

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 AML1 の血管内皮細胞における役割

指導教官 平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 山本 豪

AML1(acute myeloid leukemia 1)は、ヒトの急性骨髄性白血病に認められる、t(8;21) 転座の転座切断点 21q22 から単離された遺伝子であり、CBF α 2, PEBP2 α 2, Runx1 と呼ばれる。AML1 はショウジョウバエの体節形成調節遺伝子 runt と相同性を持つ runt ドメインを有し、AML2(CBF α 3, PEBP2 α C), AML3(CBF α 2, PEBP2 α A)とともに、runt ファミリーに属する。これらは runt ドメインで DNA 結合能を持ち、標的 DNA の発現を調節する転写因子と考えられている。AML1 は造血細胞をはじめ、広範な組織において発現が認められているが、T 細胞受容体や GM-CSF 受容体、IL-3 受容体などの遺伝子には runt ドメインへの結合能を持つ転写調節配列が存在することから、AML1 はこれらの遺伝子の発現を通じて造血の制御を行っていると考えられている。

AML1 ノックアウトマウスは胎生 12.5 日に中枢神経系の出血で致死であり、中枢神経系の毛細血管形成部位と一致した出血や、毛細血管内皮細胞の壊死がみられることが報告されている。また、胎児の P-Sp (para-aortic splanchnopleura) の培養において AML1 の欠損で血管への分化がみられないことや、血管系細胞の培養において、AML1 の欠損により、増殖が障害されることが示されている。これらのことから、AML1 は、造血のみならず、血管形成においても重要な役割を果たしていることが予想される。

しかし、AML1 ノックアウトマウスは胎生致死であり、個体の血管内皮細胞における AML1 の役割については不明な点も多い。この研究では、Cre-loxP システムによるコンディショナルノックアウトの手法により、血管内皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Tie1-Cre トランスジェニックマウスを用いて、血管内皮細胞特異的に AML1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。

作成したコンディショナルノックアウトマウスでは、脳、心臓、肺といった比較的血管の豊富とされる臓器で *aml1* 遺伝子が高い欠損率を示すことをサザンブロット解析で確認し、大動脈内皮で *aml1* 遺伝子を欠損することを PCR 法で確認した。

コンディショナルノックアウトマウスは、正常に出生し、組織学的にも血管形成などに異常はなく、また、出血時間や血算にも異常はみられなかった。このことから、個体発生における、脈管形成(vasculogenesis)、血管新生(angiogenesis)はこのマウスにおいて正常であると考えられた。

生体における血管新生として、血管閉塞などの虚血に対する血管新生や腫瘍に対する血管新生がある。

前者の、虚血に対する血管新生としては、低酸素により、vascular endothelial growth factor (VEGF)が発現し、血管新生が引き起こされることや、basic fibroblast growth factor (bFGF)を介して、既存の細血管が成長する arteriogenesis などが知られている。これら进行评估するため、後肢虚血モデルを用いた。大腿動脈を血管結紮後の血流の回復を Laser Doppler perfusion imager(LPDI)にて測定し、血管新生を組織学的に検討したが、コンディショナルノックアウトマウスは、コントロールマウスと有意な差を認めなかった。

後者の、腫瘍による血管新生は、腫瘍の増殖、転移において必須であるとされ、腫瘍細胞の産生する VEGF、bFGF をはじめとする様々な血管新生因子により、周囲の血管新生が誘導される。VEGF などの産生能の高いとされるヒト HT-1080 線維芽細胞を用い、免疫反応を防ぐためメンブレンチャンバーに封入後マウスに移植し、周囲の血管新生を観察した。コンディショナルノックアウトマウスにてもコントロールマウスと同様に腫瘍による血管新生が認められた。

血管の機能的な面として、血管透過性が考えられる。VEGF を過剰発現したマウスでは、血管の透過性が亢進し、一方 angiotensin II を過剰発現させたマウスでは逆に血管透過性の低下がみられている。血管透過性を評価するため、刺激物質塗布による血中の色素の漏出を測定した。コンデ

ィショナルノックアウトマウスで、刺激前後の色素漏出の程度はコントロールマウスと同等であった。

これらの実験において、AML1 を血管内皮細胞特異的に欠損したコンディショナルマウスでも、血管系における異常は認められなかった。したがって、AML1 は血管内皮細胞自身においては、必要不可欠な機能をはたしているわけではないと予想される。一方では、AML1 ノックアウトマウスは中枢神経系に出血を引き起こすことから、AML1 は血管内皮細胞以外の細胞での機能を介して、間接的に血管新生に関与していると考えられる。その候補としては、AML1 欠損によって障害されることが示されている、造血細胞が考えられる。すなわち、血管新生においては、造血細胞との相互作用が必要であり、AML1 ノックアウトマウスでは、造血が障害される結果、血管新生も障害されるという機序が推測される。このことは、造血幹細胞が血管内皮細胞にも分化するという造血幹細胞の可塑性や、造血幹細胞による血管新生の促進作用などの知見とも関連があると考えられる。今後、造血細胞特異的に AML1 を欠損したマウスにおける血管形成、機能の解析や AML1 を欠損した造血幹細胞の可塑性の検討により、血管内皮細胞と造血細胞の相互作用における AML1 の役割について研究することが今後の課題である。