

論文の内容の要旨

論文題目

Phosphorylation of AML1/Runx1 is Essential for Efficient T-Cell Differentiation and Early Hematopoietic Development

和訳

AML1 のリン酸化修飾が T 細胞分化および造血発生に及ぼす影響

指導教員 黒川 峰夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 吉見 (山本) 真弓

1. はじめに

AML1/Runx1 は、ヒトの急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異型性症候群 (MDS) を最も高頻度に発症させる原因遺伝子の一つである。

近年、遺伝子改変マウスの解析を通して AML1 による生物作用についても明らかになってきた。AML1 欠損マウスは、胎仔肝での生体型造血の欠如によって胎生致死となり、胎生

中期（12.5 日）に死亡する。また、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)領域と造血支持細胞 OP-9 との共培養系を用いて、AML1 欠損マウスで認められる成体型造血の欠如を試験管内で再現し、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、導入遺伝子の造血能を評価することも可能となった。

また、AML1 は T 細胞分化においても重要な役割をしている。AML1 条件的欠損マウスの生体内で認められた T 細胞分化についても胎仔肝細胞及び造血支持細胞 OP-9 との共培養によって試験管内で再現することが可能となった結果、AML1 が T 細胞の DN から DP 期への移行および DN 期での CD4 発現の抑制にも重要であることが報告されている。

更に、白血病発症及び造血に関与する転写因子 AML1 は、複数のキナーゼによりリン酸化修飾され、機能調節を受けることやその分子機構についても明らかにされている。

しかしながら、これまで生体内におけるリン酸化修飾の部位、意義については依然不明であった。そこで今回我々は、過去の報告において AML1 の転写活性能に影響を及ぼすとされる 4 つのセリン(S)/スレオニン(T)残基(S276, S293, T300, S303)の 2 つ、もしくは 4 つをアラニン(A)に置換したリン酸化抑制変異体(AML1-2A, AML1-4A)、及びアスパラギン酸(D)に置換したリン酸化模倣変異体(AML1-4D)を作成し(図 1-a)、初代培養の系を用いて AML1 のリン酸化修飾による生物的影響について検証を試みた。

その結果、前述した 4 か所のリン酸化修飾が T 細胞分化における DN から DP 期への移行に関与する役割に影響を及ぼしていることがわかった。そして更に、5 か所(S276, S293, T300, S303, S462)についても同様の実験を行ったところ、これら 5 か所のリン酸化修飾が AML1 の T 細胞分化及び造血発生における機能に重要な影響を及ぼしていることがわかった。

2. 材料と方法

マウス

胎仔肝細胞及び造血支持細胞培養系(FL/△OP-9 Culture)に対しては、AML1 floxed/wt (以下 f/+), Lck-Cre tg のオスマウスを AML1 floxed/ floxed (以下 f/f)メスマウスと交配し、性交後 14.5 日の胎仔を実験に用いた。

傍大動脈臓側中胚葉領域と造血支持細胞培養系(P-Sp/ OP-9Culture)に対しては、AML1 wt/null (+/-)のオスマウスとメスマウスと交配し、性交後 9.5 日の胎仔を実験に用いた。

FL/△OP-9 培養法

胎生 14.5 日の胎仔から得られた胎仔肝細胞を OP9-DL1 細胞上で IL-7 存在下において 5 日間培養する。PCR によって遺伝子型を決定し、条件的 AML1 欠損の細胞に対して 5 日目に野生型 AML1 あるいはそのリン酸化変異体の cDNA を組み込んだレトロウイルスを感染させ、その 5 日後（培養 10 日目）および 10 日後（培養 15 日目）に細胞を回収し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

P-Sp/ OP-9 培養法

胎生 9.5 日の胎仔から P-Sp 領域を採取し、OP9 細胞上で培養した。PCR により遺伝子型を決定し、AML1 欠損 P-Sp に対して AML1 あるいはそのリン酸化変異体の 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、産生された血液細胞は 14 日後に回収し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

レトロウイルスベクターとその感染方法

AML1 および AML1 リン酸化変異体の cDNA は pMYsIG-/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。ウイルスを含んだ培養上清を polybrene と共に FL/△OP-9 或いは P-Sp/ OP-9 培養系に加え、感染すなわち遺伝子導入を行った。

3. 結果

4 か所のセリン/スレオニン残基における AML1 のリン酸化は、T 細胞分化における DN

から DP 期への移行に重要

まず、AML1 条件的欠損マウスの FL/△OP-9 培養系を用いて各リン酸化変異体の T 細胞分化誘導能を調べた。T 細胞の DN から DP 期への移行に関し、AML1-4D は野生型 AML1 と同程度の分化を示したのに対し、AML1-2A では若干の、そして AML1-4A では明らかな分化能の低下を認めた。(図 1-b) また、DN 期での CD4 遺伝子発現に関しては、野生型 AML1 と比較し、AML1-4A ではわずかに発現上昇しているように見えたが、統計解析において有意差を認めなかった。(図 1-c)

MEK 阻害剤は、AML1 依存性 T 細胞分化を阻害

続いて、4 か所のリン酸化修飾は過去の報告において、ERK 経路の関与が示唆されていたことから、MEK 阻害剤が T 細胞分化に及ぼす影響について調べた。その結果、MEK 阻害剤は野生型 AML1 による T 細胞分化誘導能を抑制するが、AML1-4D による分化誘導能を抑制することはできないことが明らかとなった。(図 2)

AML1 の 4 か所におけるリン酸化によって AML1 欠損の P-SP 造血は回復可能

次に、AML1 欠損マウスの P-Sp/OP-9 培養系を用いて各リン酸化変異体の造血発生能を調べたところ、AML1-4A による血球産生の開始時期は野生型 AML1 や AML1-4D 導入時に比べ遅延したが、最終的には造血能の回復を認め、またフローサイトメトリーにおいて CD45 陽性細胞の出現率を比較したところ差を認めなかった。

5 か所のセリン/スレオニン残基における AML1 のリン酸化は、T 細胞分化及び初期造血発生に必須

これまでの結果を踏まえると、AML1-4A の造血能は若干低下しているものの依然保持されていることが考えられた為、更に 462 番目のセリン残基にも注目した。AML1 の C 末端領域には、計 11 か所のセリン/スレオニン残基が存在しているが、上記 4 つのセリン/スレオニン残基と共に同部位は PMA 刺激を加えてやるとリン酸化が亢進する部位であることが報告されている。そこで、上記 4 か所に加え 462 番目のセリンもアラニンに置換した

AML1-5A の機能を調べた。(図 4-a) すると、AML1-5A は T 細胞分化における DN から DP 期への移行 (図 4-b) 及び DN 期での CD4 遺伝子発現の抑制 (図 4-c)、そして P-Sp による初期造血発生 (図 4-d)、これらいずれの場合においても完全な機能喪失を示した。

以上の結果より、上記 5 か所のセリン/スレオニン残基が AML1 の T 細胞分化誘導能及び初期造血発生能に重要であることが明らかとなった。

4. 考察

AML1 のセリン/スレオニン残基を 4 か所或いは 5 か所アラニンに置換し、リン酸化抑制体とした AML1-4A や AML1-5A では、T 細胞分化及び初期造血発生における機能低下或いは完全な機能喪失を認めた。一方、セリン/スレオニン残基をアスパラギン酸に置換し、リン酸化模倣体とした AML1-4D や AML1-5D では T 細胞分化及び初期造血発生において、野生型と同程度の機能を示していた。よって今回各変異体の間で認められた T 細胞分化及び造血発生における差は、AML1 のリン酸化修飾による影響が示唆される。

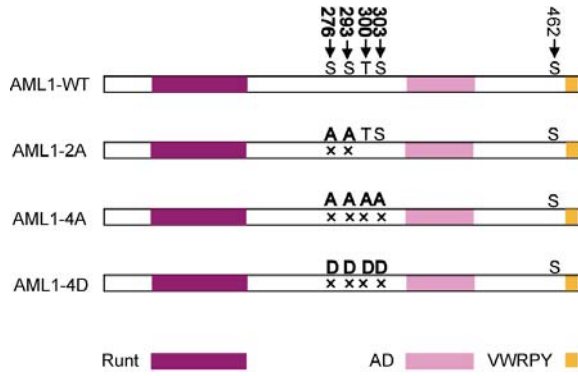
また、MEK 阻害剤を用いた実験結果より、ERK といった特定のリン酸化経路の関与も示唆された。

更に、AML1 は、もともと急性骨髄性白血病の症例に合併する染色体転座、t(8;21)(q22;q22) の第 21 番染色体上の切断点よりクローニングされた遺伝子であるが、染色体相互転座によって再構成され、AML1/MTG(ETO)や AML1/Evi1 のような融合型遺伝子形成に関与することが知られている。そして、これらの融合遺伝子は、各々 t(8;21) や t(3;21) 転座に関与する白血病発症をきたすが、興味深い点として、これらの染色体再構成の際に、AML1 の前述している 5 か所のリン酸化部位は全て喪失している。このことから、融合遺伝子による白血病発症機構に、これら 5 か所のリン酸化修飾の喪失が関与している可能性も示唆される。

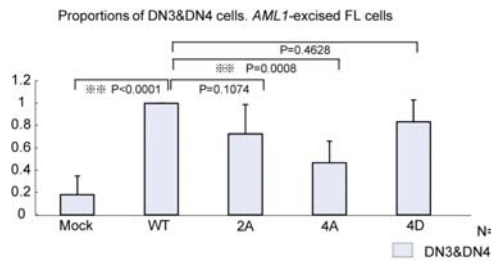
最後に、本研究結果をまとめると、AML1 の 5 か所(S276, S293, T300, S303, S462)におけるリン酸化修飾が協調的・相補的に働くことで、T 細胞分化における DN から DP 期への移行、

或いは DN 期での CD4 発現の抑制に重要な役割を担い、更に P-Sp による成体型造血初期発生にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

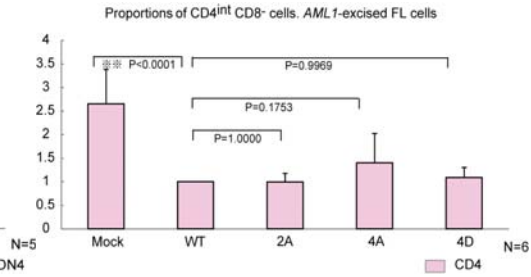
☒ 1-a



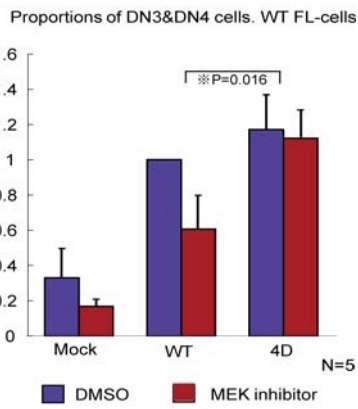
☒ 1-b



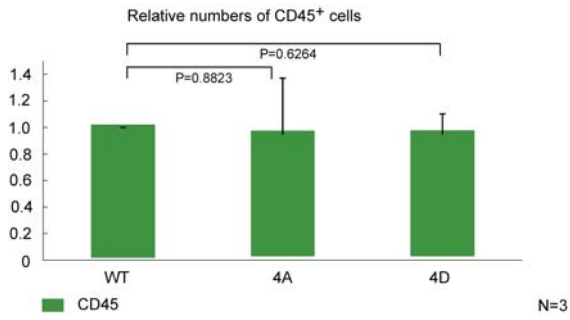
☒ 1-c



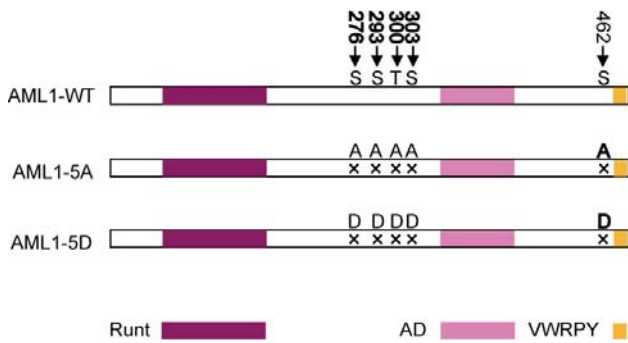
☒ 2



☒ 3

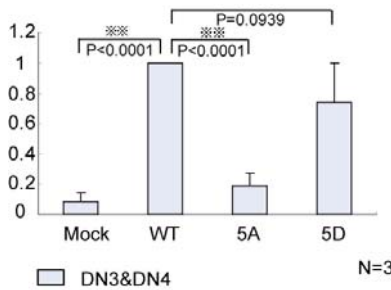


☒ 4-a



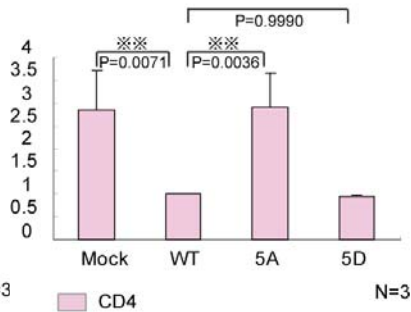
☒ 4-b

Proportions of DN3&DN4 cells.
AML1-excised FL cells



☒ 4-c

Proportions of CD4^{int} CD8⁻ cells.
AML1-excised FL cells



☒ 4-d

