

Title	Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells
Author(s)	郑, 洁
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46262
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	鄭 浩
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20095 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	Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells (転写因子 GATA-1 による赤血球系細胞の増殖・分化調節機構)
論文審査委員	(主査) 教授 仲野 徹 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 金倉 謙

論文内容の要旨

[目的]

血液細胞の増殖と分化は、多くの転写因子により制御されている。Zinc finger 型転写因子 GATA-1 は、赤血球の分化に必須であり、赤血球固有の生理機能を担う遺伝子群の発現を制御している。GATA-1 欠損マウスでは、成熟赤血球が産生できず、貧血により胎生致死になることが報告されている。しかし、GATA-1 が赤血球系細胞の増殖・分化においてどのように機能するかについては、その多くが不明なまま残されている。本研究では、GATA-1 を欠損させたマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を試験管内において赤血球へと分化誘導をおこない、その過程において GATA-1 をコンディショナルに発現させることにより、赤血球系細胞の増殖および分化における GATA-1 の機能を詳細に解析した。

[方法ならびに成績]

GATA-1 の発現を完全に制御するために、GATA-1 欠損 ES 細胞とテトラサイクリンによりコンディショナルな GATA-1 発現誘導システム (Tet-off system) を組み合わせた ES 細胞株を樹立した。得られた ES 細胞株は、テトラサイクリン存在下では GATA-1 は発現していないが、テトラサイクリン除去後 4 時間で GATA-1 を発現し始める。この ES 細胞株は、テトラサイクリン存在下では、中胚葉系への分化能および顆粒球・マクロファージへの分化能を有していたが、赤血球系の分化は阻害され、従来報告された GATA-1 欠損細胞の表現型と一致していた。OP9 システムによる試験管内での血液細胞への分化誘導においては、個体発生における血液細胞の発生と同様に、一次造血と二次造血を再現することができる。そこで、この ES 細胞株を用いて OP9 システムによる分化誘導をおこない、一次造血における胚型赤血球、二次造血における成体型赤血球の分化における GATA-1 の機能解析を行った。

1) 胚型赤血球分化における GATA-1 の機能

分化誘導開始から 8 日目 (day 8) では、野生型 ES 細胞からは一次造血由来の胚型赤血球が観察される。フローサイトメーターによる解析および形態的な観察から、GATA-1 の欠損により、前赤芽球の段階において分化が阻害され

ていることが見出された。また、細胞数は、コントロールの 1/5 程度に減少していた。GATA-1 欠損細胞に day 5 から GATA-1 を持続的に発現させると、分化阻害および細胞数減少が完全に回復した。しかし、day 5 から 1 日間のみ GATA-1 を一過的に発現させたところ、細胞数の減少はほぼ完全に回復したが、成熟胚型赤血球への分化回復は、不完全であった。

2) 二次赤血球発生における GATA-1 の機能

一次造血由来の胚型赤血球は、day 8 以降急速に死滅し、day 12 では、二次造血由来の成体型赤血球が観察される。GATA-1 を欠損した成体型赤血球系細胞は、胚型赤血球同様、前赤芽球の段階で分化が阻害されていた。また、細胞数は、コントロールの 1/10 であった。GATA-1 欠損細胞からの分化誘導において、day 5 から GATA-1 を発現させると、赤血球系細胞の細胞数は、野生型 ES 細胞から産生される赤血球数と同程度まで回復した。しかしながら、前赤芽球からの最終分化は、回復しなかった。

Tet-off システムによる GATA-1 タンパクの発現を経時的に調べた結果、day 10 までは、野生型細胞とほぼ同じ GATA-1 の発現が確認されたのに対し、赤血球系細胞の核凝縮が急速に生じる day 11 以降では、外来性 GATA-1 の発現は激減した。このことから、GATA-1 による細胞数の増加は、day 10 までの発現で十分であること、また、最終分化が回復されない理由が day 10 からの GATA-1 の発現量が不十分なためであること、が考えられた。

GATA-1 欠損前赤芽球は、アポトーシスを起こすことが報告されている。そこで、外来性 GATA-1 による細胞数の増加は、アポトーシスの阻害によるものか、細胞増殖の促進によるものか、の検討を行った。その結果、GATA-1 欠損細胞で観察されたアポトーシスは、外来性 GATA-1 の発現により有意に減少した。さらに、外来性 GATA-1 の発現量を変化させ、アポトーシスと細胞数の変化を解析した結果、アポトーシスの抑制には、低レベルの GATA-1 発現量で十分であったが、細胞数は GATA-1 の発現レベルに依存して増加した。多能性血液前駆細胞から赤血球系細胞への運命づけには、GATA-1 は関与していないことは、コロニー形成法により確認できた。また、day 8 から GATA-1 の発現を開始し、day 10 において細胞周期の解析を行ったところ、GATA-1 の発現により、S 期の細胞の割合が有意に増加していた。これらの結果から、GATA-1 は赤血球前駆細胞の細胞増殖を促進する機能を有していることが明らかとなった。

最後に、レトロウイルスを用いて day 8 の GATA-1 欠損赤血球系細胞に GATA-1 の強制発現を行い、day 10 以降の GATA-1 の持続的発現が赤血球の最終分化に及ぼす効果について調べた。その結果、GATA-1 の強制発現により成熟赤血球が出現していたことから、day 10 以降は、GATA-1 は赤血球系細胞の最終分化を誘導する機能を有していることが明らかとなった。

[総 括]

遺伝子欠損 ES 細胞、コンディショナルな遺伝子発現誘導システム、試験管内分化誘導システムを用いて、転写因子 GATA-1 の機能解析を行った。その結果、胚型赤血球および成体型赤血球の分化において、GATA-1 は異なる作用機序で赤血球系細胞の増殖・分化を制御していることがわかった。その原因として、分化段階依存的な GATA-1 の機能の違い、GATA-1 と核内因子との相互作用の違い、あるいは、GATA-1 により誘導したエピジェネティックな変化による可能性、などが考えられる。

論文審査の結果の要旨

赤血球系前駆細胞は、細胞増殖・細胞分化を繰り返しながら、赤血球特異的な遺伝子群の発現を開始し、ダイナミックな形態変化を伴いながら、成熟赤血球へと最終分化を遂げる。赤血球固有の生理機能を担う遺伝子の発現は、赤血球系細胞に特異的に発現している転写因子により活性化されており、なかでも転写因子 GATA-1 は、多くの赤血球特異的な遺伝子の発現を活性化することが知られている。

本研究では、マウス胚性幹細胞から血液細胞への試験管内分化誘導法と、遺伝子ターゲティングおよびコンディシ

ヨナルな遺伝子発現系を駆使することにより、GATA-1 の赤血球分化における機能を詳細に解析した。その結果、GATA-1 は、赤血球特異的遺伝子の活性化のみならず、赤血球系前駆細胞の増殖・分化にも深く関与していること、また、増殖と分化において異なった時期に機能すること、を明らかにした。一方、この方法は、血液細胞の増殖・分化に関与する他の遺伝子の研究においても有用であることを示すことができた。よって、本研究は、学位に値するものと認め、申請者は博士（医学）の学位を授与するのにふさわしいものと考え、ここに推薦する。