

| | |
|--------------|--|
| Title | 巨核球・血小板分化過程における転写因子RUNX1の機能に関する研究 |
| Author(s) | 永井, 良平 |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46548 |
| 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 | なが い りょう へい 永 井 良 平 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 第 20260 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 薬学研究科生命情報環境科学専攻 |
| 学位論文名 | 巨核球・血小板分化過程における転写因子 RUNX1 の機能に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 八木 清仁 教授 前田 正知 教授 高木 達也 |

論文内容の要旨

血小板は止血という重要な機能を担っており、抗がん剤などの薬剤投与や遺伝的要因によって起こる血小板減少症は臨床上の重大な問題である。血小板減少症の治療薬を開発するためには、まず巨核球・血小板系列の分化に関わる転写因子を明らかにし、分化メカニズムの全容を解明することが重要である。転写因子 RUNX1 は家族性血小板減少症 (FPD/AML) の原因遺伝子であると考えられ、FPD/AML 患者の片側染色体上では RUNX1 遺伝子に点突然変異が生じている。血小板減少症への関与が指摘されている転写因子は RUNX1 以外に殆ど無いため、巨核球分化において RUNX1 は重要な役割を持つことが考えられる。しかし、RUNX1 の関与する分化段階や具体的な機能は未だ十分に明らかにされていない。また、RUNX1 は様々な転写因子や転写共役因子と相互作用し、標的遺伝子の転写を活性化にも抑制にも制御する。そのため、巨核球分化における RUNX1 の機能を明らかにするためには、細胞内レベル、遺伝子レベルでの詳細な研究が不可欠である。以上の背景のもと、著者は RUNX1 による巨核球分化マーカー遺伝子のプロモーター活性制御のメカニズムと、RUNX1 遺伝子ノックダウンによる *in vitro* 巨核球分化への影響を明らかにすることで、巨核球・血小板系列における RUNX1 の詳細な機能を解明しようと考えた。

まず、HepG2 細胞、K562 細胞、UT-7/GM 細胞の 3 つの細胞株を用い、RUNX1 が巨核球系列特異的な遺伝子 (PF4、gpIIb) のプロモーター活性に及ぼす影響をレポーターアッセイにより調べた。強制発現による RUNX1 の影響をクリアにみるため、非血液系細胞株であり RUNX1 の発現量が最も少ない HepG2 細胞を最初に用いた。解析の結果、HepG2 細胞において RUNX1 は既知の相互作用因子である CBF β 、ETS-1 と共に協調的に PF4 プロモーターを活性化し、その協調的作用には PF4 プロモーター上の -50 bp 付近の ETS 結合モチーフが重要であることがわかった。また、巨核球分化過程の未分化段階を反映していると考えられる K562 細胞においても、3 因子は協調的に PF4 プロモーターを活性化し、gpIIb プロモーターに対しても同様の作用を示すことがわかった。一方、K562 細胞よりも相対的に後期の巨核球分化段階を反映していると考えられる UT-7/GM 細胞においては、RUNX1 は単独で PF4 及び gpIIb プロモーターを抑制することが明らかになった。以上の結果から、RUNX1 は巨核球分化の時期によって異なる機能を持ち、UT-7/GM 細胞において RUNX1 は巨核球分化の抑制因子として働くことが示唆された。

次に、UT-7/GM 細胞における RUNX1 の機能をさらに詳細に解析するため、RNA interference (RNAi) 法と UT-7/GM 細胞の *in vitro* 巨核球分化系を組み合わせたアッセイ系を構築した。そして、RUNX1 ノックダウンによる巨核球分化への影響を観察し、RUNX1 が巨核球分化の抑制因子として機能するか否かを調べた。まず、RUNX1 ノ

ックダウンによる巨核球分化マーカー発現への影響を調べた。RUNX1 をノックダウンした UT-7/GM 細胞を thrombopoietin (TPO) で刺激し、巨核球系列に分化誘導したところ、ネガティブコントロール siRNA を導入した細胞と比べ PF4 や gpIIIa 等の巨核球分化マーカー遺伝子の発現量が増加することがわかった。同様に、タンパク質レベルにおいても巨核球分化マーカーである CD41a (GPIIb/GpIIIa) の発現増加が認められた。次に、巨核球分化の形態的指標である胞体内核分裂 (核内 DNA の多倍体化) に対する RUNX1 ノックダウンの影響を調べた。RUNX1 をノックダウンした UT-7/GM 細胞を TPA で刺激し、巨核球系列に分化誘導したところ、コントロール細胞と比べ多倍体化を示す 8N の割合が有意に増加し、胞体内核分裂が促進されていることが明らかになった。最後に、RUNX1 ノックダウンによる細胞増殖への影響を調べた。RUNX1 をノックダウンした UT-7/GM 細胞を TPO で刺激し、巨核球系列に分化誘導したところ、コントロール細胞と比べ増殖効率が 50% に減少し、細胞増殖が抑制されていることが明らかになった。以上の結果から、UT-7/GM 細胞において RUNX1 は巨核球分化を抑制し、細胞増殖を促進する働きを持つことが明らかになった。

p21 は細胞増殖抑制や巨核球分化促進の機能を持ち、また、RUNX1 によって負に転写制御されることが知られている。著者は UT-7/GM 細胞において RUNX1 が p21 遺伝子の発現制御を介し巨核球分化及び細胞増殖を制御しているのではないかと予想した。しかし、巨核球系列の細胞において RUNX1 が p21 遺伝子の発現を制御しているという報告は無い。そこで、UT-7/GM 細胞の *in vitro* 巨核球分化系において、RUNX1 ノックダウンが p21 遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。その結果、RUNX1 ノックダウンにより p21 遺伝子の発現量が増加することが明らかになった。また、過剰発現させた RUNX1 が p21 プロモーター活性を抑制することもわかった。以上より、UT-7/GM 細胞において RUNX1 は p21 遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなり、RUNX1 は p21 遺伝子発現を抑制することで、巨核球分化を抑制し細胞増殖を促進することが考えられた。

以上、本研究を通じ巨核球分化における RUNX1 の役割について多くの知見を得ることができた。本研究で得られた成果は巨核球・血小板分化機構、および血小板減少症の発症機構の解明に貢献する意義深いものであるといえる。

論文審査の結果の要旨

転写因子 RUNX1 は家族性血小板減少症 (FPD/AML) の原因遺伝子であると考えられ、FPD/AML 患者の片側染色体上では RUNX1 遺伝子に点突然変異が生じている。血小板減少症への関与が指摘されている転写因子は RUNX1 以外にほとんど無いため、巨核球分化において RUNX1 は重要な役割を持つことが考えられる。しかし、RUNX1 の具体的な機能については未だ十分に明らかにされていない。また、RUNX1 はさまざまな転写因子や転写共役因子と相互作用し、標的遺伝子の転写を活性化にも抑制にも制御する。そのため、巨核球分化における RUNX1 の機能を明らかにするためには、細胞内レベル、遺伝子レベルでの詳細な研究が不可欠である。

以上の背景のもと、永井君は、RUNX1 による巨核球分化マーカー遺伝子のプロモーター活性制御メカニズムと、RUNX1 遺伝子ノックダウンによる *in vitro* 巨核球分化への影響を明らかにすることで、巨核球・血小板系列における RUNX1 の詳細な機能の解明を試みた。

その結果、RUNX1 は巨核球分化の時期によって異なる機能を持つことを明らかにした。すなわち、未分化な巨核芽球のような細胞では、RUNX1 は分化促進に働くものの、ある程度分化した巨核球細胞においては、RUNX1 は逆に巨核球分化の抑制因子として働くことが示唆された。

また、p21 は細胞増殖抑制や巨核球分化促進の機能を持ち、RUNX1 によって負に転写制御が行われることが知られているため、p21 遺伝子の発現制御を介した巨核球分化と細胞増殖制御について解析を行った。

その結果、RUNX1 ノックダウンにより p21 遺伝子の発現量が増加し、また過剰発現させた RUNX1 が p21 プロモーター活性を抑制することがわかった。以上より、RUNX1 は p21 遺伝子発現を抑制することで、巨核球分化を抑制し細胞増殖を促進することが考えられた。

以上の研究成果は、巨核球への分化の分子機構解明に大きく貢献することが考えられることより、博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。