

【265】

氏 名（本籍）	なか の ま ゆ 中 野 真 祐（青 森 県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3812 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	Transgenic overexpression of GATA-1 mutant lacking N-finger domain causes hemolytic syndrome in mouse erythroid cells (N-finger(NF)欠失型 GATA-1 変異体過剰発現マウスの溶血性貧血症状に関する解析)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	長 田 道 夫
副 査	筑波大学教授	理学博士	石 井 哲 郎
副 査	筑波大学教授	医学博士	吉 川 裕 之
副 査	筑波大学助教授	博士（医学）	本 橋 ほづみ

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

転写因子 GATA-1 は、赤血球および巨核球の分化に必須であることが明らかになっているが、ノックアウトマウスは胎生 11.5 日までに致死となるため、その成体造血における役割は明らかではない。GATA-1 は構造上 2 つの Zinc finger（NF, CF）を持ち、CF は DNA 結合に、NF は巨核球の分化に必須の因子である FOG-1（Friend of GATA-1）などとの相互作用および DNA 結合の安定化に関与していることが示唆されている。本研究は、GATA-1NF の成体造血における機能を明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

GATA-1 HRD に、NF を欠失させた GATA-1 変異体（ΔNF）を結合させた構築（GATA-1 HRD-GATA-1 ΔNF）を用いて、ΔNF を高発現するトランスジェニックマウス（ΔNF TG）を樹立し、このマウスでの個体形質、赤血球の機能や形態、膜蛋白等を解析した。

（結果）

トランスジェニック法を用いて、2 系統の ΔNF 高発現型 TG が樹立された。ΔNF TG Line1 の新生仔中約 3 割には新生仔黄疸が観察され、平均体重が野生型より有意に減少していた。ΔNF TG マウスの末梢血には貧血はなかったが、網状赤血球の割合は、野生型マウス、野生型 GATA-1 TG と比較し有意に増加していた。さらに、末梢血液塗抹標本や電子顕微鏡所見から、ΔNF TG マウスの赤血球には形態異常を認めた。

骨髄や脾臓細胞の FACS 解析では、ΔNF TG マウスで好塩基性赤芽球の割合が野生型に比し増加し、コロニーアッセイでも赤血球コロニー数は野生型に比較し有意に増加していた。フェニルヒドラジン（PHZ）投与による溶血誘導実験では、通常量（60mg/kg）投与で、ΔNF TG マウスに非常に強い溶血が誘導され、第 2 日目に 4 匹中 2 匹のマウスが死亡した。15mg/kg 投与においては、ΔNF TG マウスではヘマトクリット値の有意な低下と網状赤血球の割合が増加した。

非ストレス下での Δ NF TG マウスでは、脾臓の腫大、骨髄での赤芽球過形成が見られ、これは PHZ 投与後の野生型のものとほぼ同様であった。PHZ 投与後の Δ NF TG マウスでは、さらに赤芽球が異常増加し、脾腫の亢進と骨髄での赤血球過形成が見られた。

赤血球浸透圧脆弱性試験と通過能検査の結果、 Δ NF TG マウスは野生型に比べ赤血球の脆弱性が亢進し、変形能は低下した。SDS-PAGE 法、イムノブロット法による赤血球膜構成蛋白質の解析では、野生型と Δ NF TG マウスでは主な蛋白質に発現差はなかった。マイクロアレイによる赤血球特異的な酵素の mRNA の発現は、PHZ 投与後の野生型マウスと Δ NF TG マウスの脾臓では発現に違いはなかった。

半定量的 RT-PCR 法で、脾臓での GATA-2 と EKLF の発現を調べた結果、これらの発現は野生型に比し Δ NF TG マウスで上昇していた。GATA-2 の発現上昇は赤芽球の増加を原因とし、EKLF の発現上昇は GATA-1 NF ドメインに制御されると考えられる。しかし、EKLF が影響を及ぼす β -グロビンの発現は、脾臓組織の免疫染色では野生型と Δ NF TG マウスで差は見られなかった。この溶血の原因が NF の欠失にあるかどうかを検証するため、 Δ NF TG と GATA-1 TG を交配してコンパウンドマウス (Δ NF::GATA-1 TG) を樹立し、PHZ (15mg/kg) 投与実験を行ったところ、 Δ NF TG マウスに比しヘマトリット値の低下、網状赤血球の増加は有意に改善した。

(考察)

Δ NF TG マウスでは、非ストレス時に新生仔黄疸、成長遅延、網状赤血球の増加、脾腫、造血組織での赤芽球の増加、PHZ に対する溶血感受性亢進を認めた。同時に、溶血誘導に対する造血亢進能力は保持されていたことから、 Δ NF TG マウスは溶血を起こし易く、代償性の造血亢進が起きていたと考えられる。

Δ NF TG マウスでは、球状赤血球の出現、変形能の低下が見られたが、赤血球膜構成蛋白質、ヘモグロビン、赤血球特異的な酵素には異常はみられなかった。このことから、 Δ NF GATA-1 の発現による何らかの変化で赤血球の変化が起こり、溶血し易くなっている可能性が示唆された。この Δ NF TG の症状には、 Δ NF の内因性 GATA-1 に対する競合阻害や、それ以外のメカニズムが考えられる。GATA-1 の阻害としては、GATA サイトあるいは共役因子の奪い合い、 Δ NF GATA-1 の DNA 結合特異性低下による標的遺伝子以外の異常な遺伝子発現、あるいは Δ NF GATA-1 による標的遺伝子の過剰発現が考えられるが、現時点では詳細なメカニズムについては不明である。

(結論)

Δ NF TG は、赤血球膜機能の異常によると考えられる溶血性貧血症状を示す。出生後の造血組織での GATA-1 による成熟赤血球の機能維持に関わる遺伝子発現制御において、NF ドメインは重要な役割を果たすことが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、TG マウスを用いて GATA-1 の Zinc finger NF の機能解析を行い、GATA-1 NF は出生後の赤血球機能・形態の保持に重要な役割があることをはじめて明らかにした。本研究は、GATA-1 NF の臨床的意義にも示唆を与えうるものであり、今後の研究の発展が期待される。

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。