

論文の内容の要旨

論文題目 The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region

(傍大動脈臓側中胚葉領域からの造血発生には AML1 の転写活性化能が必要である)

指導教官 小川 誠司 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 合山 進

【はじめに】

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) 転座の転座切断点から単離された遺伝子であり、Runx1, CBF α 2, PEBP2 α Bとも呼ばれる。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 (Runx3), AML3 (Runx2) とともに、Runx 転写因子ファミリーに属する。これらは runt ドメインで DNA 及び共通の β subunit である CBF β (PEBP2 β) と結合し、標的 DNA の発現を調節する転写因子と考えられている。

AML1 ノックアウトマウスでは卵黄嚢での胚型赤血球造血は開始されるものの、それに続く成体型造血が欠如しており、そのため AML1 ノックアウトマウスは胎生 12.5 日に死亡する。このことは AML1 が成体型造血の開始に必須の役割を果たしていることを示している。

この研究では、成体型造血の始原と考えられている傍大動脈臓側中胚葉 (para-aortic

splanchnopleura, 以下 P-Sp) 領域の培養系を用いて、AML1 ノックアウトマウスの造血障害を試験管内で再現した。この P-Sp 培養系とレトロウイルスによる遺伝子導入法を組み合わせることにより、造血発生に必要な AML1 の機能ドメインを詳細に解析した。また、造血発生における Runx 転写因子間の機能重複の存在も明らかにした。

【材料および方法】

マウス

C57BL/6 へ backcross した AML1 wt/null (+/-) のオスマウスとメスマウスと交配し、性交後 9.5 日の胎仔を実験にもちいた。

P-Sp 培養法

胎生 9.5 日の胎仔から P-Sp 領域を採取し、造血支持能を持つ OP9 細胞上で培養した。胎仔の頭部を用いて PCR により遺伝子型を決定し、AML1 欠損 P-Sp に AML1 あるいは AML1 変異体の cDNA を組み込んだレトロウイルスを感染させた。4 日後に通常の培地に交換し、血液細胞が産生されるかどうかを観察した。産生された血液細胞は 14 日後に回収し、コロニーアッセイ及びフローサイトメトリーにより解析を行った。

レトロウイルスベクターとその感染方法

AML1 および AML1 変異体の cDNA は pMY-/IRES-EGFP レトロウイルスベクターに挿入した。これらのレトロウイルスベクターを Plat-E パッケージング細胞に transfection し、ウイルスを産生させた。培養上清を polybrene とともに P-Sp 培養系に加え、感染すなわち遺伝子導入をおこなった。

【結果】

AML1 欠損 P-Sp の培養結果

AML1 のノックアウトマウスは胎生期に成体型造血が完全に欠如して死亡するが、この現象を試験管内で再現するため、成体型造血の始原と考えられている P-Sp の培養をおこなった。野生型マウス及び AML1 (-/-) マウスより単離した P-Sp 領域を造血支持細胞 OP9 上で培養したところ、野生型 P-Sp 領域からは多数の血液細胞が産生されたのに対し、AML1 欠損 P-Sp 領域からは全く血液細胞が産生されなかった。(図 1、上段)

AML1 遺伝子の導入による造血発生能の回復

培養中の AML1 欠損 P-Sp 領域にレトロウイルスをもちいて AML1 遺伝子を導入したところ、野生型と同様の血球産生が回復した。(図 1、下段) この rescue された血液細胞は、野生型同様のコロニー形成能を持ち、CD45 などの血液表面マーカーも発現していた。

次に造血発生に必要な AML1 の機能ドメインを同定するために、様々な AML1 の変異体をレトロウイルスにより導入し、同様の実験を行った。その結果、(1) AML1 の血球産生能には DNA 結合に重要な Runt ドメインと C 端の転写活性化ドメインが重要であること、(2) 対照的に AML1 による転写抑制に関与すると言われているドメイン(mSin3A 結合ドメイン及び VWRPY motif) は必要ないこと、(3) 骨髄異形成症候群 (MDS) の患者より同定された点突然変異を有する AML1 変異体 (R139G) はその造血回復能を失うこと、(4) リン酸化やアセチル化をうける部分を変異させた AML1 変異体 (S249/266A 及び K24/43R) は造血能を保持していること、が明らかとなった。

(図 2)

AML2 (Runx3)、AML3 (Runx2) 遺伝子の導入による造血発生能の回復

AML1 は転写因子 Runx ファミリーに属する遺伝子であり、ヒトでは AML1 (Runx1) の他に、骨形成に必須の遺伝子である Runx2 (AML3)、胃癌や神経の発達に関わる Runx3 (AML2) が存在する。同様の実験系を用いて AML1 欠損 P-Sp に AML2、AML3 を導入したところ、AML1 同様に血球産生が回復した。

【考察】

今回私は、成体型造血の始原と考えられている P-Sp 領域と造血支持細胞 OP9 の共培養により、AML1 ノックアウトマウスで認める成体型造血の欠如を試験管内で再現することに成功した。また、この P-Sp 培養系とレトロウイルスによる遺伝子導入を組み合わせることにより、AML1 変異体の造血能を初代培養の系で簡便に調べることのできる実験系を確立した。

この実験系を用いて、様々な AML1 変異体の造血能を調べたところ、AML1 の造血能はその転写活性化能と密接に関連することが明らかとなった。また、造血発生における Runx 転写因子間の機能重複の存在も示すことができた。

この実験系を用いれば、AML1 の様々な機能を生体に近い条件で効率よく解析することが可能であり、今後の AML1 研究の発展に大きく寄与するものと考えている。

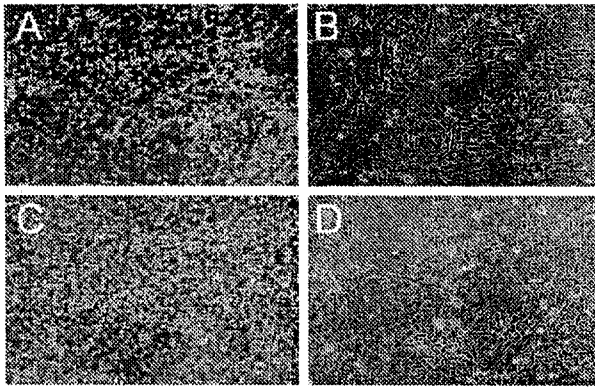


図 1

- (A) 正常なマウスの P-Sp は多数の血球を産生する。
- (B) AML1 欠損マウスより採取した P-Sp は、血球を産生することができない。
- (C) AML1 欠損 P-Sp にレトロウイルスを用いて AML1 を再導入すると、血球産生能が回復する。
- (D) AML1 欠損 P-Sp にベクターのみを感染させたものでは、血球の産生を認めない。

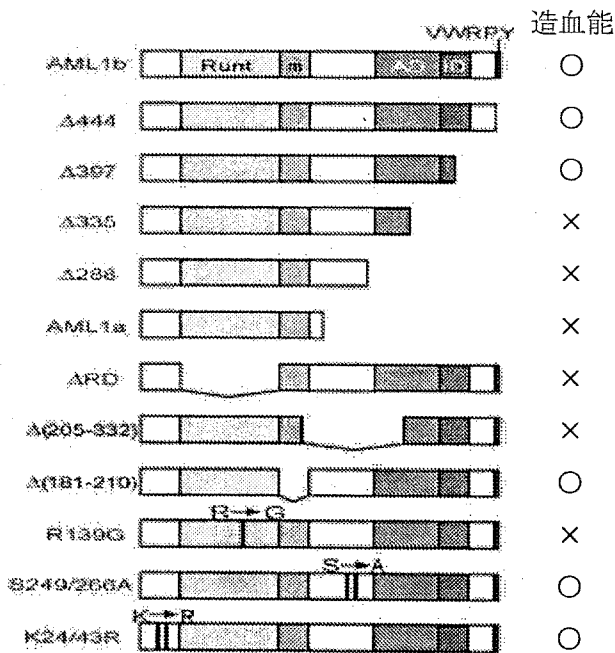


図 2

Runt ドメイン (Runt) 及び転写活性化ドメイン (AD) を持つものは造血能を有するが、それらを欠損したもの及び DNA 結合能を失った変異体 (R139G: MDS の症例より発見) は、造血能を欠いている。一方、リン酸化やアセチル化を受けない変異体は、造血能を保持している。

Runt: runt ドメイン、m: mSin3A 結合ドメイン、AD: activation ドメイン、ID: inhibitory ドメイン

VWRPY: VWRPY motif、S249/266A: リン酸化されない変異体、K24/43R: アセチル化されない変異体