.net/2298/8222</a>
Right	

# 学位論文

## Doctor's Thesis

マウスの胎生期造血における  
**homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) の機能解析**  
**(Functional analysis of HIPK2 in fetal mouse hematopoiesis)**

大津 直樹  
Naoki Ohtsu

指導教授

小川峰太郎教授  
熊本大学大学院医学教育部生体医科学専攻造血発生学

田賀哲也教授  
熊本大学大学院薬学教育部生命薬科学専攻転写制御学

2007 年 3 月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名：マウスの胎生期造血における  
homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) の機能解析  
(Functional analysis of HIPK2 in fetal mouse hematopoiesis)

著者名 : 大津直樹  
Naoki Ohtsu

指導教員名 : 小川峰太郎教授、田賀哲也教授

審査委員名 : 予防開発学担当教授 岡田誠治  
幹細胞制御学担当教授 糸昭苑  
細胞識別学担当教授 西中村隆一  
形態形成学担当教授 嶋村健児

2007年3月

## 目次

要旨	…1
関連論文	…3
謝辞	…4
略語一覧	…5
第1章 研究の背景と目的	…6
第2章 実験方法	…9
1. RT-PCR	…9
2. AGM 分散培養	…9
3. 免疫沈降と Western blotting	…10
4. DNA のコンストラクション	…10
5. AGM 分散培養へのレトロウイルスの感染	…11
6. フローサイトメトリーによる解析	…11
7. フローサイトメトリーを用いた細胞の分取	…11
8. ストローマ細胞との共培養	…12
9. 半固形培地を用いたコロニーアッセイ	…12
10. Luciferase アッセイ	…12
第3章 実験結果	
第1節 造血組織及び AGM 分散培養における HIPK2 の発現解析	…13
第2節 AGM 分散培養における HIPK2 の機能解析	…13
第3節 AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞に対する HIPK2 の影響	…14
第4節 HIPK2 の血球細胞に対する影響	…15
第5節 血球分化における HIPK2 が含む機能ドメインの解析	…16
第6節 HIPK2 の血球前駆細胞輩出に対する影響	…16
第7節 細胞内シグナル伝達に対する HIPK2 の影響	…17
第4章 考察	…19
第5章 結語	…23
参考文献	…25
図	…30

## 要旨

胎生期マウスにおいて成体型造血幹細胞は胎生 10.5 日目 (E10.5) 大動脈-生殖原基-中腎 (AGM) 領域から発生する。AGM 造血において、IL-6 ファミリーサイトカイン受容体構成分子 gp130 を介して転写因子 STAT3 が活性化されることは必須である。IL-6 ファミリーサイトカインによるシグナルの下流で働く STAT3 の作用機構を解析するために、STAT3 をリン酸化する因子が検索され homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) が単離されていた。HIPK2 は転写コリプレッサーとして知られ、細胞の増殖もしくはアポトーシスを制御するが、胎生期造血における機能は全く未知であった。HIPK2 も AGM 造血において何か重要な役割を担っていると考え、その機能を解析した。

AGM 領域は分散させた後、IL-6 ファミリーサイトカイン oncostatin M と 2 つの増殖因子 stem cell factor (SCF)、basic fibroblast growth factor を含む培地中で培養すると培養皿に付着した血管内皮様の細胞から血球細胞を輩出する。この分散培養系において、HIPK2 は血管内皮細胞を含む付着細胞、及び輩出された血球細胞を含む浮遊細胞において発現していた。浮遊細胞をフローサイトメトリーにより CD45 (血球マーカー) と c-Kit (SCF 受容体) の発現レベルの差異により分取し、コロニーアッセイを行うことで、CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞がコロニー形成能を持つ造血前駆細胞であることが明らかにされた。ウイルス感染 4 日後の AGM 分散培養において、HIPK2 が過剰発現した浮遊細胞では、含まれている CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞の割合が著しく減少した。この時、血管内皮細胞を含む付着細胞の生存率に差は見られなかった。また annexin V を用いてアポトーシスについて解析した場合も、付着細胞において HIPK2 の過剰発現による annexin V 陽性率の上昇は見られなかった。輩出された浮遊細胞について、HIPK2 を過剰発現させた場合、マクロファージ、顆粒球、及び赤血球などの血球コロニーの形成に著しい減少が見られた。また、cobblestone 様のコロニーもほとんど形成しなかった。浮遊細胞の中で高いコロニー形成能を持つ CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞も HIPK2 を過剰発現するとコロニー形成能が減少した。HIPK2 の血球分化を抑制するに当たっては核移行シグナルとキナーゼドメインが必要である事が明らかになったが、キナーゼ活性は必須ではなかった。これらの結果から HIPK2 は、AGM 領域において血管内皮細胞の増殖やアポトーシスには影響を与えないが、血管内皮細胞の造血前駆細胞への分化と、輩出された造血前駆細胞の増殖にお

いて抑制的に機能することが示唆された。

## 関連論文

Naoki Ohtsu, Ikuo Nobuhisa, Miyuki Mochita, Tetsuya Taga, Inhibitory effects of homeodomain-interacting protein kinase 2 on the aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis. *Exp. Cell Res.* (2007) 313, 88-97.

## 謝辞

本研究の実施にあたり、終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました熊本大学発生医学研究センター転写制御分野の田賀哲也教授、鹿川哲史助教授、信久幾夫講師に心から感謝いたします。同研究センター造血発生学分野の小川峰太郎教授には本教育部在籍に関して多大なご協力を頂きました。中島欽一教授(奈良先端科学技術大学院大学)、井上みゆきさん(Duke 大学)、吉永豊さん(熊本大学 脳神経外科)、井上俊洋さん(Duke 大学)には転写制御分野在籍中に御協力を頂きました。博士研究員の福田信治さん、清水健史さん、柏木太一さんには実験を遂行するにあたり御助言および御協力を頂きました。寺本路子さん、齋木優子さんには日頃から様々な面で研究の補佐をして頂きました。大学院生の皆様には日々の生活で元気づけられました。

本研究は、以上の多くの方々の惜しみない御協力と御厚意の下で行われ、それにより初めて成立したものです。心から御礼申し上げます。

最後に、本研究に尊い命を捧げてくれた動物たちの冥福を祈ります。



## 略語一覽

AGM: aorta-gonad-mesonephros (大動脈-生殖隆起-中腎)  
APC: allophycocyanin  
bFGF: basic fibroblast growth factor  
BSA: bovine serum albumin  
CBP: cAMP response element-binding protein-binding protein  
CtBP: carboxyl-terminal binding protein  
DiI: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate  
DiI-Ac-LDL: DiI acetyl low-density lipoprotein  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
E: embryonic day  
EF-1: elongation factor 1  
EGFP: enhanced green fluorescent protein  
HIPK2: homeodomain-interacting protein kinase 2  
FCS: fetal calf serum  
FOG-1: Friend of GATA-1  
GFAP: glial fibrillary acidic protein  
gp130: glycoprotein 130  
HSCs: hematopoietic stem cells  
IL-6: interleukin-6  
IRES: internal ribosomal entry sequence  
LTR: long-term reconstitution  
NLK: nemo-like kinase  
OSM: oncostatin M  
PBS: phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理的食塩水)  
PE: phycoerythrin  
PML: promyelocytic leukemia  
P-Sp: paraaortic splanchnopleura  
SCF: stem cell factor  
SRS: speckle retention signal  
STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

## 第1章 研究の背景と目的

マウスの造血幹細胞 (hematopoietic stem cells: HSCs) の研究では組織学的な観察や、 $\gamma$  線照射により造血能を無くしたマウスへの移植実験から長期造血組織再構築 (long-term reconstitution: LTR) 活性を持つ造血幹細胞が発生してくる場所は胎生 10.5 日目 (E10.5) 大動脈 - 生殖原器 - 中腎 (aorta-gonad-mesonephros: AGM) 領域であると報告されている (Godin and Cumano, 2002)。E7.5 yolk sac の blood island から発生してくる有核の赤血球を含む血球細胞や、無核の赤血球を持つ血球を輩出する paraaortic splanchnopleura (P-Sp) 領域は LTR 活性を獲得していない (Cumano et al., 1996)。これらのことから P-Sp 領域に存在する細胞がサイトカインなどの細胞外因性因子の刺激を受け、細胞内の遺伝子発現が変化する事により AGM 領域に存在するような LTR 活性を持つ成体型造血幹細胞に分化すると考えられる。AGM 領域内の細胞における造血能について、embryonic stem 細胞の解析から血管内皮細胞マーカーが発現している細胞から血球細胞へ分化すると考えられるようになった (Nishikawa et al., 1998)。また、血管内皮細胞に 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) で標識されたアセチル化 low-density lipoprotein (DiI-Ac-LDL) を取り込ませた場合、DiI-Ac-LDL を取り込んだ血球細胞が輩出されることから血管内皮細胞から血球細胞が分化してくることを示唆している (Sugiyama et al., 2005)。HSCs の発生を制御する遺伝子メカニズムについてはこれまでにいくつかの遺伝子組換えマウスの解析がなされ、HSCs の発生に必須な受容体タンパク質や転写因子が見出されていた (Minegishi et al., 2003; Shalaby et al., 1997)。そこで、どのような分子メカニズムで LTR 活性を持つ HSCs が発生し、造血系細胞系譜を構築するかを解明する事を目的として、HSCs の発生が認められる AGM 造血に着目した研究を行った。Mukouyama らは、トリプシンで分散させた AGM 領域を培養し、未分化血球マーカーである CD45 陽性 (CD45<sup>+</sup>) 血球細胞を輩出させるためには interleukin-6 (IL-6) ファミリーサイトカイン oncostatin M (OSM) が必須である事を明らかにした (Mukouyama et al., 1998)。また、レトロウイルスをこの培養細胞に感染させることにより、遺伝子の導入を容易に行うことが出来る。この初代培養系では輩出された血液細胞の増殖や分化を観察することに加え、サイトカインに応答して活性化もしくは抑制されるシグナル伝達の解析、及びそ

れに伴い発現する遺伝子の変化を解析する際に非常に有用である。これまでに我々の研究室ではサイトカイン IL-6 受容体構成因子である glycoprotein 130 (gp130) の欠損マウスにおける造血細胞の発生について解析した結果、gp130 欠損マウスの AGM 領域を用いて分散培養を行うと、造血幹細胞マーカーである Sca-1 や SCF のレセプターである c-Kit を発現する細胞の出現が著しく減少していることが示された (Takizawa et al., 2003)。この場合、gp130 刺激によりリン酸化されることで知られる転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化が起こっていないことが明らかになった。これらのことから、STAT3 がリン酸化され、二量体になり活性化する事が AGM 領域における造血細胞発生に必須であると考えられた。さらに、STAT3 の作用機構を解明するために STAT3 の活性化に必要である 727 番目のセリンをリン酸化する因子が検索された。その結果、マウス B 細胞由来で IL-6 の刺激により STAT3 のリン酸化が検出される BAFh130 細胞から作られた cDNA ライブラリーより homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) が単離されていた (Matsuo et al., 2001)。このことから HIPK2 は AGM 造血に重要な役割を担っている可能性があったが、研究を始めた当時 HIPK2 の造血について、さらには生物の発生における役割に関する知見は全くなかった。そこで HIPK2 の造血における役割を解明することは胎生期の造血系構築の分子基盤において重要な意義を持つと考えられたので解析を試みた。HIPK2 は、NK ホメオドメイン転写因子である Nk-1.2 のホメオドメインに対する結合タンパク質として yeast two-hybrid 法によるスクリーニングで単離・同定された 1189 アミノ酸からなるポリペプチドで、様々なドメインを持つ (Kim et al., 1998)。まず、HIPK2 はセリン/スレオニンキナーゼで、このキナーゼドメインにおいて高い相同性を有する HIPK1、HIPK3 とファミリーを形成している。このファミリーメンバーはその分子中に、キナーゼドメインの他にも相同性が高いホメオドメイン結合領域、PEST 配列、及びチロシン/ヒスチジンリッチドメインを持っているが、これらドメインの生体内における機能は不明である。HIPK2 が細胞内で機能する際、核内で Nk-1 や Nk-3 と共に転写抑制に働くことが知られているが、これは HIPK2 の核移行シグナルと核内に点在するための speckle retention signal (SRS) があることによると考えられている (Kim et al., 1999)。これらドメインの造血における機能については未知であり、実際細胞分化において HIPK2 の作用機構を解明するにあたって機能ドメインの情報は重要である。

近年の研究では HIPK2 は癌抑制因子 p53 や、転写コリプレッサーとして様々な遺伝子の発現抑制を行う carboxyl-terminal binding protein (CtBP) と相互作用することが明らかとなった (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2003)。これらの因子とキナーゼドメインを介した HIPK2 との相互作用からはアポトーシスが誘導されるので、造血細胞発生においても HIPK2 のアポトーシス誘導の可能性はある。Zhang らの報告では HIPK2 によりリン酸化された CtBP はプロテアソームにより分解される。また、p53 は成体マウスの骨髄において neurokinin-2 と共に neurokinin-A により活性化されることで、CD34<sup>+</sup>CD35<sup>-</sup> もしくは CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> 血球前駆細胞の増殖を抑制する (Vishalakumar et al., 2006)。さらに、CtBP と Friend of GATA-1 (FOG-1) との相互作用は成体型の赤血球や骨髄球の形成に参与していること (Tanaka et al., 2004)、造血に必須な転写因子 c-Myb が HIPK2 と nemo-like kinase (NLK) との複合体と相互作用することで、ユビキチンを介したプロテアーゼにより分解されることが報告された (Kanei-Ishii et al., 2004a; Kanei-Ishii et al., 2004b; Mukoyama et al., 1999)。これらの結果は HIPK2 が造血細胞の発生に必須なタンパク質と相互作用していることを示唆しているが、HIPK2 の造血発生における役割は不明である。

これらの背景を踏まえて本研究では HIPK2 の胎生期造血における役割を解明することを試み、肝臓で起こる造血の前段階で発生する造血細胞について AGM 領域の初代培養を用いて解析した。様々な HIPK2 変異体を AGM 分散培養に導入することで HIPK2 が AGM 造血において抑制的な役割を担っていることが示唆された。

## 第2章 実験方法

### 1. RT-PCR

ICR マウス (Nippon SLC, Hamamatsu, Japan) の E10.5 と E11.5 の AGM 領域、E12.5、E13.5、及び E14.5 の肝臓、もしくは AGM 領域を分散培養した時に得られる浮遊細胞と付着細胞から RNA を抽出した。5 µg の total RNA を鋳型として逆写酵素 SuperScript II (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応を行った。PCR 反応には rTaq (TAKARA Biotechnology Inc., Otsu, Japan) と、HIPK2 の配列情報をもとに作成した primer (sense primer: 5'-CTTTCATCACTCACGTGGCC-3', antisense primer: 5'-TGAGATCTGAAGAGGCTGAGC-3')、CD45 遺伝子の配列情報をもとに作成した primer (sense primer: 5'-AGCACTGATTATATTCCTGG-3', antisense primer: 5'-TGCTTGGCCAGTATTCTGCG-3')、及び G3PDH 遺伝子の配列情報をもとに作成した primer (sense primer: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', antisense primer: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3') を用いて行った。反応は、まず 95°C・5 分間で DNA を変性させ、次に 95°C・30 秒間、60°C・30 秒間、72°C・1 分間を 1 cycle として 28 及び 30 cycle (HIPK2 と CD45) もしくは 24 及び 26 cycle (G3PDH) 行った。増幅された DNA 断片は 1.2%アガロースゲル中で電気泳動後、エチジウムブロマイド染色する事により検出した。

### 2. AGM 分散培養系

AGM 分散培養は Mukouyama らの方法を参考にして行った (Mukouyama et al., 1998)。ICR マウスの E11.5 の胎仔より実体顕微鏡下で AGM 領域を採取した。これをトリプシン溶液 (0.05% トリプシン, 0.5 mM EDTA: Invitrogen) 中で 37°C、9 分間消化した後に、非働化した 15% FCS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) で洗浄した。AGM 領域を DMEM に懸濁した後、DMEM に 15% FCS、2 mM L-glutamine、1 mM sodium pyruvate、100 ng/ml stem cell factor (SCF: PeproTech, London, England)、1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF: R&B Systems, Minneapolis, MN, USA) 及び 10 ng/ml OSM (R&B Systems) を含んだ培地 (以下「標準培地」) を加えた。細胞懸濁液は 0.1 % gelatin で処理した 12 穴プレート (1.0 x 10<sup>5</sup> 細胞/ml/well; Nunc, Tokyo, Japan) 又は 60 mm デイッシュ (6.0 x 10<sup>5</sup> 細胞/3ml; Nunc) に蒔き、

5% CO<sub>2</sub> を含む 37°C インキュベーター中で 6 又は 7 日間培養した。

### 3. 免疫沈降と Western blotting

細胞を氷上で lysis buffer (0.5% (v/v) Nonidet-40, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml aprotinin; pH7.6) に懸濁した。懸濁液を遠心分離 (15,000 rpm, 10min, 4°C) し、沈殿を除いた上清にコントロール IgG、抗 HIPK2 抗体 (H-55; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) もしくは抗 GFP 抗体 (Medical & Biological Laboratories CO. LTD., Nagoya, Japan) と Protein A Sepharose (PAS; GE Healthcare, Milwaukee, Wis, USA) を加えて免疫沈降を行った。4°C で 2 時間ローテーターで回転させた後、PAS を 3 回 lysis buffer で洗浄し、sample buffer に懸濁した。この溶液を SDS-PAGE の後に抗 HIPK2 抗体または抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (E10; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて Western blotting を行った。標識されたタンパク質は化学発光システム (ECL; Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ, USA) により検出した。

### 4. DNA のコンストラクション

野生型 HIPK2 (HIPK2 WT) の全長 cDNA はマウスの心臓の cDNA と、GenBank にある HIPK2 の配列 (accession no. AF333792) を元にして作成した primer を用いて RT-PCR により単離した。pBluescript II KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の *EcoR* I/*Xba* I サイトにサブクローニングした後に pMY-IRES-EGFP ベクター (Morita et al., 2000) の *EcoR* I/*Not* I サイトに挿入した。HIPK2 のキナーゼドメインに変異を与えたコンストラクト HIPK2 K221A (kinase-dead: KD, 221 番目のリシンをアラニンに置換) は次の PCR を元にした方法で作成した。

K221A fragment 1 作成用 primer

5'-AGTGAATTCACCATGGCCTCACATGTGCAAGTTTTCT-3'

5'-CTTGAGGATCGCAATGGCCACA-3'

K221A fragment 2 作成用 primer

5'-TGTGGCCATTGCGATCCTCAAG-3'

5'-ACGTCTAGATCATATGTAAGGGTATTGGTTGACCT-3'

KOD plus polymerase (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて K221A の変異が入った

DNA 断片を PCR 法で増幅させ、HIPK2 WT のキナーゼドメインに変異を入れた。次に他の HIPK2 のコンストラクトも HIPK2 WT を元にして PCR により作成した。HIPK2 ΔC (aa 1-500) はカルボキシル末端側を欠失、HIPK2 ΔN (aa 170-1189) はアミノ末端側を欠失、HIPK2 ΔNΔC (aa 170-500) はアミノ末端側とカルボキシル末端側の両方を欠失させた。また、HIPK2 C term. (501-1189) はアミノ末端側全体を欠失させた。PCR 断片は pMY ベクターにクローニングした後、シーケンサーを用いて配列に変異が入っていないことを確認した。

### 5. AGM 分散培養へのレトロウイルスの感染

遺伝子導入の前日にレトロウイルスのパッケージング細胞である PLAT-E 細胞を 10% FCS (v/v) と 1 μg/ml gentamycin を含んだ DMEM 中に培養した。翌日 Trans IT-293 (Mirus, Madison, WI, USA) を用い、そのプロトコールに従いインサートを含んだ pMY-IRES-EGFP ベクターを細胞に導入した。48 時間後、上清を回収し、1 μg/ml polybrene を加えたものをウイルス溶液とし、培養 2 日目の AGM 分散培養に加えた。9 時間培養した後にウイルス溶液を AGM 分散培養から除き標準培地を加え培養を続けた。また、HIPK2 が PLAT-E 細胞に発現していることは抗 HIPK2 抗体を用いた Western blotting により確認した

### 6. フローサイトメトリーによる解析

AGM 分散培養から浮遊細胞はピペッティングで、付着細胞は Cell dissociation buffer (Invitrogen) を加えて 37°C で 5 分間インキュベートすることで回収した。回収した細胞を抗体染色の場合は 3% FCS、0.05% (w/v) sodium azide 入りの phosphate buffered saline (PBS) で、annexin V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) で染色する場合は annexin V binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>; pH7.4) で洗浄した。洗浄した細胞は phycoerythrin (PE) で修飾した抗 CD45 抗体 (30-F11) (Becton Dickinson, Lincoln, NJ, USA) と allophycocyanin (APC) で修飾した抗 c-Kit 抗体 (2B8) (Becton Dickinson) で染色するか、又は APC で修飾した annexin V で染色した。死細胞は propidium iodide (PI; Calbiochem, Darmstadt, Germany) もしくは 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter Inc., CA, USA) で検出した。標識した細胞は FACSCalibur, FACSCanto (Becton Dickinson) で検出し、解析ソフト Flow Jo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA) を用いて解析した。

## 7. フローサイトメトリーを用いた細胞の分取

培養 6 日目の AGM 分散培養から回収した浮遊細胞を 30  $\mu\text{m}$  のフィルター (Cell Trics フィルター 30  $\mu\text{m}$ ; Perteck, Münster, Germany) に通した。5  $\mu\text{g/ml}$  PI で染色し、強度が強いものを死細胞として除いた。細胞の分取には FACS Vantage SE 及び FACS Aria (共に Becton Dickinson) を用いた。

## 8. ストローマ細胞との共培養

FACS Vantage を用いて分取されたウイルスを感染させた浮遊細胞に含まれる PI GFP<sup>+</sup> 細胞及び CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞は 10% (v/v) FCS、100 ng/ml IL-3、及び 100 ng/ml SCF を含む  $\alpha$  MEM に懸濁し、OP9 ストローマ細胞上に蒔いた。3 日後、GFP<sup>+</sup> cobblestone (敷石) 様のコロニーを数えた。

## 9. 半固形培地を用いたコロニーアッセイ

半固形培地には Methocult™ GF M3434 (Stem Cell Technology Inc., Vancouver, Canada) を用い、そのプロトコールに従い解析を行った。ウイルスが感染した  $3.0 \times 10^3$  個の GFP<sup>+</sup> 細胞は 35 mm ディッシュ中に 37°C で 7 日間 培養した。形成された GFP<sup>+</sup> コロニーを構成する細胞の形態を実体顕微鏡下で区別し、マクロファージコロニー (M)、顆粒球コロニー (G)、赤血球コロニー (E)、及びミックスコロニー (GM) を数えた。この操作は 3 回行った。

## 10. Luciferase アッセイ

培養翌日の AGM 分散培養 ( $0.5 \times 10^5$  細胞 / 24-well plate) に、SBSW8-GPLW-pGL3 (glial fibrillary acidic protein (GFAP) minimal promoter の 5' 側の *Nhe* I site に STAT3 結合配列 ATGCTTCCGAGAAGTCT が 2 回繰り返している配列を、スペーサー配列を挟んで 4 個繋げたもの)、内部コントロール用の pEF-Rluc (elongation factor 1 (EF1) 遺伝子のプロモーターに *renilla luciferase* 遺伝子を繋いだもの)、及び HIPK2 変異体 (10, 30, 100 ng) もしくは 100 ng dominant negative form (DN) STAT3 を導入した。24 時間後にサイトカインを除き、さらに 24 時間後に 10 ng/ml IL-6 と可溶性 IL-6 レセプターの融合タンパク質 (IL-6/sIL-6R) で 6 時間刺激した時の luciferase 活性を測定した。



### 第3章 実験結果

#### 第1節 胎生期造血組織及び AGM 分散培養における HIPK2 の発現解析

HIPK2 の胎生期造血組織における発現を RT-PCR により検出した。E10.5 と E11.5 の AGM 領域と、E12.5、E13.5、及び E14.5 の肝臓から抽出した RNA について RT-PCR を行うと、それぞれの cDNA より 320bp からなる HIPK2 の DNA 断片を検出することが出来た (図 1)。このとき逆転写を行っていないそれぞれの RNA についてはバンドを検出できていないので、得られたバンドは cDNA 由来のものだと考えられた (図 1, RT-)。培養 7 日目の AGM 分散培養における HIPK2 の発現を検出した。G3PDH を検出した場合、浮遊細胞と付着細胞で同じ濃さのバンドが検出され、cycle 数を増やしても浮遊細胞と付着細胞間でバンドの濃さに差は見られない条件で解析した。その条件下において HIPK2 を検出した場合、付着細胞において浮遊細胞より濃いバンドが得られた。24 cycle における付着細胞と 26 cycle における浮遊細胞のバンドの濃さがほぼ同じことから付着細胞においては浮遊細胞の 2 cycle 分の差、つまりおよそ 4 倍量発現していると考えられた (図 2A)。HIPK2 の発現量は AGM 分散培養において浮遊細胞よりも付着細胞に多く、その結果血球輩出を制御していると考えられた。次に、HIPK2 のタンパク質についても検出を行った。培養 7 日目の浮遊細胞と付着細胞それぞれを溶解し、抗 HIPK2 抗体を用いて免疫沈降した後に同抗体を用いて Western blotting を行うと付着細胞についてはおよそ 220 kDa のタンパク質が検出された (図 2B)。しかし、浮遊細胞についてはタンパク質を検出する条件を見出すことは出来なかった。これらの結果から HIPK2 は胎生期造血組織及び AGM 分散培養に含まれる細胞において発現し、何らかの役割を担っていることが示唆された。

#### 第2節 AGM 分散培養に含まれる付着細胞における HIPK2 の機能解析

AGM 分散培養に含まれる細胞は、OSM、SCF、及び bFGF 等のサイトカインにより様々な mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ の様なシグナル制御因子や転写因子が活性化され (Mukouyama et al., 2000; Mukouyama et al., 1999; Nobuhisa et al., 2004; Takizawa et al., 2003)、血管内皮様細胞が CD45<sup>+</sup> 血球細胞へ

と分化していく (Mukouyama et al., 1998)。HIPK2 の血球細胞分化における役割について解析するために HIPK2 変異体を AGM 分散培養に過剰発現することを試みた。AGM 分散培養においてレトロウイルスを感染させていない場合と GFP を発現するレトロウイルスを感染させた場合では血球細胞輩出や細胞の形態に差は見られなかったため GFP の発現をウイルス感染の指標とした。HIPK2 WT と KD の cDNA を、IRES に EGFP を繋いだ配列を持つレトロウイルスベクターに挿入した (図 3A)。培養 2 日後、付着細胞に作成したレトロウイルスを感染させ、GFP<sup>+</sup> 細胞を観察した (図 3B)。AGM 分散培養に過剰発現させた HIPK2 変異体は Western blotting により確認した (図 3C)。ウイルス感染 4 日後、GFP<sup>+</sup> 付着細胞を観察すると、GFP のみを過剰発現したときと HIPK2 WT もしくは KD を過剰発現させた場合に付着細胞の形態的な差は見られなかった (図 4A)。浮遊細胞をピペッティングにより取り除いた後、残っている付着細胞の GFP 強度をフローサイトメトリーにより解析すると GFP、HIPK2 WT、もしくは KD を過剰発現させた場合ではほぼ同じ感染率であるが、GFP のみを発現させた場合の GFP 陽性率は他の 2 つと比較するとやや高かった (図 4B, 右)。GFP<sup>+</sup> 付着細胞における PI 強度についても解析した。図 4B に範囲を示した PI 強度に含まれる細胞は、トリパンブルーで染色し、解析した場合に死んでいないことを確認した PI<sup>-</sup> 画分である。GFP<sup>+</sup> 付着細胞に含まれる PI<sup>-</sup> 細胞画分の割合は HIPK2 WT、もしくは KD を過剰発現した場合と GFP のみを発現させた場合を比べて差は見られない (図 4B 右, C)。これまでの HIPK2 に関する研究で、HIPK2 はアポトーシスを誘導するという報告があったので (D'Orazi et al., 2002; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2003)、AGM 分散培養における HIPK2 によるアポトーシスの誘導について解析した。レトロウイルスを感染させた 4 日後、AGM 分散培養に含まれる付着細胞を回収し、アポトーシスを起こした細胞で認められる annexin V の抗体と PI で染色した。GFP<sup>+</sup> 付着細胞では GFP、HIPK2 WT、もしくは KD を過剰発現させた場合にかかわらず annexin V<sup>+</sup> 細胞の割合は PI<sup>+</sup> もしくは PI<sup>-</sup> において差は見られなかった (図 5A)。PI の代わりに死細胞を染色する 7-AAD で染色した場合も同様の結果が得られた (図 5B)。これらの結果から、AGM 分散培養においてレトロウイルスを用いて過剰発現させた HIPK2 変異体は血管内皮様細胞を含む付着細胞の生存に影響を与えないことが示された。

### 第3節 AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞に対する HIPK2 の影響

輩出された血球細胞分化における HIPK2 の機能を解析するために AGM 分散培養で輩出される浮遊細胞に着目した。ウイルス感染後 4 日目の AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞を回収し、フローサイトメトリーにより解析した。GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞は GFP のみを過剰発現させた場合に比べて HIPK2 WT もしくは KD を過剰発現させた場合には著しく減少していた (図 6A)。次に、HIPK2 変異体を過剰発現させた場合に少ないながら現れる GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞を分取し、OP9 ストローマ細胞上で 3 日間培養することで形成されるコロニーを解析した。GFP のみを発現させた浮遊細胞は造血幹細胞と考えられている cobblestone 様の形態を持つコロニーを多く形成した (図 6B-D)。一方、GFP と共に HIPK2 WT または KD を過剰発現させた浮遊細胞では GFP<sup>+</sup> コロニーの形成はほとんど観察されなかった (図 6B; 中央及び右, D)。これらの結果 HIPK2 は AGM 領域における造血に対して抑制的に働いていることが示唆された。また、この抑制効果には HIPK2 のキナーゼ活性は重要ではないことが示唆された。同様に半固形培地中でも、AGM 分散培養から輩出された GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞の血球コロニー形成能を解析した。HIPK2 WT もしくは KD を過剰発現させた AGM 分散培養由来の GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞からは、GFP を過剰発現させた時と比べて 1/10 程度の顆粒球、マクロファージ、及び赤血球から構成されるコロニーが観察された (図 7)。これらの結果、HIPK2 は少なくとも AGM 分散培養において未分化血球細胞の増殖を抑制していることが示された。浮遊細胞についても HIPK2 によるアポトーシスの誘導についての解析を行った。ウイルス感染 4 日後、AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞を回収し、annexin V と PI で染色した。GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞では GFP、HIPK2 WT、もしくは KD を過剰発現させたいずれの場合においても annexin V<sup>+</sup> 細胞の割合は PI<sup>+</sup> もしくは PI<sup>-</sup> において有意な差は見られなかった (図 8)。

### 第4節 HIPK2 の血球細胞分化に対する影響

AGM 分散培養でおこる血球細胞分化に対する HIPK2 の影響を解析した。未分化血球マーカーとして知られ、赤血球以外の血液細胞に発現している CD45 を解析の指標とし、フローサイトメトリーにより解析を行った。ウイルス感染 4

日後、AGM 分散培養で生じた浮遊細胞を抗 CD45 抗体を用いて染色し、GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞における CD45<sup>+</sup> 細胞の割合を解析した。HIPK2 WT を過剰発現させると、GFP を過剰発現させたときに比べて、およそ 1/4 という著しい CD45<sup>+</sup> 細胞の減少が検出された (図 9B と C; GFP と WT)。このことから HIPK2 は AGM 領域において CD45<sup>+</sup> 細胞の輩出に対して抑制的に働いていることが示唆された。

### 第 5 節 HIPK2 が含む血球分化における機能ドメインの解析

上述のように HIPK2 は AGM 分散培養において CD45<sup>+</sup> 細胞輩出に対して抑制的に働いていることが示されたが、この血球輩出阻害に必須な領域を検討するために KD、 $\Delta$ N、 $\Delta$ NAC、 $\Delta$ C、及び C term. の 5 種類の点変異体と欠失変異体を作成した (図 9A, 及び実験方法)。AGM 分散培養 2 日目にウイルスを感染させ、感染後 4 日目に生じた浮遊細胞を抗 CD45 抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。GFP<sup>+</sup> 細胞中の CD45<sup>+</sup> 細胞の割合に着目すると、GFP を導入した時と比べて HIPK2 WT、KD、及び  $\Delta$ N を導入した時に GFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> 血球細胞の輩出の阻害が見られた (図 9B 及び C)。HIPK2 KD を導入した場合でも WT と同様の阻害が見られたことから CD45<sup>+</sup> 血球細胞の輩出の抑制にはキナーゼ活性は必須ではないことが示唆された。一方、その抑制は  $\Delta$ NAC、 $\Delta$ C、及び C term. を導入した時には見られなかった (図 9B 及び C)。 $\Delta$ NAC と  $\Delta$ C は核移行シグナルがないので核に移行しないことが考えられた。また、C term. はキナーゼドメインが無いことが血球輩出を阻害しない理由と考えられた。これらの結果から HIPK2 の CD45<sup>+</sup> 血球細胞分化の抑制活性には HIPK2 が核に移行することと、キナーゼ活性は必要でないがキナーゼドメインが何らかの働きをすることが必要であることが示唆された。ここまでの結果から AGM 分散培養において HIPK2 は血管内皮様細胞含む付着細胞から CD45<sup>+</sup> 血球細胞の輩出に対して抑制的に働くこと、輩出された浮遊細胞がコロニーを形成することに対して抑制的に働くことが示された。

### 第 6 節 HIPK2 の血球前駆細胞に対する影響

次に浮遊細胞に含まれる増殖活性を持つ細胞画分について検討した。培養 7 日

目の AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞を、c-Kit と CD45 の発現量で展開すると、a: CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup>、b: CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>-</sup>、及び c: CD45<sup>high</sup>c-Kit<sup>low/-</sup> の 3 つの画分に加えて CD45<sup>-</sup> 細胞に分かれた (図 10A)。a、b、及び c の画分をそれぞれフローサイトメトリーで分取した後に OP9 ストローマ細胞上で培養すると、cobblestone 様の血球コロニーは a: CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 画分でのみ検出され、他の画分ではほとんど検出できなかった (図 10B)。この結果から、AGM 分散培養から輩出される浮遊細胞の中で CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 画分が増殖活性を持つ未分化な細胞集団であることが示唆された。GFP 及び HIPK2 WT レトロウイルスベクターを AGM 分散培養に導入した時に生じた浮遊細胞について、GFP<sup>+</sup> の浮遊細胞を  $3.0 \times 10^3$  個ずつ CD45 と c-Kit で展開した。HIPK2 WT を過剰発現させた場合、CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 画分は GFP を発現させた場合に比べて減少していた (図 11A)。この結果は AGM 領域において HIPK2 は未分化細胞の血球前駆細胞への分化に対して抑制的に働いていることが示唆された。また、ウイルス感染 4 日後の AGM 分散培養に含まれる浮遊細胞中の GFP<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞を分取し、OP9 ストローマ細胞上で培養すると、GFP を感染させた場合は GFP 陽性の血球コロニーが観察された。しかし、HIPK2 を過剰発現させた場合は GFP<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞由来の cobblestone 様の血球コロニーは著しく減少していた (図 12)。これらの結果は AGM 領域において HIPK2 は CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 血球細胞の増殖に対して抑制的に働いていることを示唆している。またそのために図 6 において GFP<sup>+</sup> 細胞が減少し、また浮遊細胞を培養しても HIPK2 を過剰発現させた場合は cobblestone 様の血球コロニーが形成されないと考えられた。

## 第 7 節 細胞内シグナル伝達に対する HIPK2 の影響

AGM 領域の細胞増殖には IL-6 ファミリーサイトカインによる刺激が関与していること、また HIPK2 は STAT3 のリン酸化因子として単離、同定されたので、HIPK2 の STAT3 との関わりについて解析した。AGM 分散培養に、STAT3 結合配列に luciferase 遺伝子を繋いだ SBSW8-GPLW-pGL3 (SBSW8) と共に HIPK2 変異体を導入し、IL-6 で刺激した後 luciferase 活性を測定した。SBSW8 と共に DN STAT3 を導入すると IL-6 で刺激したときに得られる高い luciferase 活性が得られないことが知られている (図 13; DN)。DN STAT3 の代わ

りに HIPK2 WT (図 13; 上段) もしくは HIPK2 KD (図 13; 下段) を、濃度を変えて導入したがいずれの場合も濃度の変化に伴った luciferase 活性は検出できなかった。次に、HIPK2 の MAP キナーゼ経路に対する影響を解析した。AGM 領域の細胞が増殖、または血球細胞へ分化するためには MAP キナーゼ経路を活性化する事は必須である。SCF、bFGF、及び IL-6 それぞれのサイトカインの下流で働く MAP キナーゼ経路に対する HIPK2 の機能を解析した。MAP キナーゼである ERK2 と HIPK2 を HEK293 細胞に導入し、サイトカインで刺激した場合の HIPK2 の ERK2 リン酸化への影響を解析した。SCF、bFGF、及び IL-6 それぞれのサイトカインで HEK293 細胞を刺激した場合の解析を行ったが、HIPK2 WT もしくは HIPK2 KD の有無で ERK2 リン酸化に変化を見出す事は出来なかった (図 14)。これらの結果から AGM 分散培養において、HIPK2 は JAK-STAT3 経路や MAP キナーゼ経路に影響を与えていない事が考えられた。

## 第4章 考察

HIPK2 は成体マウスでは筋肉、心臓、脾臓、精巣、小腸、皮膚、胸腺、胃、肺、腎臓、脳、及び肝臓で発現していることは知られていた (Giraud et al., 2004; Pierantoni et al., 2002)。また、胎生期マウスでは E12.5 の肝臓や脳に発現し、特に神経管や神経節における発現が認められる (Wiggins et al., 2004)。HIPK2 の胎仔肝臓における存在を示す報告は HIPK2 が胎生期造血に関わっていることを示唆しているが、これまでに解析はなされていなかった。胎仔肝臓で造血が認められる前段階に AGM 領域には HSCs は存在している (Godin and Cumano, 2002)。本研究において、HIPK2 は E10.5 及び E11.5 AGM 領域に発現していることが確認された (図 1)。さらに、AGM 分散培養から得られる浮遊細胞及び付着細胞にも発現が認められ、AGM 分散培養における HIPK2 の発現量は浮遊細胞よりも付着細胞の方が多かった (図 2A)。AGM 分散培養から検出された HIPK2 はおよそ 220kDa で、HIPK2 のアミノ酸配列から予想される分子量およそ 130kDa よりも大きかった (図 2B)。網膜細胞において High Mobility Group protein A1a (HMGA1a) と結合する因子を pull-down 法により精製して得られた内在性 HIPK2 の分子量も 220kDa であったことが報告されている (Okuda et al., 2006)。HIPK2 はリン酸化 (Aikawa et al., 2006) や SUMO 化 (Gresko et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Roscic et al., 2006) 等の修飾を受けることから、AGM 分散培養においても修飾されており、予想より大きなタンパク質が検出されたと考えられた。AGM 分散培養系では一組の異なる現象が同時に進行している。例えば血管内皮様細胞の血球細胞への分化と、その前駆細胞の増殖と分化である。本研究では HIPK2 WT 及び KD を過剰発現させても、GFP を過剰発現させたときに比べて付着細胞には形態的な変化やアポトーシスが誘導された細胞の割合の変化も検出されなかった (図 4A, 図 5A, B)。この実験から HIPK2 は血管内皮細胞を含む付着細胞の生存や増殖には影響を与えないことが示唆された。つまり、HIPK2 は付着細胞に含まれる血管内皮-血球共通前駆細胞から血球細胞への分化を抑制すると考えられた (図 15)。しかし、この実験系では AGM 領域に含まれる血管内皮前駆細胞から血管様構造を作り出すことがまだ出来ていないので、血管内皮細胞マーカーである VE-cadherin<sup>+</sup> 細胞などから起きる血管形成に HIPK2 が影響を与えていないことの証明は難しい。少なくとも HIPK2 を過剰発現させた AGM 分散培養で、アポトーシスが顕著になる現象は見られな

かった。また、図 2 では浮遊細胞の数倍量の HIPK2 が付着細胞において発現していることから、HIPK2 は血球細胞よりも血管内皮細胞において強く発現していることを示唆している。この結果は HIPK2 が血管内皮細胞から血球細胞への分化を抑制するという仮説と一致する。

HIPK2 が過剰発現した浮遊細胞は顆粒球、マクロファージ、及び赤血球に分化する能力を失い (図 7)、cobblestone 様の形態を持つコロニーを形成できなくなる (図 6, 12)。これらの結果は HIPK2 が血球前駆細胞から成熟した血液細胞へ分化することと、血球前駆細胞の増殖を抑制することを示唆している。サイクリン依存型リン酸化酵素抑制因子である p21<sup>waf</sup> は p53 の作用により発現し、細胞周期を抑制する (Budram-Mahadeo et al., 2002)。骨肉腫細胞株である U2OS 細胞において、HIPK2 は核内の promyelocytic leukemia (PML) ボディーに存在し、PML ボディ構成タンパク質である Sp100 及び p53 と相互作用することで p21<sup>waf</sup> の転写を活性化させる (Moller et al., 2003a; Moller et al., 2003b)。これらを併せて考えると、HIPK2 は造血を制御する転写因子の転写を抑制することにより浮遊細胞の増殖と分化を抑制することが示唆される。さらに AGM 分散培養において、HIPK2 は CD45<sup>+</sup> 血球細胞、特に血球前駆細胞である CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞の輩出を抑制する (図 10)。この結果は AGM 領域において HIPK2 は付着細胞から血球細胞への分化と血球細胞の増殖を抑制していることを示唆している (図 15)。

HIPK2 はセリン/スレオニンキナーゼで、p53 (Hofmann et al., 2002)、STAT3 (Matsuo et al., 2001)、JNK (Hofmann et al., 2003)、及び CtBP (Zhang et al., 2003) をリン酸化することが知られている。また、キナーゼドメインの他にも機能ドメインを持っている (図 9A) (Kim et al., 1999)。本研究で用いた AGM 分散培養では、CD45<sup>+</sup> 細胞輩出の抑制に HIPK2 のキナーゼドメインは必須であるが、キナーゼ活性は重要ではないことが示された (図 9B, C)。転写抑制因子 Nk-1 と HIPK2 相互作用において、両因子は標的因子の転写を抑えるが、その際 HIPK2 による Nk-1 のリン酸化は検出されない (Kim et al., 1998)。これらの結果は HIPK2 がキナーゼ活性を持たなくても抑制因子としての機能を持つことを示唆している。さらに、cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP) (Hofmann et al., 2002) や Daxx (Hofmann et al., 2003) の様な造血に関わっている因子は HIPK2 のキナーゼドメインに結合する。核移行シグナル 2 と 3、及びその他の C 末端側の機能ドメインを欠失させた HIPK2  $\Delta$ C を AGM 分散



培養に過剰発現させても血球細胞分化に影響は見られない (図 9B, C)。これらの結果、HIPK2 が核内で何れかの造血因子とキナーゼドメインが相互作用することによって血球細胞の分化を抑制していることが示唆される。

HIPK2 はアポトーシスに関わっていることが示されおり p53 の 46 番目のセリンをリン酸化することにより誘導されるという報告がある (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002)。E13.5 マウス胚において、HIPK2 は trigeminal ganglia や dorsal root ganglia に発現し、POU 転写因子 Brn3a と相互作用している。HIPK2 と Brn3a の相互作用は Brn3a 依存的な Bcl-xL の転写を活性化し、sensory neuron におけるアポトーシスの誘導を抑制する (Wiggins et al., 2004)。また、別の研究では HIPK2 は sensory neuron や sympathetic neuron におけるアポトーシスを誘導する (Doxakis et al., 2004)。Bcl-2 は AGM 領域に発現し、HSCs におけるアポトーシスの誘導を抑制する報告もある (Orelia et al., 2004)。これらの結果は HIPK2 が AGM 領域においてアポトーシスを誘導していることを連想させる。しかし、AGM 分散培養で得られる付着細胞における Bcl-2 及び Bcl-xL の発現量は HIPK2 の過剰発現の有無で変化しない (data not shown)。さらに AGM 分散培養に HIPK2 を過剰発現させても annexin V<sup>+</sup> 細胞の割合は変化しない (図 5, 8)。これらの結果により HIPK2 を過剰発現した AGM 分散培養における血球細胞の分化や、増殖にはアポトーシスは関与していないと考えられる。

AGM 分散培養で起こる造血は、細胞外因性因子である OSM、SCF、及び bFGF により促進され、少なくとも JAK-STAT 経路 (Mukoyama et al., 1998) や MAP キナーゼ経路 (Nobuhisa et al., 2003) は造血に必須である。JAK-STAT 経路について言えば、私が所属する研究室でも gp130 欠損マウスを解析し、AGM 領域で起こる CD45<sup>+</sup> 細胞の発生には gp130 による STAT3 のリン酸化が必須であることを明らかにしていた (Takizawa et al., 2003)。HIPK2 と STAT3 の相互作用を解析し、HIPK2 と STAT3 が直接結合していることも明らかにされている (Inoue-Mochita unpublished data)。しかし、AGM 分散培養における HIPK2 発現ベクターによる STAT3 のリン酸化の上昇や減少を見出すことができなかった。また、STAT3 で発現が制御されるプロモーターの活性に HIPK2 の過剰発現による変化は見出せなかった (図 13)。これまでの研究で、アダプタータンパク質 Lnk や MAP キナーゼ阻害因子 Spred-2 は MAP キナーゼ経路を阻害することにより、AGM 造血を抑制することが知られている (Nobuhisa et al., 2004;

Nobuhisa et al., 2003)。しかし、HIPK2 による ERK2 のリン酸化誘導やリン酸化の阻害を見出すことができなかった (図 14)。これらの結果は、MAPK 経路や JAK-STAT 経路が HIPK2 の標的ではないことが示唆される。転写因子 c-Myb、AML1、及び GATA-2 はマウス胚における HSCs の発生に必須であることが知られている。HIPK2 と GATA-2 の相互作用に関する報告はまだない。c-Myb は HIPK2 と Nemo-like kinase (NLK) と共に複合体を形成し、c-Myb 依存的な転写活性を抑制することが知られている。また、c-Myb と CBP は HSCs の発生に必須であることも知られている。さらに、HIPK2 は CBP と直接結合する。これらの現象は HIPK2 が CBP を介して c-Myb と共に造血を制御していることを支持している。これらの結果から HIPK2 はこれらの核タンパク質と相互作用することにより AGM 造血を制御していることが考えられる。AML1 に関しては今年になって HIPK1 及び HIPK2 の二重欠損マウスの解析と共に報告がなされた。HIPK1<sup>-/-</sup>HIPK2<sup>+/+</sup> マウスもしくは HIPK1<sup>+/+</sup>HIPK2<sup>-/-</sup> マウスでは正常に発生することから HIPK1 と HIPK2 は機能的に重複していると考えられている (Isono et al., 2006)。また、HIPK1<sup>-/-</sup>HIPK2<sup>-/-</sup> マウスでは E9.5 で血管形成が著しく阻害されており、血液細胞は発生してこない (Aikawa et al., 2006)。このとき HIPK2 は AML1 や CBP をリン酸化することも示されている。AML1 を欠損させた AGM 領域を分散培養した場合、血球細胞の輩出は見られないが、血管内皮細胞には影響はない (Mukouyama et al., 2000)。本研究では E11.5 AGM 領域を用い、形成された血管内皮様細胞を含む付着細胞に HIPK2 を過剰発現させると血球細胞への分化を抑制したが、付着細胞への影響は検出できなかった。このことは HIPK2 は血管形成に必須な遺伝子であり、血管内皮細胞への分化を促進し、血球系細胞への分化を抑制していることも考えられる。

結論として、AGM 分散培養において HIPK2 は血液細胞の分化段階全てと増殖に対して抑制的に働いていると考えられた。今後のさらなる研究が AGM 領域において HIPK2 が作用するタイミングや抑制機構の詳細が明らかになると期待される。

## 結語

胎生期造血において必須な転写因子 STAT3 をリン酸化する因子として HIPK2 は単離されていた。しかし、その発生段階における機能や造血細胞の分化については全く未知の部分であった。そこで本研究では HIPK2 の胎生期造血細胞分化における機能を明らかにするため、HIPK2 を AGM 分散培養に過剰発現した場合における 1. 血球細胞の輩出に対する影響、2. HIPK2 の機能ドメインの解析、3. 輩出された浮遊細胞の増殖や分化についての解析、及び 4. 細胞内シグナル制御因子との相互作用の解析を行い以下の結果を得た。

1 については以下の事柄を明らかにした。

- 付着細胞の形態に変化は認められず、アポトーシスの誘導も検出できない
- 輩出される浮遊細胞は HIPK2 の過剰発現により減少する
- HIPK2 は CD45<sup>+</sup> 細胞の輩出を抑制する
- 血球前駆細胞 CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞の輩出を抑制する

2 については以下の事柄を明らかにした。

- HIPK2 のキナーゼ活性は血球細胞輩出抑制に必須ではない
- キナーゼドメインは HIPK2 の機能に必要
- 核移行シグナルも重要

3 については以下の事柄を明らかにした。

- HIPK2 が過剰発現した浮遊細胞は cobblestone 様のコロニー形成能を失う
- HIPK2 はマクロファージ、顆粒球、及び赤血球コロニー形成を抑制する
- HIPK2 が過剰発現した CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞もコロニー形成能を失う

4 については以下の事柄を明らかにした。

- HIPK2 は AGM 分散培養において STAT3 依存的な転写活性に影響は検出できなかった
- MAP キナーゼのリン酸化に対する HIPK2 の影響は検出できなかった

胎生初期から成体にかけて HIPK2 mRNA は広範な組織で発現し、重要な役割を

担っている。この分子の作用機構を明らかにすることにより造血系の細胞系譜構築に対する理解が深まる。また細胞外からの遺伝子操作により細胞運命を操作できるのならば機能が失われた組織の再生につながる可能性もある。

## 参考文献

- Aikawa, Y., Nguyen, L. A., Isono, K., Takakura, N., Tagata, Y., Schmitz, M. L., Koseki, H., and Kitabayashi, I. (2006). Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* 25, 3955-3965.
- Budram-Mahadeo, V., Morris, P. J., and Latchman, D. S. (2002). The Brn-3a transcription factor inhibits the pro-apoptotic effect of p53 and enhances cell cycle arrest by differentially regulating the activity of the p53 target genes encoding Bax and p21(CIP1/Waf1). *Oncogene* 21, 6123-6131.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., and Soddu, S. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 4, 11-19.
- Doxakis, E., Huang, E. J., and Davies, A. M. (2004). Homeodomain-interacting protein kinase-2 regulates apoptosis in developing sensory and sympathetic neurons. *Curr. Biol.* 14, 1761-1765.
- Giraud, S., Diaz-Latoud, C., Hacot, S., Textoris, J., Bourette, R. P., and Diaz, J. J. (2004). US11 of herpes simplex virus type 1 interacts with HIPK2 and antagonizes HIPK2-induced cell growth arrest. *J. Virol.* 78, 2984-2993.
- Godin, I., and Cumano, A. (2002). The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 593-604.
- Gresko, E., Moller, A., Roscic, A., and Schmitz, M. L. (2005). Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1293-1299.
- Hofmann, T. G., Jaffray, E., Stollberg, N., Hay, R. T., and Will, H. (2005). Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J. Biol. Chem.* 280, 29224-29232.
- Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and

- Schmitz, M. L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat. Cell Biol.* *4*, 1-10.
- Hofmann, T. G., Stollberg, N., Schmitz, M. L., and Will, H. (2003). HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.* *63*, 8271-8277.
- Isono, K., Nemoto, K., Li, Y., Takada, Y., Suzuki, R., Katsuki, M., Nakagawara, A., and Koseki, H. (2006). Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2758-2771.
- Kanei-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., Matsumoto, K., and Ishii, S. (2004a). Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* *18*, 816-829.
- Kanei-Ishii, C., Nomura, T., Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., and Ishii, S. (2004b). Differential sensitivity of v-Myb and c-Myb to Wnt-1-induced protein degradation. *J. Biol. Chem.* *279*, 44582-44589.
- Kim, Y. H., Choi, C. Y., and Kim, Y. (1999). Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *96*, 12350-12355.
- Kim, Y. H., Choi, C. Y., Lee, S. J., Conti, M. A., and Kim, Y. (1998). Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J. Biol. Chem.* *273*, 25875-25879.
- Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K., and Taga, T. (2001). A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J. Immunol. Methods* *247*, 141-151.
- Minegishi, N., Suzuki, N., Yokomizo, T., Pan, X., Fujimoto, T., Takahashi, S., Hara, T., Miyajima, A., Nishikawa, S., and Yamamoto, M. (2003). Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* *102*, 896-905.
- Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T. G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2003a). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res.* *63*, 4310-4314.

- Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T. G., Staeger, H., Gresko, E., Ludi, K. S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2003b). Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression. *Oncogene* 22, 8731-8737.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7, 1063-1066.
- Mukoyama, Y., Chiba, N., Hara, T., Okada, H., Ito, Y., Kanamaru, R., Miyajima, A., Satake, M., and Watanabe, T. (2000). The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev. Biol.* 220, 27-36.
- Mukoyama, Y., Chiba, N., Mucenski, M. L., Satake, M., Miyajima, A., Hara, T., and Watanabe, T. (1999). Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb. *Curr. Biol.* 9, 833-836.
- Mukoyama, Y., Hara, T., Xu, M., Tamura, K., Donovan, P. J., Kim, H., Kogo, H., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8, 105-114.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.
- Nobuhisa, I., Kato, R., Inoue, H., Takizawa, M., Okita, K., Yoshimura, A., and Taga, T. (2004). Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. *J. Exp. Med.* 199, 737-742.
- Nobuhisa, I., Takizawa, M., Takaki, S., Inoue, H., Okita, K., Ueno, M., Takatsu, K., and Taga, T. (2003). Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8486-8494.
- Okuda, H., Manabe, T., Yanagita, T., Matsuzaki, S., Bando, Y., Katayama, T., Wanaka, A., and Tohyama, M. (2006). Novel interaction between HMGA1a and StIP1 in murine terminally differentiated retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 81-87.
- Orelia, C., Harvey, K. N., Miles, C., Oostendorp, R. A., van der Horn, K., and Dzierzak, E. (2004). The role of apoptosis in the development of AGM hematopoietic stem

- cells revealed by Bcl-2 overexpression. *Blood* *103*, 4084-4092.
- Pierantoni, G. M., Bulfone, A., Pentimalli, F., Fedele, M., Iuliano, R., Santoro, M., Chiariotti, L., Ballabio, A., and Fusco, A. (2002). The homeodomain-interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 942-947.
- Roscic, A., Moller, A., Calzado, M. A., Renner, F., Wimmer, V. C., Gresko, E., Ludi, K. S., and Schmitz, M. L. (2006). Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2. *Mol. Cell* *24*, 77-89.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* *89*, 981-990.
- Sugiyama, D., Arai, K., and Tsuji, K. (2005). Definitive hematopoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells in the mouse embryo. *Stem Cells Dev.* *14*, 687-696.
- Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T., and Taga, T. (2003). Requirement of gp130 signaling for the AGM hematopoiesis. *Exp. Hematol.* *31*, 283-289.
- Tanaka, M., Zheng, J., Kitajima, K., Kita, K., Yoshikawa, H., and Nakano, T. (2004). Differentiation status dependent function of FOG-1. *Genes Cells* *9*, 1213-1226.
- Vishalakumar, S., Patel, H., Moharita, A. L., Harrison, J. S., and Rameshwar, P. (2006). The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor. *Cell. Signal.* *18*, 422-432.
- Wiggins, A. K., Wei, G., Doxakis, E., Wong, C., Tang, A. A., Zang, K., Luo, E. J., Neve, R. L., Reichardt, L. F., and Huang, E. J. (2004). Interaction of Brn3a and HIPK2 mediates transcriptional repression of sensory neuron survival. *J. Cell Biol.* *167*, 257-267.
- Zhang, Q., Nottke, A., and Goodman, R. H. (2005). Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *102*, 2802-2807.
- Zhang, Q., Yoshimatsu, Y., Hildebrand, J., Frisch, S. M., and Goodman, R. H. (2003). Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by



downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell* 115, 177-186.

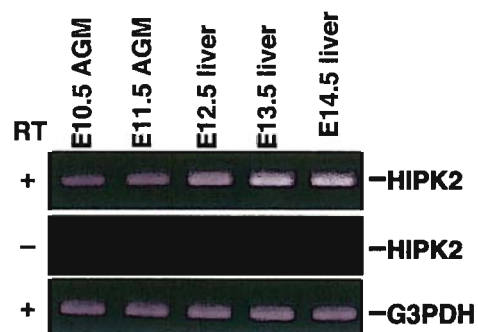
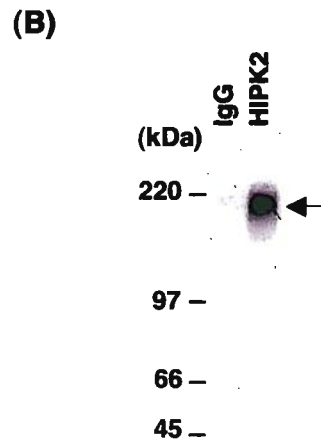
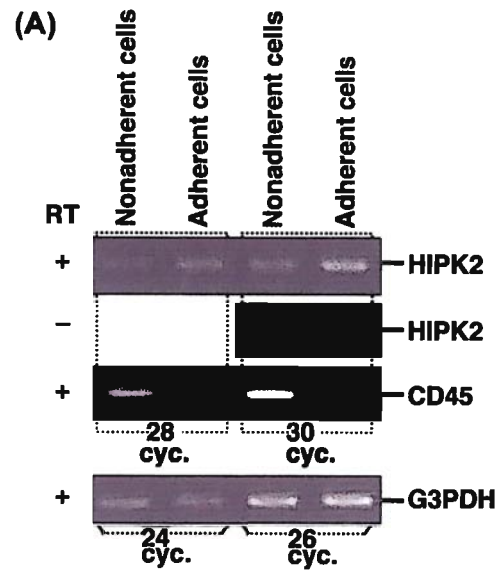


図1 胎生期マウスの造血組織における HIPK2 mRNA の検出 (A) E10.5、E11.5 AGM 領域と E12.5、E13.5、及び E14.5 肝臓から total RNA を抽出し、RT-PCR で検出した。



**図2 AGM 分散培養に含まれる細胞内における HIPK2 の検出** (A) 培養 7 日目の付着細胞及び浮遊細胞から RNA を抽出し RT-PCR によりそれぞれの遺伝子を検出した。(B) 培養 7 日目の AGM 領域に含まれる付着細胞を溶解し、抗マウス IgG 抗体と抗 HIPK2 抗体を用いて免疫沈降後 Western blotting により検出した。

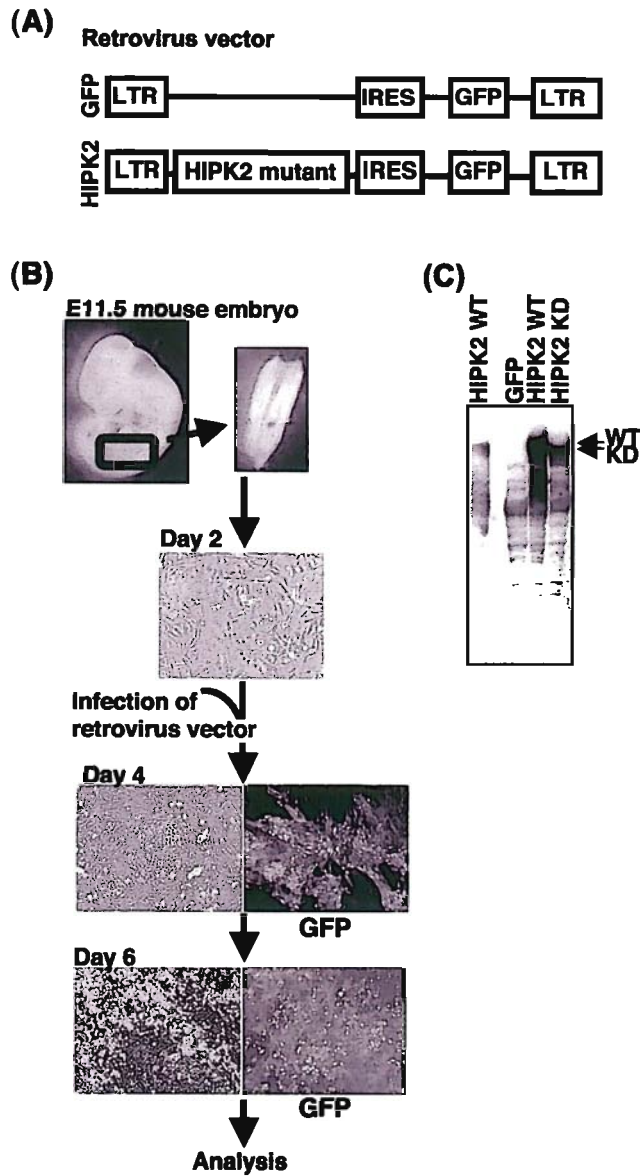
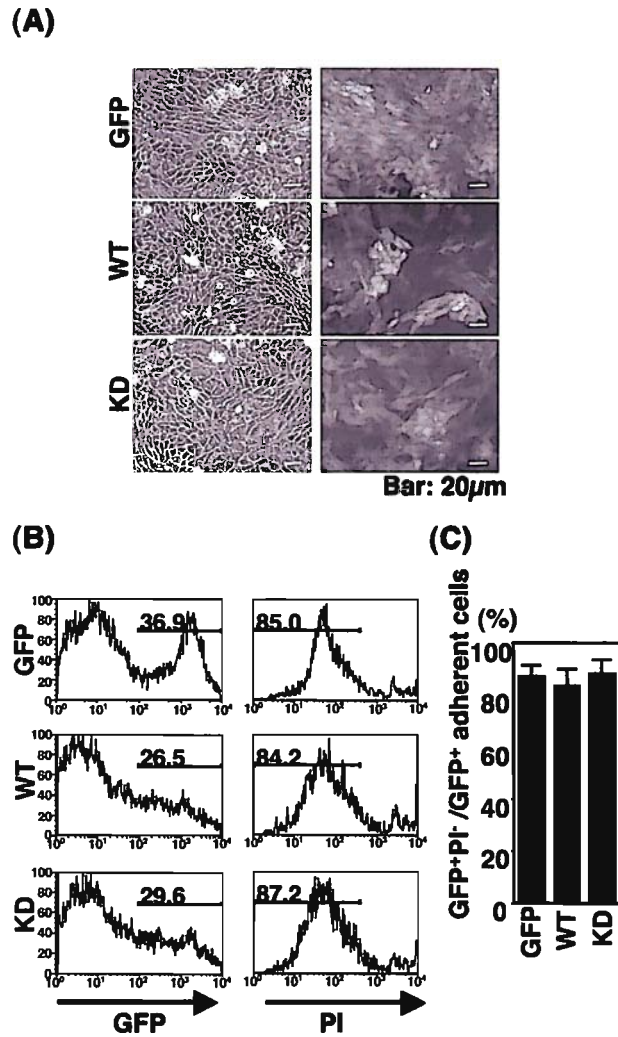
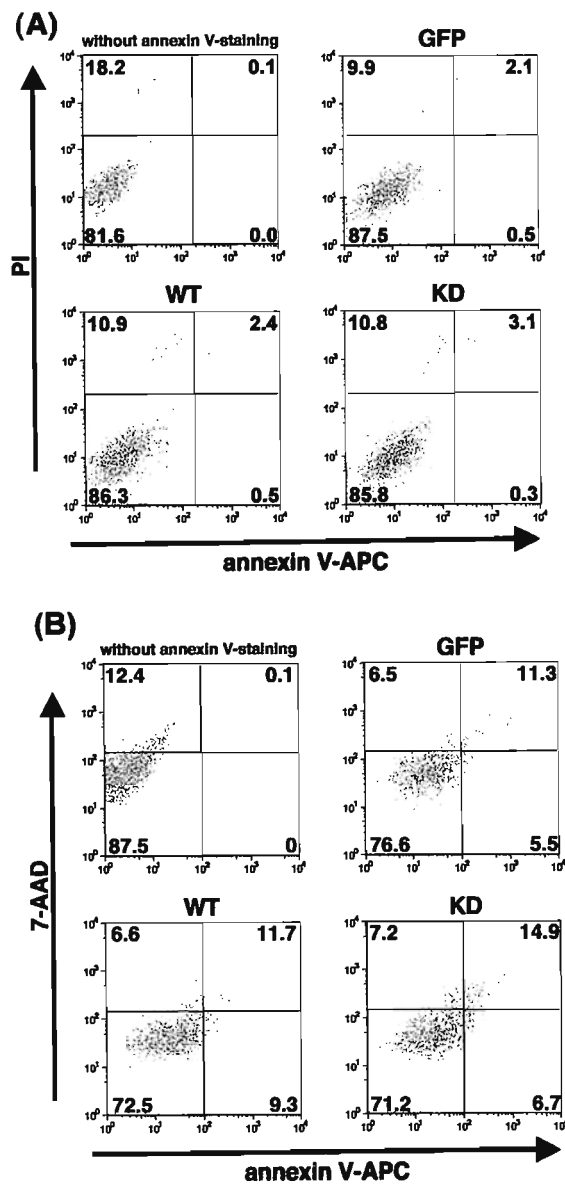


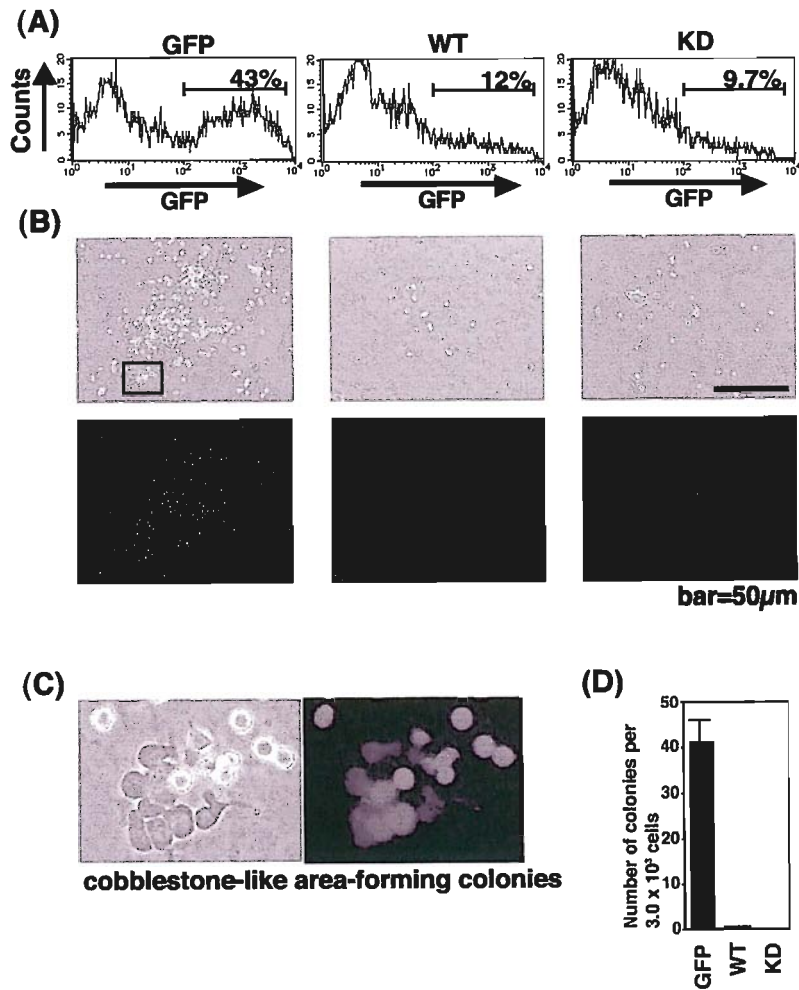
図3 AGM 分散培養へのレトロウイルス感染の概要 (A) pMY-IRES-EGFP を元に作成した発現ベクターのコンストラクトの模式図 (B) PLAT-E 細胞にベクターを導入した 48 時間後、上清を回収した。上清に  $1 \mu\text{g/ml}$  polybrene を加えたものをウイルス溶液とし、培養 2 日目の AGM 分散培養に加えた。ウイルス感染後 4 日目に含まれる細胞を解析した。(C) A のコンストラクトを導入した PLAT-E 細胞 (左から 1 レーン目) と、作成したウイルスを感染させた AGM 分散培養を溶解したサンプル (右側 3 レーン) を抗 HIPK2 抗体を用いて Western blotting を行った。矢印は検出された HIPK2 変異体を示している。



**図4 HIPK2 を過剰発現させた AGM 分散培養に含まれる付着細胞の PI 陰性率**  
 (A) ウイルス感染 4 日後の AGM 分散培養に含まれる付着細胞を透過光 (左) 及び蛍光 (右) で観察し、形態を示した。(B) ウイルスを感染させた付着細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性率 (左) と GFP<sup>+</sup> 細胞の PI 陰性率 (右) を解析した。(C) GFP<sup>+</sup> 付着細胞における PI 陰性率をグラフに示した。(n=4)



**図5** レトロウイルスを感染させた AGM 分散培養における annexin V<sup>+</sup> 付着細胞の検出 (A) ウイルス感染 4 日後の AGM 分散培養から付着細胞を回収し、PI 及び annexin V で染色した。フローサイトメトリーを用いて GFP<sup>+</sup> 細胞中における annexin V<sup>+</sup> 細胞を検出し、割合を示した。(B) 同様に、ウイルス感染 4 日後の AGM 分散培養から付着細胞を回収し、7-AAD 及び annexin V で染色した。フローサイトメトリーを用いて GFP<sup>+</sup> 細胞中における annexin V<sup>+</sup> 細胞を検出し、割合を示した。



**図6** レトロウイルスを感染させた浮遊細胞のコロニー形成能 (A) ウイルス感染後 4 日目の AGM 分散培養から輩出された浮遊細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。ウイルスを感染させた浮遊細胞の GFP 陽性率を数字で示した。(B)  $3.0 \times 10^3$  個の GFP+ 浮遊細胞を SCF と IL-3 存在下で 3 日間ストローマ細胞上で培養した図。下段は蛍光で観察した図。(C) GFP を感染させた浮遊細胞を培養したときに出てきた cobblestone 様コロニーの拡大図。右のパネルは蛍光で観察した図。(D) 形成された 10 細胞以上からなるコロニーの数をグラフで示した。(n=3)

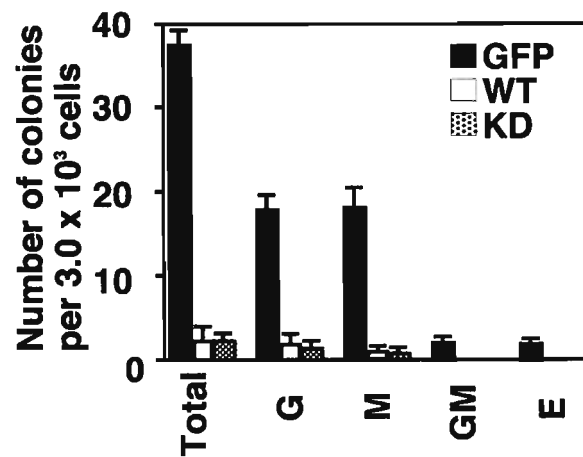
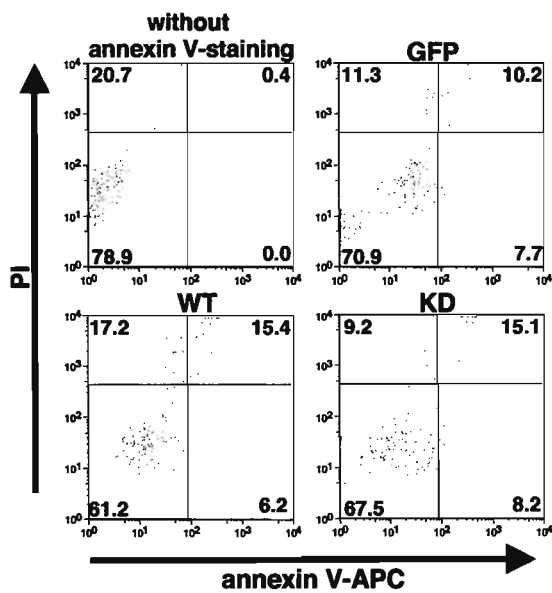


図7 レトロウイルスを感染させた **AGM** 分散培養に含まれる浮遊細胞の血球コロニー形成能 ウイルス感染後 4 日目の **AGM** 分散培養から輩出された  $3.0 \times 10^3$  個の **GFP**<sup>+</sup> 浮遊細胞を分取し、半固形培地 **Methocult**<sup>TM</sup> 中で培養した。培養 4 日後にコロニーの構成細胞を観察し、それぞれのコロニーの数をグラフに示した。





**図8** レトロウイルスを感染させた **AGM** 分散培養における **annexin V<sup>+</sup>** 浮遊細胞の検出 (A) ウイルス感染後 4 日目の **AGM** 分散培養から浮遊細胞を回収し、**PI** 及び **annexin V** で染色した。フローサイトメトリーを用いて **GFP<sup>+</sup>** 細胞中における **annexin V<sup>+</sup>** 細胞を検出し、割合を示した。

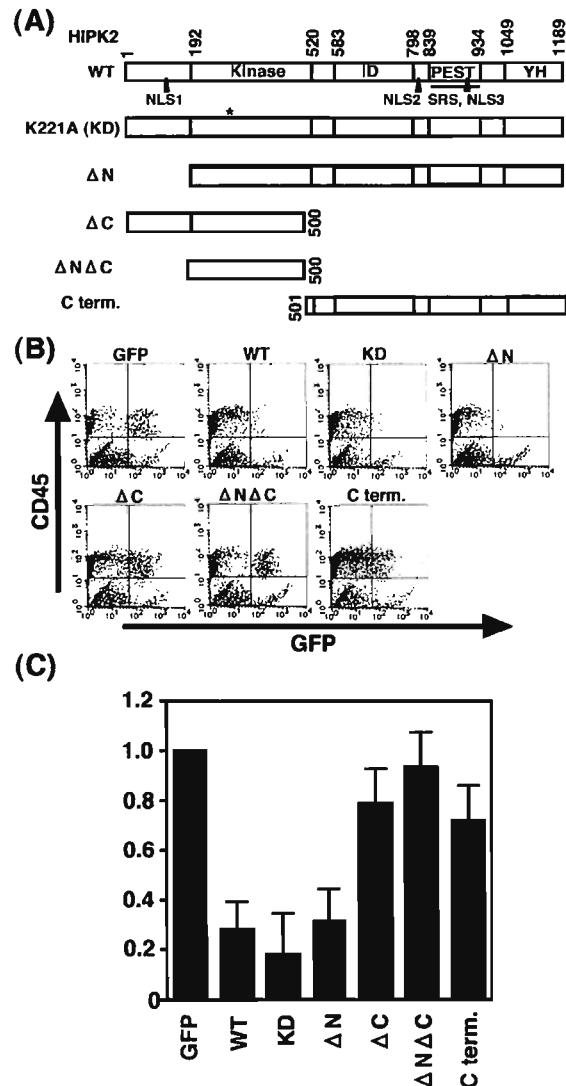
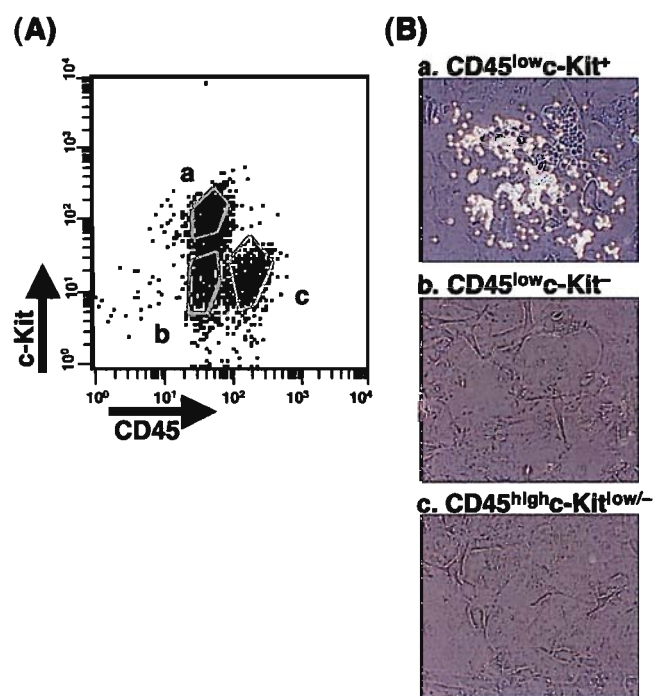


図9 レトロウイルスを感染させた AGM 分散培養で輩出された浮遊細胞に含まれる CD45<sup>+</sup> 細胞の検出 (A) 解析に用いた HIPK2 変異体の構造を模式的に示した。kinase: キナーゼドメイン ID: ホメオドメイン結合ドメイン PEST: PEST 配列 YH: チロシン/ヒスチジンリッチドメイン NLS: 核移行シグナル (B) ウイルス感染後 4 日目の AGM 分散培養から浮遊細胞を回収し、抗 CD45 抗体で染色した後にフローサイトメトリーを用いて解析した。CD45 と GFP の発現量で展開した図を示した。(C)  $1.0 \times 10^4$  個の浮遊細胞を解析し、GFP<sup>+</sup> 細胞中の CD45<sup>+</sup> 細胞の割合を示した。GFP のみを導入した時の GFP<sup>+</sup> 細胞中の CD45<sup>+</sup> 細胞の割合を 1 とし、他の変異体を導入した時の値を示した。(n=3)



**図10 浮遊細胞のコロニー形成能** (A) AGM 分散培養で生じた浮遊細胞を CD45 及び c-Kit の発現レベルで展開した図。(B) A で示した 3 つの画分を各々 200 個ずつ分画し、ストローマ細胞である OP9 上で IL-3 と SCF を含む培地中で培養した時に形成されたコロニーの図。

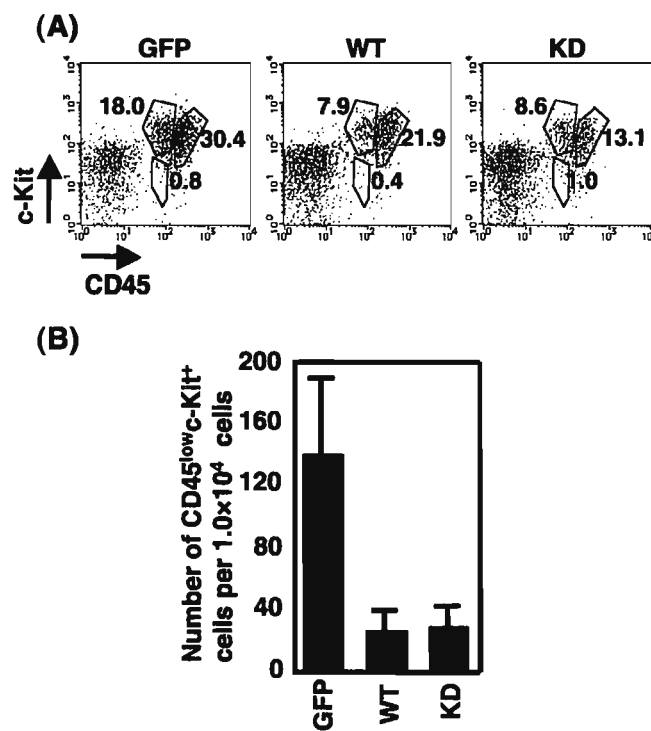
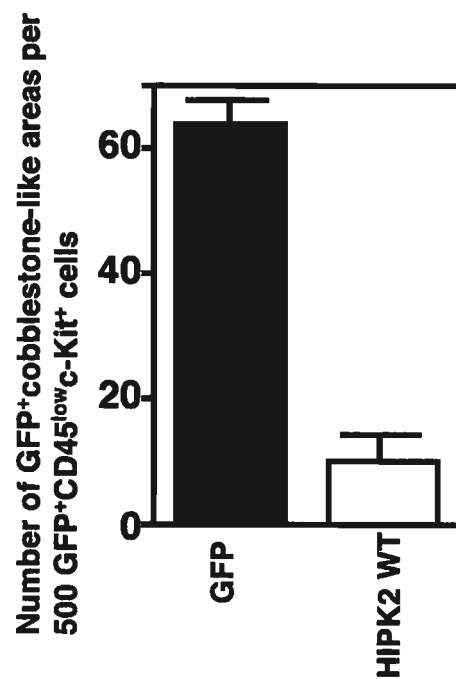
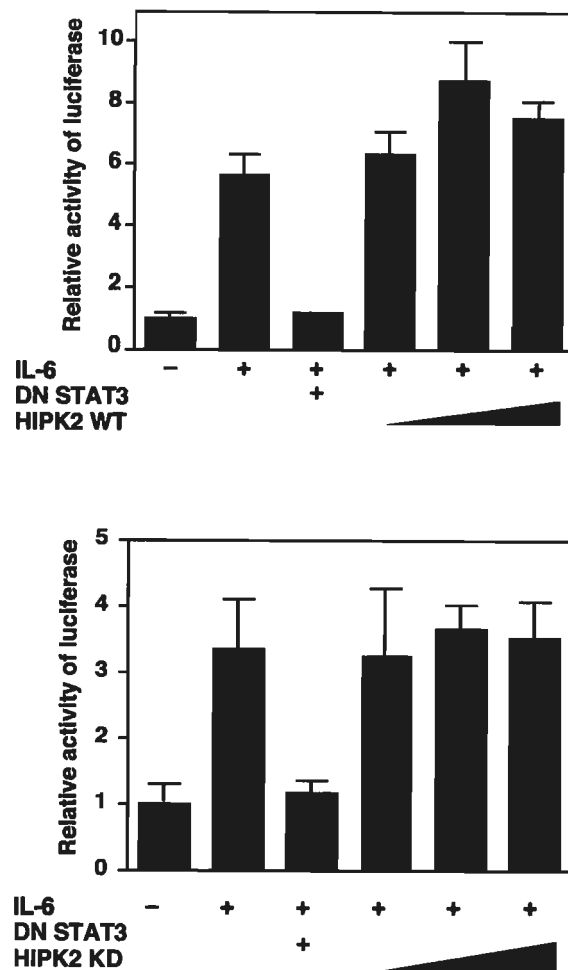


図11 レトロウイルスを感染させた AGM 分散培養における CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞画分の変化 (A) ウイルス感染後 4 日目の AGM 分散培養から生じた  $3.0 \times 10^3$  個の GFP<sup>+</sup> 浮遊細胞を、CD45 及び c-Kit で展開した図。(B)  $1.0 \times 10^4$  個の浮遊細胞をに含まれる GFP<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞の個数をグラフで示した。(n=4)



**図12** レトロウイルスを感染させた **AGM** 分散培養における **CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup>** 細胞画分のコロニー形成能 ウイルス感染後 5 日目の **AGM** 分散培養から生じた浮遊細胞から、フローサイトメトリーを用いて **GFP<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup>** 細胞を分取し、**OP9** ストローマ細胞上で培養した。培養 4 日後に **GFP<sup>+</sup> cobblestone** 様の形態を持つコロニーを数え、グラフに示した。



**図13 STAT3 依存的な転写活性に対する HIPK2 の影響** 培養 1 日目の AGM 分散培養に、SBSW8-GPLW-pGL3、内部コントロール用の pEF-RLuc、及び HIPK2 WT (上段) または HIPK2 KD (下段) をそれぞれ 10、30、100 ng 導入した。翌日サイトカインを除き、さらに 24 時間後、IL-6/sIL-6R で 6 時間刺激した時の luciferase 活性を測定した。コントロールとして DN STAT3 を導入した時の活性も測定した。

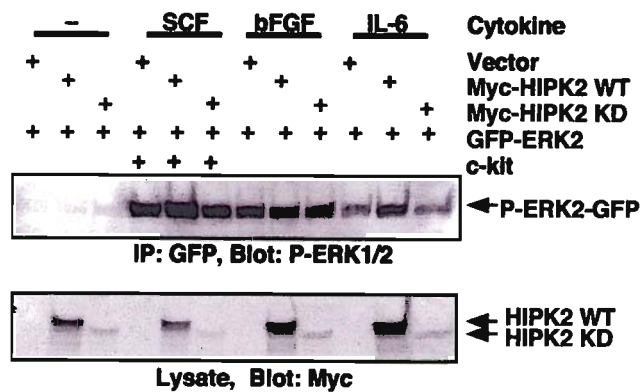


図14 ERK2 リン酸化における HIPK2 の影響  $1.0 \times 10^6$  個の HEK293 細胞に Myc-HIPK2 と c-kit、GFP-ERK2 を各  $1 \mu\text{g}$  ずつ導入した。100 ng/ml SCF、1 ng/ml bFGF、もしくは 100 ng/ml IL-6/IL-6R で 5 分間刺激した細胞を回収し、抗 GFP 抗体で免疫沈降したサンプルを抗リン酸化 ERK2 抗体で Western blotting を行った。

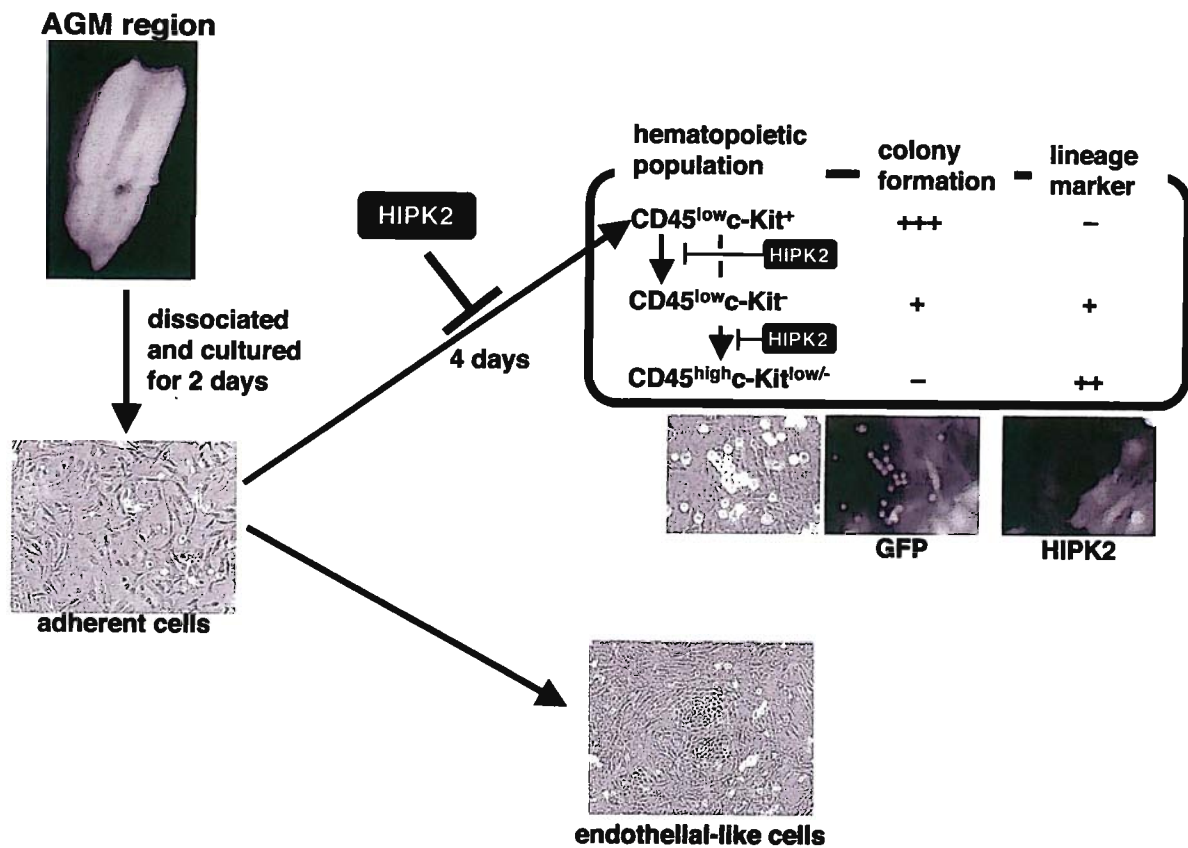


図15 AGM 造血における HIPK2 の作用点の模式図 AGM 分散培養において、HIPK2 は付着細胞が CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞への分化と、浮遊細胞に含まれる CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>-</sup> 細胞が血球コロニーを形成することを抑制することを模式的に示した。