Osaka University Knowledge Archive

Title	家族性血小板機能異常症（FPD）にみられる転写因子RUNX1変異体の機能について
Author(s)	渡邊, 美穂
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58511
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【84】

氏　　名	渡　邊　美　穂（わたなべ　み　ほ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２４６８８　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	**家族性血小板機能異常症（FPD）にみられる転写因子RUNX1変異体の機能について**
論文審査委員	（主査） 教　授　土井　健史 （副査） 教　授　河村　　悟　　教　授　近藤　寿人　　教　授　米田　悦啓

論　文　内　容　の　要　旨

血小板は、造血幹細胞から産生されるが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。細胞の分化は細胞内に発現する遺伝子の種類や量が変化することによってもたらされるが、それらの遺伝子の発現制御は転写因子が担っている。今回、著者は血小板の分化のメカニズムを明らかにする目的で、血小板分化に寄与する可能性のある転写因子RUNX1に着目し、その機能を解析しようと考えた。RUNX1のコンディショナルノックアウトマウスは血小板減少を引き起こすことや、血小板数の減少や機能異常を引き起こす家族性血小板機能異常症（Familial platelet disorder; FPD）の患者がRUNX1遺伝子に変異を持つなどの報告から、RUNX1が血小板分化に寄与する可能性が示されているが、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで著者は、RUNX1の血小板分化における機能の一端を解明するために、RUNX1が血小板機能に必須の遺伝子の発現を制御するか、また、FPDにみられる変異型RUNX1と野生型RUNX1との機能の差異は何か、さらに野生型と変異型RUNX1の強制発現が血小板分化にどのような影響を及ぼすのかについて検討を行った。

まず、RUNX1が血小板系列に特異的に発現する血小板第4因子（PF4）の発現を制御するかについて検討を行った。その結果、RUNX1はPF4プロモーター内のRUNX1結合モチーフに結合し、CBFβ、ETS-1、FLI-1などの転写因子と協調的にPF4プロモーターを活性化することが明らかとなった。このことから、RUNX1が血小板機能に必須のPF4の発現を制御し、正常な機能を持つ血小板の産生に寄与することが明らかとなった。

次に、著者は、FPDにみられるRUNX1の変異が、RUNX1の転写因子としての機能にどのような影響を及ぼすのか解析した。FPDにみられる18種類の変異はRUNX1の様々なドメインにみられ、変異型RUNX1の機能は変異の種類によって異なると考えられた。そこで、転写活性化能、DNA結合能、細胞内局在、他の転写因子との相互作用能の4つの性質に着目し、11種の変異体について解析を行った。その結果、全ての変異型RUNX1はPF4プロモーターを活性化する能力を持たなかった。また、変異の種類により、DNA結合能を失っているもの、野生型と異なる細胞内局在をとるもの、CBFβ、FLI-1、ETS-1との相互作用の強さが野生型と異なるものが存在することが明らかとなった。これらの結果から、FPDの患者にみられる変異型RUNX1は、転写活性化能を失い、下流遺伝子の発現を正常に制御できず、血小板減少や血小板機能異常を引き起こすことが示唆された。

最後に、野生型RUNX1および変異型RUNX1が血小板分化にどのような影響を与えるのかを解析するために、正常な血小板分化を再現でき、かつ分化途中に遺伝子を強制発現できるES細胞分化系の構築を行っ

た。まず、PF4プロモーターにGFPを連結した配列をマウスES細胞のHprt遺伝子座上流に組み込んだES細胞を樹立した。得られたES細胞をOP9細胞とトロンボポエチンを用いて血小板系列へと分化させ、血小板系列特異的にGFPを発現できることを確認した。しかし、この細胞株は導入したGFPの発現効率が非常に低かったため、トランスジーンの両端にインスレーター配列を導入し、発現効率の大幅な改善を行い、血小板系列特異的に外来遺伝子を効率よく発現できるES細胞分化系の構築に成功した。この分化系を用いて、野生型および2種の変異型RUNX1（K110E、D198Y）を血小板系列特異的に発現させ、血小板分化への影響を評価した。その結果、野生型RUNX1の発現が、血小板系列に分化する細胞数を増加させることが明らかになった。また、同様の効果が変異型RUNX1においても観察されたため、K110E、D198Yのタイプの変異は血小板前駆細胞数には影響を与えないことが明らかになった。

以上、これらすべての結果から、血小板系列の分化過程における野生型、及び変異型RUXN1の機能の一端を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

渡邊さんは、血小板分化を制御する可能性のある転写因子としてRUNX1に着目し、その機能メカニズムの解析を行った。まず、転写因子RUNX1が血小板系列特異的に発現する血小板第４因子（PF4）のプロモーターに結合し、プロモーターを活性化することを明らかにし、また、CBFβやFLI-1などの他の転写調節因子と協調的に作用することも明らかにした。次に、家族性血小板機能異常症(FPD)にみられる変異型RUNX1について検討し、これらは何れもPF4に対する転写活性化能を失っており、変異の種類により、DNA結合能の欠失、細胞内局在の異常、他の転写因子との相互作用の異常の何れかが起こっていることから、これら機能の変化がFPD発症につながる可能性を示した。また、インスレーター配列を用いて血小板分化途中に外来遺伝子を高効率で強制発現できるES細胞分化系の構築を行い、野生型および2種の変異型RUNX1(K110E､D198Y)の強制発現が血小板系列に分化する細胞の割合を増加させることを明らかにした。

以上の研究は、血小板分化機構の研究、およびFPD発症機構の研究に寄与する重要な成果であると判断され、学位に値するものと認める。