

Functional analysis of a gene involved in pediatric acute leukemia by gene targeting

遺伝子欠損マウスを用いた小児急性白血病関連遺伝子の機能解析

指導教官 北村俊雄
東京大学大学院医学系研究科
平成 13 年度入学
医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名 浦野敦司

[目的]

染色体相互転座はヒトの様々な悪性腫瘍、特に白血病やリンパ腫において見られる染色体異常であり、切断点に位置する遺伝子はその病態に深く関与する。小児急性白血病や治療性二次性白血病における主な原因の 1 つに、ヒト染色体 11q23 に位置する *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子での染色体相互転座が挙げられる。*MLL* は発生期においてホメオボックス(*Hox*) 遺伝子群を正に制御するハエ *trithorax* と相同性を有し、*MLL* 遺伝子欠損マウスや *MLL* 転座を伴った白血病において *Hox* の発現は変化する。*MLL* は染色体相互転座により 30 種類以上の遺伝子と融合遺伝子を形成することにより白血病の発症に関与し、その転座相手遺伝子は白血病の表現型を規定する。*AF5q31* は小児急性リンパ性白血病において *MLL* 転座の相手遺伝子として同定された。*AF5q31* は *AF4* や *LAF4* といった *MLL* 転座の他の相手遺伝子や、精神遅滞に関わる遺伝子として同定された *FMR2* と相同性を有し、転写活性化ドメインの存在から転写共役因子の可能性が示唆されている。近年、RNA polymerase II の伸長因子である P-TEFb (positive transcription elongation factor b) と相互作用することが報告されたが、その詳細な機能について不明な部分が多い。我々は *AF5q31* が生体内で担う機能の解明を目的として、*AF5q31* 遺伝子欠損マウスを作成した。

[実験方法および結果]

マウス *AF5q31* は 11 番染色体に位置し、少なくとも 21 個のエキソンより構成される。*AF5q31* 遺伝子欠損マウスは、1st ATG を含む第 2 エキソンおよび第 3 エキソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、定法に従い作成した。*AF5q31* ヘテロマウスの交配により *AF5q31* 欠損マウスを作成した結果、欠損マウスはメンデルの法則から予想される数の約 1/8 であった。詳細な解析の結果、*AF5q31* 欠損マウスは約 1/2 が胎生 12.5 日までに、残り約 3/8 が生後 24 時間以内に死亡することが明らかとなった。胎生 10.5 日より回収した *AF5q31* 欠損マウスは著しい成長遅滞を示し、マウスの各胎生期より回収した RNA によるノーザンブロットでは *AF5q31* の発現は胎生 10.5-12.5 日に発現のピークを示す。また生後 24 時間以内に死亡する *AF5q31* 欠損マウスではミルクスポットが観察されず、呼吸不全を起こす特徴を有した。これら *AF5q31* 欠損マウスの解剖学的解析では、肺において肺胞の拡張不全が確認された。

2 ヶ月以上生存する *AF5q31* 欠損マウスは健康状態および行動において異常は認められない。また骨髄細胞の各コロニー形成能、血球数、さらに各血液成分における異常も認められなかった。また精巣を除く各組織の解剖学的観察においても異常は認められなかった。興味深いことに雌の *AF5q31* 欠損マウスは正常に妊娠するが、雄は不妊を示した。生殖能力テストの結果から、雄の *AF5q31* 欠損マウスの一部にプラグ形成能は確認できたものの、全ての雄において妊娠能力が欠損していた。各組織より回収した RNA を用いてのノーザンブロットから、*AF5q31* の発現は心臓・肝臓等の広範囲に発現が認められ、特に精巣において強い発現を示した。同様にファミリー遺伝子である *AF4* および *LAF4*、*FMR2* の発現を調べた結果、精巣における発現がほとんど見られなかったことから、*AF5q31* 欠損マウスの精巣において *AF5q31* の機能はファミリー遺伝子により相補されていないことが示唆された。

形態学的比較では野生型マウスと *AF5q31* 欠損マウスの生殖器に異常は認められなかった。しかし *AF5q31* 欠損マウスでは野生型マウスと比較して精巣および精巣上体における著しい縮小、精嚢の肥大が認められた。また、血中のテストステロンにおいては統計学的有意差は認められなかった。精巣上体尾部を回収し、定法に従い精子数を測定したところ、*AF5q31* 欠損マウスは野生型の 0.1% 以下であり、その観察された全ての精子がアポトーシス後の死骸であったことから、*AF5q31* 欠損マウスは無精子症であることが判明した。*AF5q31* ヘテロマ

ウスに精子数・精子の形態・精子運動能の異常は認められなかった。

AF5q31 欠損マウスの精巣上体尾部を病理学的解析したところ、精子は全く観察されなかった。次に精巣の解析を同様に行ったところ、*AF5q31* 欠損マウスの精細管の形状およびセルトリ細胞、ライディッヒ細胞は野生型のマウスと同様に正常に観察された。しかし精子細胞は少なくとも **step 11** までは分化するが伸長・凝縮した精子細胞および内腔に放出された精子は観察することが出来なかった。

AF5q31 の発現部位を調べるために精巣の免疫染色を行ったところ、*AF5q31* は主にセルトリ細胞において発現が認められた。このことから *AF5q31* はセルトリ細胞と精子細胞との接触を通して、精子細胞の分化を制御していることが予想された。そこで、野生型マウスおよび *AF5q31* 欠損マウスの精巣より回収した RNA を用いて RT-PCR 法を行うことにより、精子発生に関与する遺伝子の発現の変化を調べた。遺伝子欠損マウスなどの解析から精子形成に必須とされる *CREM*、*TRF2*、*ACT*、*RAR α* 、*RXR β* といった遺伝子の発現に変化は見られなかった。さらに精子細胞から精子へと分化する際に発現することが知られている *Tpap*、*RT7*、*Hsc70t*、*Mcs*、*Pgk2* といった遺伝子の発現にも変化は見られなかった。精子細胞から精子へと分化する際には、ヒストンが **TP1** および **TP2** を経てプロタミン (**Prm1** および **Prm2**) に置換されることが知られている。最後にこれらの遺伝子発現を探索したところ、*AF5q31* 欠損マウスにおいて *TP1* はわずかな減少だったものの、*TP2* および *Prm1*、*Prm2* は著しくその発現が低下していた。

AF5q31 と P-TEFb の相互作用による RNA polymerase II 制御の関与の可能性を調べるためにマウス胎仔繊維芽細胞を野生型マウスおよび *AF5q31* 欠損マウスから調製し、RNA polymerase II のリン酸化の変化を特異的リン酸化抗体を用いて調べた。しかし野生型マウスと *AF5q31* 欠損マウスの間に差は認められなかった。そこで *AF5q31* ファミリー遺伝子による機能的代償の可能性を考え、次に精製した *AF5q31* および P-TEFb、RNA polymerase II のリン酸化されるドメインを用いた再構成系により *in vitro* kinase assay を行ったが、*AF5q31* の存在による RNA polymerase II のリン酸化の変化は観察されなかった。以上の結果より、*AF5q31* は一般的な転写調節機構ではなくセルトリ細胞における組織特異的な遺伝子の制御を通して精子形成を制御している可能性が示唆された。

AF5q31 欠損マウスにおける不妊と無精子症の原因を探るため、TUNEL 法により野生型マウスと *AF5q31* 欠損マウスの精巣を比較したところ、*AF5q31* 欠損

マウスにおいて約 6 倍以上の頻度で精子細胞のアポトーシスが引き起こされていることが明らかとなった。以上の結果から、AF5q31 は精子形成と生殖細胞の生存に必須であることが明らかとなった。

[考察]

AF5q31 およびファミリー遺伝子である AF4 の発現は、発生期および成熟した個体の各組織においても広く発現が確認されていることから、AF5q31 欠損マウスが様々な表現型を示していることは、AF5q31 の機能が AF4 などにより代償されている可能性が否定できない。現在までのところ、胎生期および新生仔における AF5q31 欠損マウスの死に対して、明確なメカニズムは明らかでなく、今後の課題である。

セルトリ細胞は生殖細胞との接触により精子形成に関与する。AF5q31 欠損マウスは無精子症を呈したが、その発現がセルトリ細胞に観察されることから、間接的に精子形成に関与していると予想されるが、そのメカニズムに関しては不明である。現在までにセルトリ細胞では幾つかの核内レセプターおよび共役因子と精子形成の関与が報告されていることから、これらの因子と AF5q31 の関係を調べることも興味深い。

ヒトの不妊症では *Prm1* および *Prm2* の発現量比の変化が知られ、また *Prm1*、*Prm2* および *TP2* はヒトおよびマウスの 16 番染色体に同方向に連続して存在することが知られている。AF5q31 欠損マウスでは *Prm1*、*Prm2* および *TP2* の著しい発現量の低下が観察された。過去の報告から、*TP1*・2 および *Prm1*・2 は精子形成の step 7 以降に発現が始まり、全転写反応が停止する step 11 まで転写されることが知られている。これらを考えあわせると、AF5q31 欠損マウスの不妊症の原因は *Prm1*、*Prm2* および *TP2* の発現量の低下による可能性が高い。AF5q31 がこれら遺伝子群の発現をどのように調節しているかは今後の検討課題であるが、ヒトの不妊症のメカニズムの解明に向けて AF5q31 は一つのあらたなアプローチを投げかける可能性が示唆された。