

論文の内容の要旨

論文題目 **Cloning of Oncostatin M Inducible Genes and Their Characterization in the Hematopoietic System**

(オンコスタチン M により誘導される遺伝子の同定およびそれらの造血系における機能解析)

氏名 中山 恒

序論

オンコスタチン M(OSM)は IL-6 ファミリーに属するサイトカインであり、その作用はがん細胞の増殖抑制、血管内皮細胞の増殖促進、造血発生の支持など多岐にわたっている。マウスの造血発生は卵黄嚢の一次造血に始まる。一方、成体型の造血は大動脈・生殖器・中腎(AGM)領域で始まり、胎生肝臓を経て、最終的な造血の場所である骨髄に移行する。発生過程における造血場所の変化は、造血幹細胞の移行によると考えられている。AGM 領域の初代分散培養系が近年確立され、この培養系においては OSM の存在下で血管内皮様の細胞が増殖してクラスターを形成するとともに、浮遊性の血球細胞の産生がみられる。また、細胞レベルでの更なる解析により、AGM 領域の初代培養系で増殖してくる血管内皮様細胞群には、血管内皮細胞と血球に共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストが含まれていることおよび、OSM がヘマンジオブラストに作用する可能性が示唆された。AGM 領域での OSM の作用を明らかにするために、AGM 領域初代培養系より樹立された OSM 応答性のヘマンジオブラスト様細胞株 LO を用いて、OSM 刺激の前後で二種類の cDNA ライブラリーを作成し、これらの cDNA ライブラリーから、サブトラクション法により OSM 誘導性遺伝子の同定を試み、多数の遺伝子を得た。それらの中で、誘導性および発現のパターンをもとに、OIG37、ZIO、および Hes-1 の三つのクローンを選択し、これらのクローンに関して解析を進めた。

OIG37 の同定および解析

OIG37 は GADD45 ファミリーに属する新規遺伝子である。このファミリーは UV 照射によって誘導される遺伝子として同定された GADD45 および、IL-6 刺激に応答して誘導される

遺伝子として同定された MyD118 から構成されていた。OIG37 はこれらの分子とアミノ酸レベルで55%程度の相同性を示した。

このファミリーは主にストレスやサイトカイン刺激に応答して誘導され、細胞増殖を抑制することが知られていた。OIG37 の組織レベルでの発現は GADD45、MyD118 と同様に、各組織に普遍的にみられた。しかし、サイトカインによる誘導パターンを三つの遺伝子間で比較したところ、GADD45 はサイトカインによる誘導がほとんど見られなかったのに対して、MyD118 では穏やかな誘導が観察され、OIG37 に関しては顕著な発現誘導が観察された。一方、ストレスによる誘導性をメチルメタンスルホン酸添加により検証したところ、GADD45 において発現誘導が引き起こされたのに対して、MyD118 ではその発現量は変化せず、OIG37 においては非常に遅い時間経過でわずかに誘導されるのみであった。

このように OIG37 の発現誘導は主にサイトカイン刺激で引き起こされることが示されたので、その誘導がサイトカイン刺激により活性化される、Ras および STAT を介したシグナル伝達経路のどちらに依存しているのかを検討した。優性抑制型 STAT3 を発現した LO 細胞を OSM で刺激すると、OIG37 の誘導が抑制されたことなどから、OIG37 の発現誘導には STAT3 経路が重要な役割をしていることが示唆された。

OIG37 の細胞内における機能解析を OIG37 遺伝子の強制発現実験により行った。この結果、OIG37 は LO 細胞、NIH3T3 細胞、BaF3 細胞などの増殖を MyD118 と比較して強く抑制した。以上の結果から、OIG37 は GADD45 ファミリーに属する増殖抑制因子であることが示された (図1)。

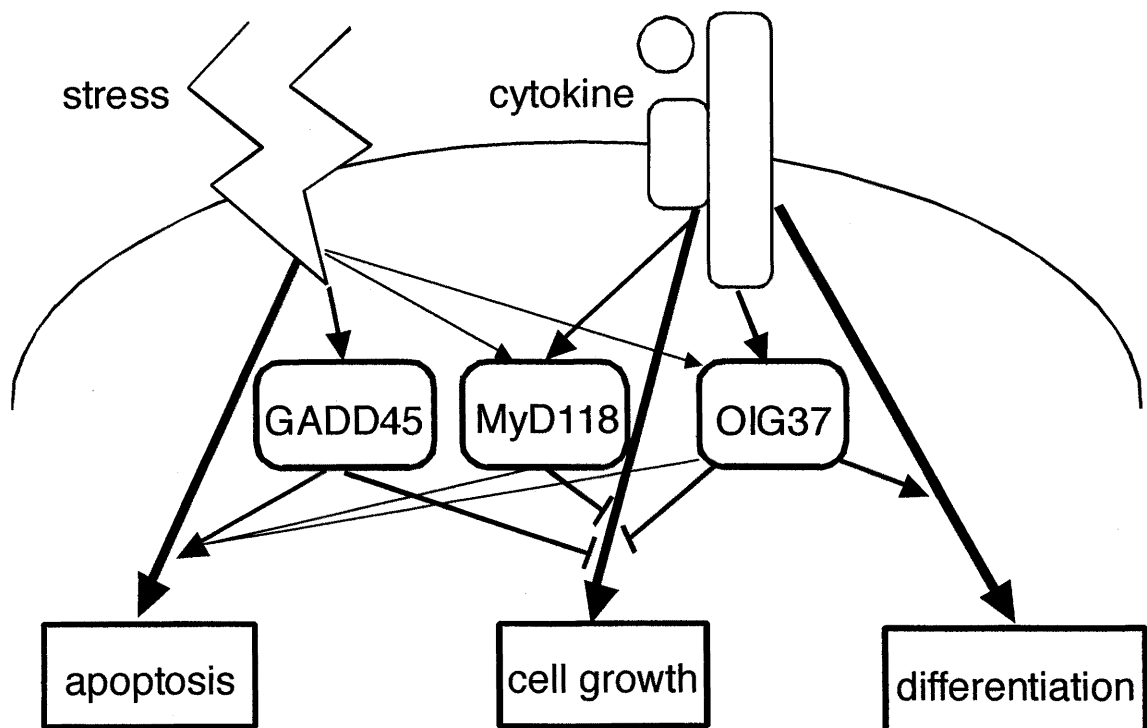


図1 GADD45 ファミリーの細胞内における作用機序のモデル

ZIO の同定および機能解析

ZIO(zinc finger protein induced by Oncostatin M) は新規の zinc フィンガー型転写因子であり、分子内に 12 個の C2H2 型 zinc フィンガーモチーフを持つ。一般的に、zinc フィンガーモチーフを持つ分子は DNA に結合して、転写因子として働くことやタンパク質間の相互作用に働くことなどが知られている。ZIO の細胞内における分布を COS7 細胞を用いた強制発現実験により検討したところ、ZIO は核に局在することが示された。このような結果から、ZIO は転写因子として機能していることが推測された。そこで、ZIO が転写活性化能を持つかどうかを検討するために、ZIO をいくつかの既知のプロモーター配列とルシフェラーゼ遺伝子が結合したようなコンストラクトとともに共発現させて、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、 β -casein プロモーター領域、APRE などと結合したルシフェラーゼの発現を誘導したことから、ZIO は転写因子であることが示された。

ZIO は LO 細胞で同定された遺伝子であることから、ZIO の細胞内における機能の解析を行うために、AGM 領域の初代培養系にレトロウイルスベクターを用いて強制発現した。その結果、AGM 領域初代培養系に特徴的な血管内皮様細胞の形態変化が観察されたとともに、培養系に出現する浮遊性の血球細胞数が減少することが観察された。さらに、これらの血球のメチルセルロース内でのコロニー形成能を検討したところ、コントロール群に比べて、顕著にコロニーの形成能が低下することが示された。これらの結果より、ZIO は AGM 領域において、血管内皮細胞の形態を変化させるとともに、造血能を低下させる活性を持つことが示された (図 2)。

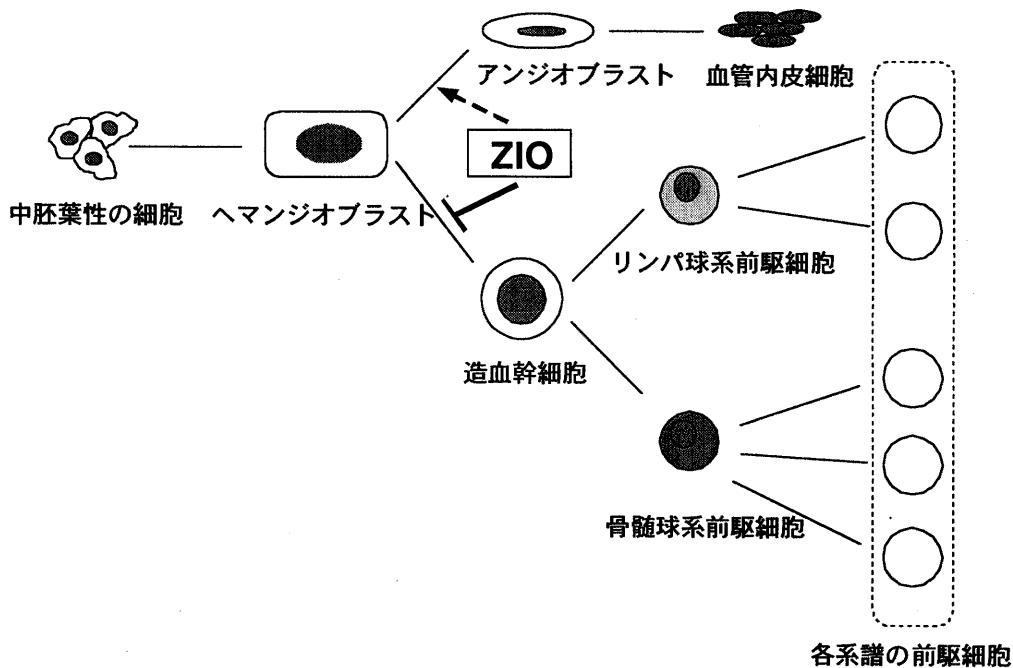


図 2 血球・血管系細胞の分化における ZIO の作用点

Hes-1 の機能解析

Hes ファミリーは bHLH 型の転写因子であり、現在までに Hes-1 から Hes-6 までの分子が同定されている。Hes-1 は神経系において細胞分化を抑制する活性を持ち、神経幹細胞からニューロンおよびグリアへの分化を調節する分子の一つであることが明らかとなってきた。近年、造血系においても T 細胞の発生過程に関与していることが示された。Hes-1 のノックアウトマウスは脳が正常に形成されないために致死となることが報告されており、この原因は幹細胞の分化が正常なタイミングで引き起こされず、機能的な細胞が適切な個所に存在しなくなるためと考えられている。Hes-1 と同様の働きをしている分子に Hes-5 があり、この遺伝子のノックアウトマウスではマウスは正常に生まれるが、これは Hes-1 が補償的に働いているためと考えられる。

Hes-1 の作用機序は bHLH 分子の間でヘテロおよびホモダイマーを形成することで、様々な転写を主に抑制的に制御していると考えられている。Hes-1 遺伝子の発現誘導は主に Notch シグナルによって制御されており、Notch シグナルにより Notch の細胞内ドメインが切断されると、転写因子である RBP-J κ と結合して、Hes-1 プロモーターにある RBP-J κ 結合領域に結合して Hes-1 の発現を誘導する。一方で Hes-1 遺伝子のプロモーター領域には Hes-1 自身の結合領域もあるため、ネガティブフィードバックがかかるような仕組みも存在している。Hes-1 は PC12 細胞において bFGF により誘導されてくる遺伝子として報告されている。近年、DNA チップを用いた一連の遺伝子群の解析より、NIH3T3 細胞で PDGF により誘導されてくる遺伝子としての報告もある。

Hes-1 は LO 細胞においては OSM に依存的に誘導される遺伝子であり、等量の RNA を用いた解析においては、NIH3T3、M1 および BaF3 細胞での発現はみられなかった。Hes-1 を AGM 領域初代培養系で強制発現させたところ、大きな形態的な変化は観察されなかったが、一部の細胞において PCLP1 陽性の細胞群が維持されることが観察された。Hes-1 は bHLH 領域を介して、様々な分子と会合してその活性を抑制するので、Hes-1 と会合している分子が細胞機能に関わる活性を持つことが予想されるため相互作用する分子の探索を two-hybrid 法を用いて行い、10 個のクローンを単離した。Hes-1 プロモーターを用いたルシフェラーゼの活性を測定した結果から、得られたクローン中 4 個は Hes-1 の転写抑制活性を解除するような活性を持つこと示された。