



Title	GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21WAF1 and p27Kip1 proteins
Author(s)	江副, 幸子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43874">https://hdl.handle.net/11094/43874</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	江副幸子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17639号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21 <sup>WAF1</sup> and p27 <sup>Kip1</sup> proteins. (GATA-2/エストロゲン受容体キメラ分子によるp21 <sup>WAF1</sup> とp27 <sup>Kip1</sup> の蛋白蓄積を介した造血細胞のサイトカイン依存性増殖に及ぼす影響)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### 目的

GATA-2は造血幹細胞においてその発現が強く認められる転写因子であり、ノックアウトマウスを用いた解析から、胎児肝における成体型の造血に必須であることが証明されている。一方では、GATA-2が造血細胞の増殖を抑制するとの報告もなされている。本研究ではGATA-2が造血細胞の増殖や細胞周期制御に及ぼす影響について検討を行った。

#### 方法ならびに成績

マウスIL-3依存性細胞株Ba/F3、FDCP-1にestradiolによってGATA-2の活性が誘導されるGATA-2とエストロゲン受容体のキメラ分子GATA-2/ERを導入し、これらのクローンにおけるGATA-2のIL-3依存性増殖に及ぼす影響を検討し、さらに細胞内での増殖に関わる分子群の発現について解析した。

GATA-2/ERを導入したBa/F3/GATA-2/ER、32D/GATA-2/ER、FDC-P1/GATA-2/ERの細胞株をそれぞれIL-3存在下で培養した。エストラジオール非存在下ではそれぞれの親株と同様の増殖を示したが、エストラジオールによるGATA-2活性の誘導により、それらの増殖は完全に抑制された。また、DNA content解析ではエストラジオール処理によりS期の細胞の減少を認めた。

GATA-2によって誘導される増殖抑制のメカニズムを明らかにするために増殖に関与する分子の発現をノザンプロットにより解析した。エストラジオール添加4時間後にはc-mycの発現低下を認め、それについてCDK4、cyclin A、cyclin BのmRNAの発現低下をみとめたが、CDK2、CDK6、cyclinD2、cyclinD3の発現に明らかな変化を認めなかつた。また、増殖抑制因子であるp21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>をはじめとするCDK inhibitor(p16<sup>INK4A</sup>、p15<sup>INK4B</sup>、p18<sup>INK4C</sup>、p19<sup>INK4D</sup>、p57<sup>Kip2</sup>)、p19<sup>ARF</sup>、p53のmRNAの発現に変化はなかつた。次に、ウェスタンプロット法によりp21<sup>WAF1</sup>とp27<sup>Kip1</sup>の蛋白の発現量について検討したところ、Ba/F3/GATA-2/ER、FDC-P1/GATA-2/ERいずれのクローンにおいてもエストラジオール添加により、これらの蛋白量の増加を認めた。さらにHiston H1をもちいたkinase assayによりCDK2の活性低下を認めた。

<sup>35</sup>S-methionine でラベルした Ba/F3/GATA-2/ER、FDC-P1/GATA-2/ER の細胞においてエストラジオール存在下、非存在下での p21、p27 の半減期を調べたところ、エストラジオール存在下ではいずれの蛋白の半減期も著明に延長していた。さらに p21<sup>WAF1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の Ubiquitin/Proteasome 系を介した蛋白分解において中心的役割を担う ubiquitin ligase の構成分子である SKP1、SKP2、Cul1 の mRNA の発現について調べたところ、いずれもエストラジオール存在下で発現低下を認めた。

次に GATA-2/ER を導入した Ba/F3 細胞にさらに c-myc、CDK2、CDK4、CDK6 を過剰発現させたところ c-myc、CDK2、CDK4 の過剰発現により、エストラジオールによる増殖抑制をそれぞれ 90%、40%、20% 解除したが、CDK6 の過剰発現では影響を認めなかった。さらに c-myc を過剰発現した細胞株では CDK4、Skp2、Cul1 の mRNA の発現がエストラジオール添加によっても維持されており、p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の蛋白蓄積も解除されていた。

以上の結果より、GATA-2 による細胞増殖抑制の主な原因是 c-myc の発現低下とそれによる CDK4、Cul1 の発現抑制、p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の蛋白蓄積であると考えられた。

また、野生型 GATA-2 および GATA-2/ER をマウス骨髄細胞にレトロウイルスを用いて感染させ、GATA-2 マウス正常造血細胞のサイトカイン (IL-3、SCF、IL-6) 依存性増殖に及ぼす影響を検討した。5-FU で処理したマウス骨髄細胞より Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> の単核球を分離し GATA-2/ER を含むレトロウイルス pMX-GATA-2/ER-neo と含まない Mock の vector pMX-neo をそれぞれ感染させ、neomycin により感染細胞を選択し、解析した。MTT assay ではエストラジオール添加により GATA-2/ER 感染細胞の約 75% の増殖抑制を認めた。また、半定量的 RT-PCR により感染細胞における c-myc、Skp2、Cul1 の発現量を検討したところ、細胞株におけると同様エストラジオールによりこれらの mRNA の発現低下を認めた。さらに、ウェスタンプロット法ではエストラジオールによる p21、p27 の蛋白蓄積をも認めた。

静止期にあると考えられる正常造血前駆細胞 (Lin<sup>-</sup>) を mSCF、IL-3、IL-6 FLT3 ligand 存在下で培養し細胞周期に導入する過程で、GATA-2 の蛋白発現が低下することを確認した。

## 総括

GATA-2 はマウス造血細胞株の IL-3 依存性増殖を抑制した。GATA-2 による増殖抑制の過程で、c-myc の発現低下が大きく関与していた。c-myc の発現低下は、CDK4、Cul1 の発現抑制を介して p21、p27 の蛋白蓄積を誘導し、増殖抑制をもたらすものと考えられた。また、正常造血前駆細胞においてもエストラジオールによる GATA-2 の活性誘導が細胞株におけると同様に c-myc の発現低下を介した一連の増殖抑制をもたらした。また、正常造血前駆細胞が、静止期から増殖期に移行する過程で GATA-2 の蛋白量の減少を認めたことより、GATA-2 は造血幹細胞、前駆細胞の静止期の維持に関与しているものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、造血幹/前駆細胞に強く発現される転写因子 GATA-2 が細胞増殖に及ぼす影響について解析が行われた。その結果、GATA-2 が各種の細胞株や正常造血幹細胞に増殖抑制をもたらすことが明らかとされた。更に、その分子機構として、GATA-2 が c-myc の発現を低下させることにより p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の発現量を増加させることが明らかとなった。また、本研究の結果、細胞周期に入った造血幹/前駆細胞では GATA-2 の発現が低下することが明らかにされた。この結果から、造血幹/前駆細胞が増殖するためには GATA-2 の発現が低下することが必要である可能性が推測された。

最近、p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> それぞれのノックアウトマウスを用いた解析から、両分子がそれぞれ造血幹細胞、造血前駆細胞を休止期に維持することにより、個々の細胞集団の枯渇を防いでいることが明らかとなった。これまで造血幹/前駆細胞における p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の発現調節機構が不明であったが、本研究の結果、GATA-2 が、両分子の発現量を調節することが明らかとなった。

以上の結果より、GATA-2 が造血幹/前駆細胞の休止期の維持及び両細胞集団の維持に深く関わることが明らかとな

った。

本研究は、造血幹細胞の最も重要な生物学的特性を担う細胞周期制御における GATA-2 の機能を明らかにしたという点で、高い学術的価値を有している。更に、本研究結果は、現在臨床応用に向けて精力的に行われている“造血幹細胞の *in vitro* での増幅の試み”に対して極めて示唆に富む有用な知見を供するものであり、学位に値する研究と考えられる。