

| | |
|---------|--|
| 氏名 | さいとう よう 齋藤 陽 |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位授与年月日 | 平成27年3月25日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第4条第1項 |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学 専攻 |
| 学位論文題目 | 新たなバイオアッセイ系による転写因子 GATA-2 の制御因子の 同定 |
| 論文審査委員 | 主査 教授 張替 秀郎 教授 清水 律子 教授 菅原 明 |

論文内容要旨

造血幹細胞は自己複製能とすべての血球細胞への分化能をあわせ持つ細胞である。造血幹細胞のこれらの機能は様々な造血因子、転写因子、骨髓微小環境により制御されている。転写因子 GATA-2 (GATA-binding protein 2) は造血幹・前駆細胞に発現し、その生存、維持、増殖に重要な転写因子である。GATA-2 ローカスには 1S、1G という 2 つの異なる第 1 エクソンが存在し、それぞれを第 1 エクソンとする mRNA アイソフォームが存在する。造血細胞及び血管内皮細胞に特異的である 1S mRNA アイソフォームは、ヒト GATA-2 ローカスにおける転写開始点を基準に -110、-4.6、-3.4、-2.4、+9.9 kb にそれぞれ存在する GATA 結合配列を介して発現制御が行われている。特に +9.9 kb の領域が生体において重要と考えられているが、その制御機構には不明な点が多い。そこで、本研究では GATA-2 活性化因子の同定を目的として、siRNA ライブラリースクリーニング法、および cDNA ライブラリースクリーニング法という、2 つのバイオアッセイ系を確立して網羅的なスクリーニングを行った。siRNA ライブラリースクリーニング法については、上流にヒト GATA-2 +9.9 kb 領域を挿入したルシフェラーゼレポーターベクターを GATA-2 1S mRNA アイソフォームが高発現する血球系細胞株である YN-1 に安定発現させ、総数 995 の転写因子の遺伝子を標的とする siRNA ライブラリーを導入して、ルシフェラーゼ活性をサロゲートマーカーとして、GATA-2 活性の低下がみられた siRNA の標的遺伝子をスクリーニングした。cDNA ライブラリースクリーニング法については、まず、DsRed の上流にヒト GATA-2 +9.9 kb 領域を挿入したコンストラクトを 1S プロモーター活性の低い K562 細胞株に導入した。クローン化した K562 細胞に YN-1 細胞株から作成した cDNA ライブラリーを導入し DsRed 活性をサロゲートマーカーとしてフローサイトメトリーにて陽性細胞の分離を繰り返し、最終的にクローン化した細胞から導入された cDNA を特定した。このようにして得られた候補遺伝子につき、siRNA ノックダウンおよび遺伝子強制発現による検証実験を行い、CITED2、EGR1 を GATA-2 活性化因子として同定した。

審査結果の要旨

博士論文題目 新たなバイオアッセイ系による転写因子 GATA2 の制御因子の同定

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・血液免疫病学 分野

氏名 齋藤陽

造血幹細胞は自己複製能とすべての血球細胞への分化能をあわせ持つ細胞である。造血幹細胞のこれらの機能は様々な造血因子、転写因子、骨髄微小環境により制御されている。転写因子 GATA2(GATA-binding protein 2)は造血幹・前駆細胞に発現し、その生存、維持、増殖に重要な転写因子である。これまでにヒトの疾患においては造血不全症である再生不良性貧血の造血幹細胞において GATA2 の発現が低下していることや、GATA2 遺伝子の先天変異により免疫不全・造血不全を呈する MonoMac 症候群が発症することが知られており、臨床的にもその活性化因子の同定は重要である。そこで、本研究では GATA2 活性化因子の同定を目的として、siRNA ライブラリースクリーニング法、および cDNA ライブラリースクリーニング法という、2つのバイオアッセイ系を確立して網羅的なスクリーニングを行った。

siRNA ライブラリースクリーニング法については、ヒト GATA2 +9.9 kb 領域を挿入したルシフェラーゼレポーターベクターを GATA2 IS バリエントが高発現する血球系細胞株である YN-1 に安定発現させ、総数 995 遺伝子を標的とする siRNA ライブラリーを導入して、ルシフェラーゼ活性をサロゲートマーカーとして、GATA2 活性の低下がみられた siRNA の標的遺伝子をスクリーニングした。cDNA ライブラリースクリーニング法については、まず、ヒト GATA-2 +9.9 kb 領域の下流に DsRed を挿入し IS プロモーター活性の低い K562 細胞株に導入した。クローン化した K562 細胞に YN-1 細胞株から作成した cDNA ライブラリーを導入し DsRed 活性をサロゲートマーカーとしてフローサイトメトリーにて陽性細胞の細胞を繰り返し、最終的にクローン化した細胞から導入された cDNA を特定した。これらのバイオアッセイ系によって得られた複数の候補遺伝子について、siRNA ノックダウンおよび遺伝子強制発現による検証実験を行った結果、CITED2、EGR1 を GATA-2 活性化因子として同定した。

これらの研究結果はこれまで不明であったヒト GATA2 遺伝子上流を明らかにするものである。また、新たに確立したこれらのバイオアッセイ系を用いることにより、ヒト GATA2 遺伝子の発現を活性化する低分子化合物のハイスループットスクリーニングが可能になることから、臨床的にも意義のある研究成果と考えられる。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。