

論文の内容の要旨

論文題目 Evi-1 promotes para-aortic splanchnopleural hematopoiesis through up-regulation of GATA-2 and repression of TGF- β signaling

Evi-1 は GATA-2 の上方調節と TGF- β シグナル抑制を介して傍大動脈臓側板中胚葉における造血を促進する

指導教官 黒川 峰夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

佐藤 智彦

【はじめに】

白血病関連転写因子 Evi-1(ecotropic viral integration site-1)はマウスに白血病を引き起こす遺伝子として同定され、その後にヒトの白血病や骨髄異形成症候群で高発現していることが判明した。さらに Evi-1 の高発現は白血病における予後不良因子として報告されておりその臨床的意義も高い。

Evi-1 ノックアウトマウスは出血、多臓器の発達障害で胎生致死である。正常な造血において必要な Evi-1 の機能領域や Evi-1 と他因子との関わりなどの詳細は不明である。

この研究では、私は成体型造血の始原と考えられている傍大動脈臓側板中胚葉(para-aortic splanchnopleura、以下 P-Sp)領域の培養系とレトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて、胎生期造血における Evi-1 の機能領域を詳細に解析した。また、Evi-1 による胎生期造血の制御に GATA-2 経路と TGF- β 経路が関与することも明らかにした。

【材料および方法】

マウス

C57BL/6 へ戻し交雑した Evi-1 +/- (wt/null) の雌・雄マウスを交配し、性交後 9.5 日の胎仔を以下の P-Sp 培養に用いた。

P-Sp 培養法

胎生 9.5 日の胎仔から P-Sp 領域を採取し single cell にした後、造血支持能を持つストローマ細胞 OP9 上で共培養した。胎仔の頭部由来のゲノムを鋳型として PCR により遺伝子型を決定し、Evi-1 欠損 P-Sp に Evi-1 ないしは Evi-1 変異体の cDNA を組み込んだレトロウイルスを感染させた。共培養から 5-7 日後で血球細胞の産生を観察し、その後その血球細胞を回収し、半固型培地上でコロニーアッセイを行った。

レトロウイルスベクターとその感染方法

Evi-1 および Evi-1 変異体の cDNA はそれぞれ pGCDN_{Sam}-IRES-GFP レトロウイルスベクターに挿入した。各レトロウイルスベクターを PLAT-E パッケージング細胞にトランスフェクションしてレトロウイルスを産生させた。その培養上清を Polybrene とともに OP9/P-Sp 共培養系に添加し、レトロウイルスの感染つまり遺伝子導入を行った。

【結果】

Evi-1 欠損 P-Sp の培養結果

Evi-1 欠損 P-Sp 領域は、OP9/P-Sp 共培養により試験管内で正常 P-Sp 領域と同程度に血球細胞を産生することができた。(図 1 (a)) ところが、血球細胞の増殖能 (stem/progenitor 活性) を示すコロニー形成能は正常 P-Sp 領域に比較して Evi-1 欠損 P-Sp 領域のそれは著しく低かった。(図 1 (b))

Evi-1 遺伝子の導入による造血発生能の回復

OP9/P-Sp 共培養中の Evi-1 欠損 P-Sp 領域にレトロウイルスを用いて Evi-1 遺伝子を導入すると、その著しく低かったコロニー形成能の回復を認めた。

次に正常造血に必要な Evi-1 遺伝子の機能領域を同定するために、Evi-1 欠損 P-Sp 細胞に様々な Evi-1 変異体および Evi-1 アイソフォームをレトロウイルスにより導入して同様の実験を行った。その結果、①Evi-1 の造血能には第 1 Zn フィンガー領域及び酸性アミノ酸領域が重要であること、②造腫瘍性の高い Evi-1a に対してそれが低いアイソフォーム Evi-1c も、正常造血においては Evi-1a と同等の造血能を有すること、が

明らかになった。(図 2)

GATA-2 遺伝子の導入による造血発生の回復

Evi-1 の標的遺伝子を探す目的で、いくつかの造血関連遺伝子や造血幹細胞制御遺伝子を Evi-1 欠損 P-Sp 培養細胞にレトロウイルスで導入した。その結果、造血系転写因子 GATA-2 のみで Evi-1 欠損 P-Sp 領域のコロニー形成能を回復させた。さらに Evi-1 変異体の造血能は GATA-2 転写活性化能とよく相関しており、第 1Zn フィンガー領域と酸性アミノ酸領域を介した GATA-2 の活性化が Evi-1 による造血細胞増殖に重要であることが判明した。

TGF-β シグナル抑制による造血発生の回復

TGF-β が造血を負に制御する因子の一つであり、また Evi-1 が Smad3 を介して TGF-β 経路を抑制することで細胞増殖に関与することがすでに報告されていることから、Evi-1 による胎生期造血制御に TGF-β 経路が関与するかを検討した。Evi-1 欠損 P-Sp 培養細胞に TGF-βI 型受容体 (ALK5) 阻害剤を添加すること、および dominant-negative type Smad3 をレトロウイルスにより導入すること、いずれにおいても Evi-1 欠損 P-Sp 細胞のコロニー形成能が回復し、TGF-β シグナルの阻害を介しての造血制御も明らかとなった。

GATA-2 経路と TGF-β 経路の相互作用

Evi-1 による胎生期造血制御に関与する GATA-2 経路と TGF-β 経路の相互作用について検討した。P-Sp 培養細胞に TGF-βI 型受容体 (ALK5) 阻害剤を添加もしくは dominant-negative type Smad3 をレトロウイルスで導入して TGF-β 経路を阻害してその細胞より mRNA を抽出して定量リアルタイム PCR を行ったところ GATA-2 mRNA 発現量に変化は無く、TGF-β シグナル抑制は転写レベルで GATA-2 発現を抑制していないと考えられた。また GATA-2 を導入した HepG2 細胞を用いて、TGF-β に関連する (PAI-1 プロモータ) ルシフェラーゼアッセイを行い GATA-2 が有意に TGF-β 経路の転写活性を抑制することが明らかになった。

【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 の共培養系を用いて、正常造血における Evi-1 の機能領域を同定した。その機能領域と考えられる 2 領域、第 1Zn フィンガー領域と酸性アミノ酸領域、は GATA-2 の上方調節と関与していた。また Evi-1 による TGF-β シグナルの抑制も胎生期造血制御に関与していることを明らかにした。さらに GATA-2 経路と TGF-β 経路の 2 経路の相互作用の可能性についても発展させた。

この結果は白血病原因遺伝子 Evi-1 が、いくつかのメカニズムを介して正常な造血幹/前駆細胞の増殖そのものを促進する遺伝子であることを示す重要な所見と考える。また今後の Evi-1 研究、特に標的遺伝子の検索のツールとして今回の OP9/P-Sp 共培養系の利用価値は高いと考える。

上記に併せて、私は造腫瘍性の低い Evi-1 アイソフォーム Evi-1c が造腫瘍性の高い Evi-1a と同程度に正常造血に寄与することも明らかにした。この結果は正常造血における Evi-1 アイソフォームの機能重複を示す重要な所見と考える。

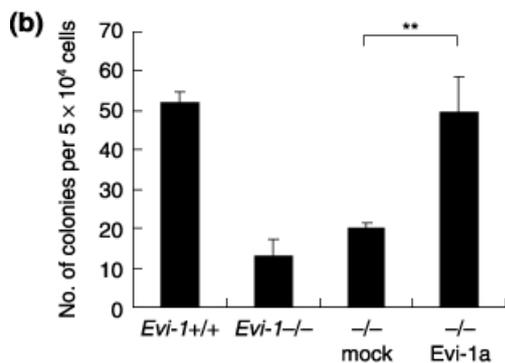
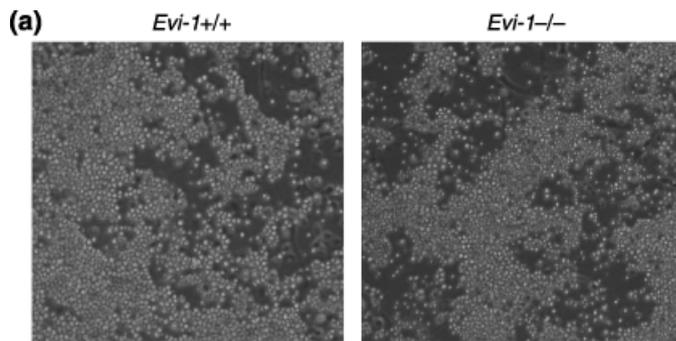


図 1

- (a) Evi-1 欠損 P-Sp 領域は正常 P-Sp 領域と同程度に血球細胞を産生する。
- (b) Evi-1 欠損 P-Sp 培養細胞はそのコロニー形成能が正常 P-Sp より著しく低い。

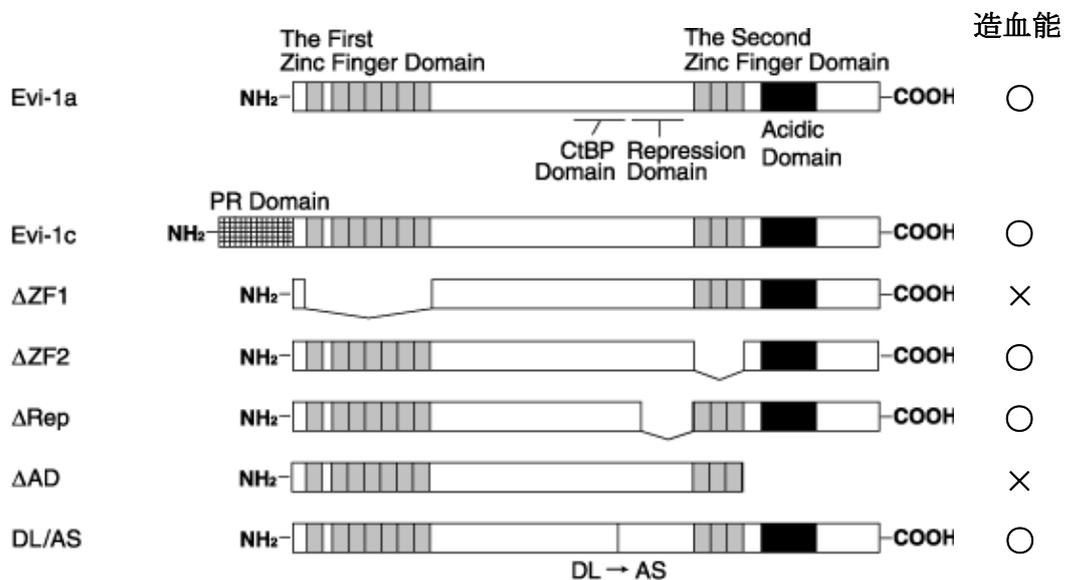


図 2

第1Znフィンガー領域および酸性アミノ酸領域を有する Evi-1 変異体は造血能を有するが、それらを欠く変異体は造血能が低い。Evi-1 アイソフォームの Evi-1c は造血能を保持している。

ZF1 : 第1Znフィンガー領域、ZF2 : 第2Znフィンガー領域、Rep : 抑制領域、AD : 酸性アミノ酸領域、DL/AS : CtBP が結合できない変異体