

氏名(本籍)	お <small>お</small> ば <small>ば</small> ら <small>ら</small> <small>な</small> お <small>お</small> し <small>し</small>	小原直(岩手県)
学位の種類	博	士(医学)
学位記番号	博	甲第3772号
学位授与年月日	平成17年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	人間総合科学研究科	
学位論文題目	エリスロポエチンの遺伝子発現における GATA 配列を介した転写制御	
主査	筑波大学教授	医学博士 小山哲夫
副査	筑波大学助教授	博士(医学) 山縣邦弘
副査	筑波大学講師	博士(医学) 飯嶋達生
副査	筑波大学講師	博士(医学) 島野仁

論文の内容の要旨

(目的)

筆者らは肝癌由来 Hep3B 細胞を用いた解析からエリスロポエチン(以下 Epo) *Epo* 遺伝子の転写開始点より 30bp 上流に存在する GATA 配列に GATA 転写因子が結合して *Epo* 遺伝子の転写を抑制すること、低酸素によってこの抑制が解除され、*Epo* 遺伝子の転写が促進されることを報告した。これらは培養細胞を用いた解析であるため、病態解明には個体における *Epo* 遺伝子の転写制御機構の解析が必要である。しかし、腎臓における Epo 産生細胞が未だ確定されておらず、個体における転写制御の研究が進まない一因となっている。そのため、本研究では *Epo* 遺伝子の制御領域を十分に含んでいると思われる Bacterial artificial chromosome (以下 BAC) に Green fluorescence protein (以下 GFP) 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを作成し、腎臓における Epo 産生細胞の同定および制御領域の解析を試みた。同時に GATA 配列に点変異を導入して GATA 因子の結合できない変異体トランスジェニックマウスを作製し、*Epo* 遺伝子制御における GATA 因子の作用を個体レベルで解析した。

(方法)

転写開始点から上流 60kb を含み、全長 180kb の BAC を単離した。大腸菌内の相同組み換えを利用して *Epo* 遺伝子の第 2 エクソンにレポーター遺伝子として GFP 遺伝子を挿入した。同時に転写開始点上流 30bp の GATA 配列に点変異を導入し同様に GFP 遺伝子を挿入した組み換え BAC を作製した。これらの BAC を導入遺伝子としたトランスジェニックマウス (wt-Epo-GFP Tg, Mut-Epo-GFP Tg) をそれぞれ 3 ラインずつ作製し、免疫染色・RT-PCR などを用いて GFP の発現を解析した。

(結果)

1) 腎臓における Epo 産生細胞の同定

貧血にしたトランスジェニックマウス (wt-Epo-GFP Tg) 腎臓において GFP 陽性細胞は尿細管間質に

存在していた。細長い突起を伸ばし、神経系マーカーである MAP2 と NFL を発現していた。正常時には GFP はほとんど発現していなかった。

2) Epo 産生細胞の低酸素応答

腎臓における GFP 陽性細胞は貧血が重篤になるにしたがって増加していた。また、肝臓における GFP 陽性細胞は肝実質細胞であり、中心静脈周辺に限局していた。また、腎臓と同様に貧血が重篤になるに従って GFP 陽性細胞は増加していた。

3) GATA 配列変異マウスの解析

GATA 配列変異マウス (Mut-Epo-GFP Tg) では正常時・貧血時とも遠位尿細管・集合管・肝内胆管・気管支上皮・胸腺髄質などで GFP が発現していた。貧血にすると野生型マウス (wt-Epo-GFP Tg) と同様に尿細管間質細胞・肝実質細胞も GFP 陽性であった。

4) 腎臓における GATA 因子の発現

GATA-2/GFP ノックインマウス、GATA-3/LacZ ノックインマウス、GATA-4 免疫染色では遠位尿細管で GATA-2, -3 が、尿細管間質細胞で GATA-2, -4 が発現していた。

(考察)

本研究では、BAC を用いた GFP レポータートランスジェニックマウス法により、個体における Epo 産生細胞の同定を試みた。その結果、腎臓における Epo 産生細胞は尿細管周囲の間質細胞であることを非常に簡便に示すことができた。その数は 1 切片あたり約 10 ~ 500 個と非常に少なかったが、形態は星状 (樹状) であり、きわめて特徴的であった。一部の神経系のマーカーを発現していることから腎臓における Epo 産生細胞は神経内分泌細胞の可能性もある。また、肝臓では貧血時の中心静脈周辺域でのみ GFP が発現していることが明らかとなり、また腎臓・肝臓とも貧血が重篤なほど GFP 発現細胞が増加していることから、低酸素を感知した細胞のみ Epo を発現することで生体の Epo 必要量を維持していることが明らかとなった。また、この BAC の領域が *Epo* 遺伝子発現に必要な十分な領域であることが示された。転写開始点上流の GATA 配列に変異を入れると GFP は正常時から異所性に発現しており、貧血誘導時には異所性発現のほか野生型と同様に尿細管間質細胞と肝実質細胞でも GFP を発現した。Epo 産生細胞特異的な *Epo* 遺伝子の誘導的発現には GATA 配列が必要ないが、GATA 配列は *Epo* 遺伝子の恒常的な異所性発現抑制に必須であると考えられる。GATA 因子のうち、遠位尿細管には GATA-2, GATA-3 が恒常的に発現していることから、これらの因子が *Epo* 遺伝子の細胞特異的発現制御に関与していることが示唆された。

(結論)

1. 腎臓における Epo 産生細胞は尿細管間質細胞である。肝実質細胞の Epo 産生は中心静脈周辺領域に限局している。
2. 腎臓・肝臓における *Epo* 遺伝子発現には転写開始点 60kb を含む 180kb の領域が必要十分である。
3. 転写開始点上流の GATA 配列は *Epo* 遺伝子の低酸素応答には必須ではないが細胞特異性に関与していることが示唆された。
4. 腎臓における *Epo* 遺伝子の異所性発現抑制に関与しているのは GATA-2, GATA-3 であると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

従来より腎臓で Epo 産生を行っていることは知られていたが、細胞の同定までには至らなかった。著者は *Epo* 遺伝子の制御領域を十分に含んでいると考えられる Bacterial artificial chromosome に Green

fluorescence protein 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを作成し、腎臓における Epo 産生細胞の同定および制御領域の解析を試み、腎臓における Epo 産生細胞は尿細管間質細胞であり、神経内分泌性細胞の表面マーカーを有する細胞であることを世界ではじめて同定した。さらに Epo 産生細胞特異的な *Epo* 遺伝子の誘導的発現には GATA 配列が必要ないが、GATA 配列は *Epo* 遺伝子の恒常的な異所性発現抑制に必須であることを明らかにしたことは極めて価値のある研究である

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。