

# 論文審査の結果の要旨

氏名 中山 恒

本論文は全五章からなる。第一章は序論であり、一連の研究の中心テーマである、マウスの造血発生およびサイトカインの作用についての一般的な事象が紹介されている。二章から四章に関しては、血管内皮様の細胞株 LO から得られたオンコスタチン M (OSM) による誘導性遺伝子に関して述べられている。第二章では新規 OSM 誘導性遺伝子 OIG37 の機能解析、第三章では新規 zinc フィンガータンパク質 EZI の機能解析、第四章ではベーシック/ヘリックス・ループ・ヘリックス(bHLH)型タンパク質 Hes-1 の機能解析についてそれぞれ記述されている。第五章では、それらの遺伝子の機能解析より得られた情報をもとに OSM 誘導性遺伝子の造血発生への関与について考察されている。

マウスの造血発生は卵黄嚢における一次造血に始まり、AGM 領域での二次造血の開始、さらに胎生肝へと引き継がれ、成体における造血器官である骨髄へ最終的に移行する。二次造血が始まる AGM 領域では OSM が発現しており、また、AGM 領域の初代培養系では OSM の作用により、血管内皮細胞のクラスターの出現および血球細胞の産生が引き起こされる。OSM は IL-6 サイトカインファミリーに属するサイトカインであり、筋細胞、血管内皮細胞の増殖を促すことなどが知られている。AGM 領域における造血発生過程での OSM の役割を遺伝子レベルで解析するために、血球産生能を持つ内皮様細胞株 LO 細胞を用いて、cDNA ライブラリーのサブトラクション法により OSM 誘導性遺伝子の同定、解析が進められた。サブトラクション法により得られた遺伝子の中で、OIG37、EZI、Hes-1 に関して更なる解析が行われた。

第二章では、OSM 誘導性の新規遺伝子である OIG37 の解析について述べている。OIG37 の全長の配列を決定することにより、この遺伝子が既知の分子である、GADD45 および MyD118 と高い相同性を示し、GADD45 ファミリーを形成することが明らかとなった。GADD45 ファミリー分子のマウスの成体組織における発現は普遍的であり、顕著な差は見られなかったが、これらの分子間で細胞レベルでの誘導は異なっていた。サイトカイン刺激による誘導は OIG37 や MyD118 では顕著に認められたのに対して、GADD45 ではほとんど認められなかった。一方で、ストレスによる誘導は GADD45 で顕著に認められたが、OIG37 や MyD118 ではほとんど見られなかった。このように発現誘導の調節機構は異なっていた。GADD45 ファミリー分子を細胞に強制発現させたときの作用は共

通に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。一連の実験より、GADD45 ファミリー分子は増殖抑制という共通の作用を持っているが、その作用点は GADD45 が主にストレス応答を、MyD118 や OIG37 がサイトカインに対する応答に中心的に関わっていることが考察され、モデルとして提示された。

第三章では、新規 zinc フィンガータンパク質である EZI の機能解析について述べている。配列決定の結果、EZI は C2H2 型の zinc フィンガータンパク質ファミリーに含まれることが明らかとされた。EZI は分子内に 12 個の zinc フィンガーモチーフを持っており、595 残基のアミノ酸より構成されている。EZI mRNA のサイトカインによる誘導は顕著ではなかったが、マウス胎仔の組織レベルでの発現は AGM 領域で高かった。EZI の細胞内における局在を免疫化学染色法を用いて検出したところ、EZI は核に顕著に局在していることが明らかとなった。このように EZI の構造的なモチーフおよび細胞内の局在などから、EZI は転写因子として働いている可能性が示唆され、プロモーター領域にルシフェラーゼが結合したようなコンストラクトを用いて EZI の転写活性化能を検討したところ EZI により転写活性化が認められたことから EZI は細胞内において転写因子として働いている可能性が示唆された。また、この転写活性は OSM の刺激により増強され、一方で抑制変異型の STAT 分子を共発現させることにより、抑制されることが明らかとなった。すなわち、EZI の転写活性化には STAT 分子が関与していることが示唆された。EZI の細胞内における機能がレトロウイルスを用いた強制発現系により検討された。EZI を AGM 領域の初代培養系に強制発現させると、この培養系に特徴的な血管内皮細胞のクラスターの形態が変化し、通常は円形の内皮細胞が、長く伸張した形態を示すようになった。しかし、形態的に変化した細胞もアセチル化低密度リポタンパク質を取り込み、血管内皮細胞の性質は保持されていた。これらのことより、EZI は血管内皮細胞の形態変化を誘導するような活性を持つことが示唆された。その一方で、EZI を強制発現させることにより AGM 領域の初代培養系において出現する血球数が減少することが明らかとなった。これらの活性より EZI は AGM 領域の初代培養系において、血管内皮細胞および血球細胞の分化に関与していることが示唆され、作用点は血管および血球に共通の前駆細胞である、ヘマンジオブラストであるというモデルが提示された。

第四章は bHLH 型タンパク質 Hes-1 について記述されている。Hes-1 は転写に抑制的に働く分子であることが知られていた。また、神経幹細胞の分化を抑制する効果を持つので、同様な分化抑制活性が血球系においても認められるかが検討された。Hes-1 をレトロウイルスを用いた系により LO 細胞に強制発現さ

せると、LO 細胞が血管内皮様の円形から伸張したような形態へと変化して、束状になった。また AGM 領域の初代培養系においても Hes-1 を細胞内に強制発現させたところ、形態的な変化は認められなかったが、ヘマンジオブラストの表面抗原である PCLP 1 の発現が維持されることが明らかとなった。このように Hes-1 の AGM 領域造血発生への関与を示唆する結果が得られている。また、神経系では、Hes-1 は他の bHLH 型転写因子と相互作用して、その働きを抑制することが知られている。しかし、血球系においてはその標的となるような bHLH 型転写因子は同定されていなかった。そこで Hes-1 が DNA およびタンパク質との結合に重要な役割をする、bHLH ドメインをおとりにして、酵母ツーハイブリッド法を用いて相互作用する因子の同定を試みた。その結果、4 種の候補となる分子が得られており、これらの分子は Hes-1 によって抑制される転写活性を解除し、活性化させることまでが明らかとなっている。

第五章には、一連の研究を通じて、OSM 誘導性遺伝子の機能から AGM 領域における造血発生への OSM の関与が考察されている。

なお、本論文第二章の内容は、原孝彦、日比正彦、平野俊夫、宮島篤との共同研究であり、第三章および第四章は宮島篤との共同研究である。いずれの章においても学位申請者である中山恒がその研究を中心的に進めており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。