

論文の内容の要旨

論文題目

AML1/Runx1 Rescues Notch1-Null Mutation-Induced Deficiency of Para-Aortic Splanchnopleural (P-Sp) Hematopoiesis

和訳

Runx1 による Notch1 欠損マウス P-Sp の in vitro 造血能の回復

指導教員 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 中川正宏

1. 序論

哺乳類の造血発生には胎生型造血と、成体型造血の 2 種類が知られている。マウスでは、前者は卵黄嚢(yolk sac)で胎生 7.5 日付近から作られる。後者は胎生 10 日付近から、大動脈-生殖隆起-中腎(AGM)領域で始まり、その後肝臓、脾臓、骨髄へと産生場所は移行していく。成体型造血の前駆細胞は胎生 7.5 から 9.5 日の傍大動脈臓側中胚葉(P-Sp)領域で最初に同定される。造血幹細胞は、自己複製能と多分化能で定義されるが、成体の造血を再構築できる細胞は AGM 領域で、新生児の造血を再構築できる細胞は P-Sp 領域で同定される。

種々のノックアウトマウスの研究などから、造血発生に必須とされている遺伝子がいくつか知られている。Runx1, GATA2, SCL などに加えて、近年 Notch1 も造血発生に必要であることが示された。しかし、drosophila や zebrafish でいくつか報告がされてはいるものの、依然哺乳類では、造血発生における各種転写因子の関係や経路は明らかにされていない。

2. 材料と方法

Notch1 ノックアウトマウスの P-Sp 領域では、造血に必要とされている Runx1 や SCL, GATA2 の発現が低下していることが報告されており、造血発生ではこれらが Notch シグナルの下流ではないかと考えた。

マウスの *in vivo* での造血発生は、P-Sp 培養を用いることにより、*in vitro* で再現できる。胎生 9.5 日目の胎児から P-Sp 領域を切り出して単個細胞浮遊液とし、各種サイトカインと共に OP9 間質細胞と共培養する。共培養により、野生型マウスの P-Sp 領域からは多数の浮遊細胞が出現し、これらは各種の血球系表面抗原や、コロニー産生能を有する。

成体型造血が障害されている、Notch1 ノックアウトマウスの P-Sp 領域をこの系で培養しても血球は全く産生されない。そこで、Notch1 ノックアウトマウスの P-Sp 培養に、レトロウィルスを用いて Notch1 の下流と予想した Runx1, SCL, GATA2 を発現させ、血球産生が回復するかを調べた。

なお、OP9 間質細胞は、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)を欠損するマウスから樹立された間質細胞株であり、造血支持細胞として各種血球の分化・誘導に用いられる。

3. 結果

Notch1 ノックアウトマウスの P-Sp 培養からは血球ができてこない(図 1A)が、この系にレトロウィルスを用いて Runx1, SCL, GATA2 を発現させると、驚くことに、Runx1 を導入した P-Sp 培養からのみ、血球の出現を認め(図 1B)

次に、Runx1 導入により回復した血球の評価を行うために、表面抗原とコロニー産生能を調べた。表面抗原では、汎白血球標識 CD45, 幹細胞標識 c-Kit, CD34, Sca1, 骨髄球系標識 Gr-1, Mac-1, 赤芽球系標識 Ter-119 を認め、野生型の P-Sp 培養から得られた結果とほぼ同様であった。(図 2A)

メチルセルロース培地を用いたコロニー形成能では、混合コロニー、顆粒球マクロファージコロニー、赤芽球系コロニーの産生がみられた。得られたコロニーのサイトスピン標本からは、顆粒球、マクロファージ、有核赤血球、脱核した赤血球がみられ、各種血球が産生されていた(図 2B)。野生型と同様の結果であった。

これらの結果から、Notch1 は、Runx1 を介して P-Sp 領域からの成体型造血発生に寄与していることが示唆された。

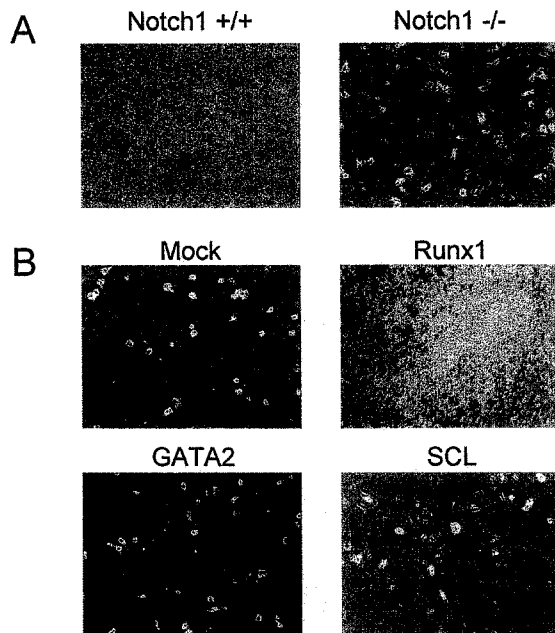


図 1

次に、造血発生における、Notch シグナルの下流としての Runx1 の機能を検討した。

Runx1 は各種のコアクティベーターやコリプレッサーと協調し、時間・空間依存的に、標的遺伝子の転写活性化因子として働くと同時に転写抑制因子としても働くことが知られている。また機能部位の解析も進んでおり、転写活性に必要な部位、転写抑制に必要な部位、DNA 結合に必要な部位、コアクティベーターやコリプレッサーに結合する部位など知られている。

そこで、Runx1 の各種機能部位を欠失した変異体を産生するレトロウィルス(図 3A)を用い、Notch1 ノックアウトマウスの P-Sp 培養に導入することにより、造血発生における Notch1 の下流としての Runx1 の機能を検討した。その結果、転写活性部位や Runt 部位を欠損した変異体では血球産生の回復は見られず、転写抑制部位を欠損した変異体では血球産生の回復がみられ、造血発生における Notch シグナルの下流としては、Runx1 の転写活性化能が必要であると考えられた(図 3B)。

続いて、Notch シグナルと Runx1 の関連を調べた。

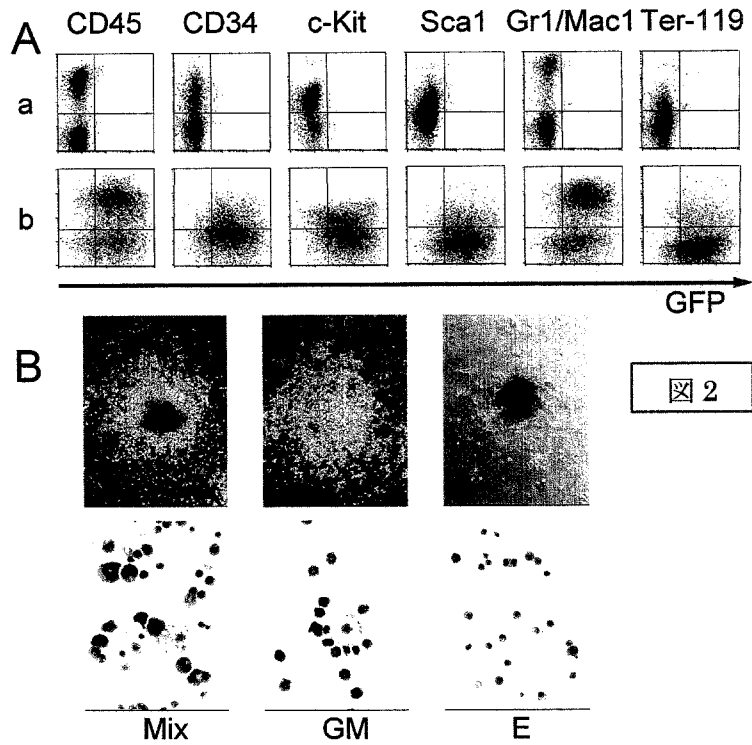


図 2

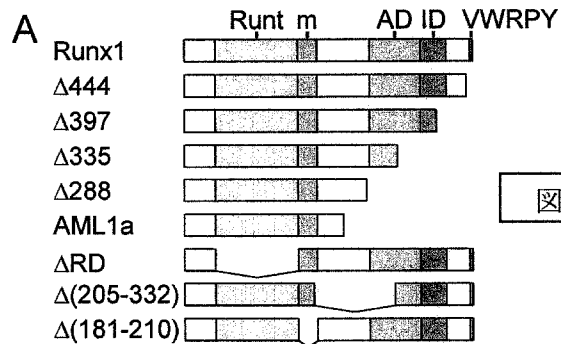
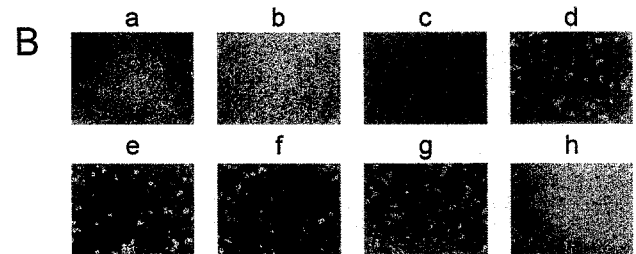


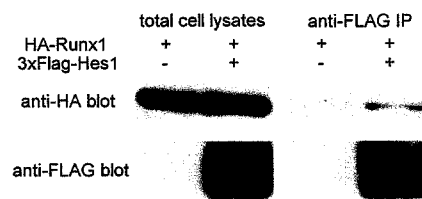
図 3



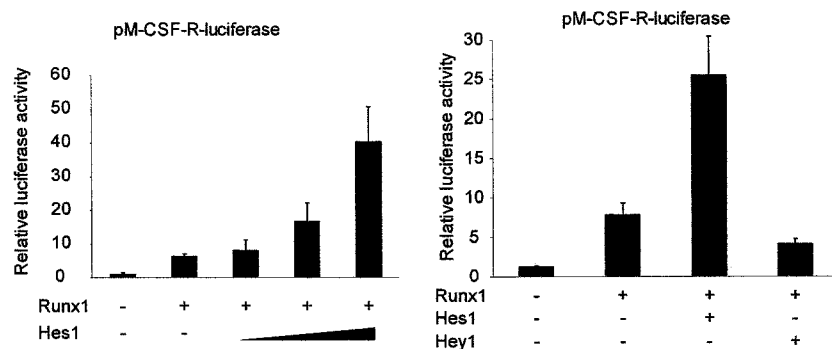
その結果、転写活性部位や Runt 部位を欠損した変異体では血球産生の回復は見られず、転写抑制部位を欠損した変異体では血球産生の回復がみられ、造血発生における Notch シグナルの下流としては、Runx1 の転写活性化能が必要であると考えられた(図 3B)。

Notch シグナルの下流としては、Hes1 がよく知られている。成体での造血幹細胞に関しては、Hes1 は Notch1 と同様に、造血幹細胞を維持すると報告されている。また、造血発生においては、AGM 領域から産生される血球で Hes1 が発現されていることも示されている。さらに、Hes1 は Notch シ

A



B



グナルと JAK/STAT シグナルや Wnt シグナルを仲介するという報告も 図 4 た、Runx ファミリーの Runx2 の転写活性化能を Hes1 が増強するという報告もある。

そこで、Hes1 が Runx1 の転写活性化能を増強させるかを、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで検討した。Runx1 と Hes1 が結合することは別の GST pull down アッセイで示されているが、今回、免疫沈降実験でも両者の結合が確かめられた(図 4A)。さらに、Hes1 は Runx1 の転写活性化能を用量依存的に増強することが示された(図 4B)。

このことから、Notch は Hes1 を介して、Runx1 の機能を制御している可能性が示唆された。

4. 考察

本研究では、哺乳類の造血発生において、Notch-Runx 経路が非常に重要な働きをしていることが示唆された。ごく最近、zebrafish においても Notch-Runx 経路が造血幹細胞の制御に重要であることが報告されており、以前に *drosophila* の初期血球分化においても Notch-Runx 経路が報告されている。Notch シグナルが Runx1 の発現を制御しているだけでなく、Runx1 の機能を制御している可能性も新たに示唆された。

造血器腫瘍等に対する治療として、現在広く造血幹細胞移植が行われて

いる。近年では造血幹細胞のソースとして、臍帯血も用いられるようになっていく。しかし、しばしば造血幹細胞の数の不足による生着遅延や免疫回復の遅れが問題となり、造血幹細胞の増幅技術の確立が切望されている。また、様々な疾患の治療に輸血が行われているが、感染症の危険や、献血者の不足から、胚性幹細胞や臍帯血などをソースとしての血液の生産も望まれている。Notch シグナルを用いて臍帯血の造血幹細胞を増幅したとする報告はあるが、まだ実用化されていない。さらに、近年の研究により、白血病の発生・維持・治療において、白血病幹細胞の概念が提唱されている。そして、造血発生に必須であることがわかっている遺伝子の多くは、白血病の遺伝子異常から発見されたがん遺伝子である。急性リンパ球性白血病においては、非常に高率に Notch1 の活性化型変異がみられることが報告されており、急性骨髄性白血病でみられるもっとも多い遺伝子異常の一つに Runx1 の遺伝子異常がある。

造血発生における分子機序を解明することは、造血幹細胞の増幅、血液の分化誘導、腫瘍発生の研究に非常に役立つことが期待される。本研究では、造血発生における重要な Notch シグナルと Runx1 の関連を示した点で非常に興味深いと考えられた。