

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 智彦

本研究は、難治性白血病の発症・進展において重要な役割を演じていると考えられる白血病関連転写因子 Ecotropic viral integration site-1 (Evi-1)について、それによる正常胎生期造血の制御機構を解析を試みたものである。そのために Evi-1 ノックアウトマウスの傍大動脈臓側板中胚葉 (P-Sp) 領域に、各 Evi-1 変異体をレトロウイルスで導入し、半固形培地でコロニーアッセイをする系を用い、Evi-1 の機能領域解析を行っており、下記の結果を得ている。

1. 初期造血発生の場である P-Sp 領域を適切な条件で培養すると血液細胞の産生を誘導することができ、これは初期造血発生の過程を *in vitro* で再現したものと考えられる。Exon4 を欠損させた新規 Evi-1 ノックアウトマウス由来の Evi-1 欠損 P-Sp 領域から産生された血液細胞は、その造血幹細胞活性の低下を反映して、コロニー形成能が野生型細胞と比べて著しく低下していた。

2. Evi-1 欠損 P-Sp 領域にレトロウイルスを用いて Evi-1 遺伝子を導入して、その著しく低かったコロニー形成能の回復を認めた。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い、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、が示された。

3. Evi-1 の下流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、その結果、造血系転写因子 GATA-2 の導入で Evi-1 欠損 P-Sp 領域のコロニー形成能の回復が認められた。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示された。

4. TGF- $\beta$  が造血を負に制御する因子の一つであること、また Evi-1 が Smad3 を介して TGF- $\beta$  経路を抑制することから、胎生期造血における Evi-1 と TGF- $\beta$  経路の関与を検討し、Evi-1 欠損 P-Sp 培養細胞に TGF- $\beta$  I 型受容体阻害剤 (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して Evi-1 欠損 P-Sp 細胞のコロニー形成能の回復を認めた。

5. Evi-1 による胎生期造血制御に關与する GATA-2 経路と TGF- $\beta$  経路の相互作用について、TGF- $\beta$  I 型受容体阻害剤（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た P-Sp 培養細胞に定量リアルタイム PCR を行い、GATA-2 mRNA 発現量の変化は認められず、TGF- $\beta$  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- $\beta$  に關連する（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- $\beta$  経路の転写活性を抑制することが示された。

以上、本論文は正常な胎生期造血において、Evi-1 欠損 P-Sp 領域の解析から、Evi-1 が GATA-2 経路及び TGF- $\beta$  経路を介して造血幹/前駆細胞の増殖に寄与していることを明らかにした。白血病発症及びその進展に重要な役割を担う造血系転写因子が正常造血で果たす役割を解明することは、造血細胞の悪性化との関係を明らかにする上で非常に重要であり、本研究は転写因子 Evi-1 に関して正常造血における知見を深めた点で、難治性白血病の発症・進展の分子機構解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。