

## 論文の内容の要旨

論文題目 BAALC の胎生期における組織形成および造血に与える影響

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 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 永井純正

*BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic)は急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia, AML)症例で高発現している遺伝子として 2001 年に同定された。その後、AML の約 4 割を占める正常核型 AML 症例を *BAALC* 高発現群と低発現群に分けた場合に、高発現群において完全寛解率の低下、生存率の低下が認められることが報告された。すなわち、*BAALC* 高発現の AML 細胞は化学療法抵抗性であると考えられる。*BAALC* は exon 1 から 8 までで構成され、哺乳類間での相同性は非常に高く、ヒトでもマウスでも正常組織では exon 1-6-8、exon 1-8 の 2 つの transcriptional variant が存在する。ヒト白血病細胞では exon 1-5-6-8、exon 1-4-5-6-8、exon 1-5-6-7-8 の variant も存在する。ヒトの造血系では CD34 陽性細胞など未分化な細胞での発現が高く、分化とともに発現が低下していくことが知られている。しかしながら、*BAALC* における基礎データとしてこれまでに知られている事実はこの程度であり、

BAALC がどのような機能を持っているかは未知のままである。そこで私は、BAALC の遺伝子改変マウスならびにレトロウイルスによる過剰発現の系を作成し、その生体内での役割について解析した。

まず、wild C57BL/6 マウスにおける BAALC cDNA 発現量を real-time RT-PCR 法により測定したところ、脳と比較すると造血組織での発現量は低い傾向にあるものの、造血系においてはマウスでも未分化な KSL 分画で BAALC の発現が高いことが明らかとなった。

次に、BAALC の全ての transcriptional variant が欠損するように、exon1 を loxp ではさむ形の targeting vector を C57BL/6 マウスの ES 細胞に導入して遺伝子改変マウスを作成した。

BAALC ヘテロ(+/-)マウス同士の交配により BAALC conventional ノックアウトマウス(-/-)を作成し、表現型解析を施行した。胎生 12.5 日まではオス、メスいずれもメンデル遺伝の法則にほぼ従っていたが、胎生 13.5 日以降ではメスのノックアウトマウスは観察されなかった。胎生 11.5 日におけるメスのノックアウトマウスの形態については、wild、ヘテロマウスと比較して明らかに小さく、一部では循環不全により水腫を認める胎児も見受けられた。最も顕著な外見上の異常は胎盤に存在し、ノックアウトマウスの胎盤は薄く、単離する際にもろく崩れてしまうものが大半であった。胎生 12.5 日のメスのノックアウトマウスでも胎児の大きさが小さく、胎盤が薄く赤みに欠けるという傾向は同様であった。しかし、胎児の異常はより顕著であり、眼を含む頭部が欠損しているものや明らかな死骸が観察された。以上から、メスのノックアウトマウスでは、胎盤の形成不全により胎生 11.5-12.5 日で胎生致死となることが分かった。一方で、オスのノックアウトマウスについては、メスで観察されたような明らかな異常は胎生 11.5、12.5 日で認められないものの、産仔の頻度は

wild のオスの約半分であり、一部がすり抜けて生存するものと考えられた。すり抜けたオスのノックアウトマウスの外見は胎生 13.5 日、14.5 日、産仔いずれにおいても wild マウスと比較して明らかな相違はなかった。このオスとメスの表現型の差異における原因を探るため、胎生 11.5 日における wild、ヘテロ、ノックアウトマウスの性別毎の胎盤の重量を測定した。Wild マウスにおいてもオスで有意に胎盤重量が重く、その性差はノックアウトマウスで顕著であった。従って、胎盤重量の性差がノックアウトマウスの表現型を説明する要因と考えられた。さらに、メスのノックアウトマウスの胎盤の異常について詳細を解析するために、胎生 11.5 日における胎盤の HE(Hematoxilin-Eosin)染色による病理組織像を調べた。ノックアウトマウスでは海綿状栄養膜細胞の胎盤迷路への侵入がほぼ認められず、また、迷路細胞の成熟度合いを示す、迷路細胞の癒合傾向もノックアウトマウスでは阻害されていた。以上から、メスのノックアウトマウスでは海綿状栄養膜細胞、迷路細胞の成熟が wild マウスと比較して遅れていることが明らかとなった。

次に、胎生 11.5 日における yolk sac を用いて BAALC の胎生期造血に与える影響を解析した。Yolk sac の細胞をメチルセルロース半固形培地で培養したところ、ノックアウトマウスで wild マウスより有意に GM コロニー (colony-forming unit-granulocyte macrophage : CFU-GM、myeloid コロニー) の形成能が亢進していた。その yolk sac の構成細胞の表面マーカーを解析したところ、ノックアウトマウスにおいて、造血細胞ならびに造血幹細胞の数に変化はないことが示唆された。また、アポトーシスを起こしている細胞数にも相違は認められなかった。しかし、細胞周期を解析したところ、ノックアウトマウスで有意に G0/G1 の静止期にある細胞数が少なく、G2/M 期にある細胞数が有意に多かった。以上から、

ノックアウトマウスの *yolk sac* の造血細胞では細胞周期の回転亢進によりコロニー形成能が亢進していると考えられた。

次に、BAALC 過剰発現が造血に与える影響を解析した。レトロウイルスにより BAALC を導入した骨髄細胞のメチルセルロース半固形培地におけるコロニー形成能をまず解析した。その結果、全ての BAALC の transcriptional variant について、各々過剰発現させた骨髄細胞は mock と比較してコロニー形成能の有意な低下を認めた。以上から、BAALC 過剰発現は造血細胞の *in vitro* での増殖能を抑制することが明らかとなった。

次に、BAALC 過剰発現の *in vivo* での増殖能に与える影響を調べるために、マウス骨髄移植モデルで解析を行った。レトロウイルスで BAALC を過剰発現させた骨髄細胞  $1 \times 10^5$  個を GFP でマーキングし、wild マウスから回収した骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個と同時に、9Gy 放射線照射したマウスに移植を施行した。移植後のレシピエントマウスの末梢血における GFP 陽性細胞の割合によりキメリズムを解析した。BAALC 過剰発現細胞を移植したマウスは移植後 1 年間の観察期間で白血病を発症せず、その GFP 陽性細胞の割合は mock を移植したマウスと比較して、生着後から一貫して有意に低いことが分かった。以上から、*in vivo* においても BAALC を過剰発現した造血細胞の増殖能は抑制されることが明らかとなった。

次に、BAALC 過剰発現による増殖能の抑制が何に起因するものかを調べた。レトロウイルスで BAALC を過剰発現させた骨髄細胞から RNA を回収し、microarray により mock との比較を行った。GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) を用いた解析により、BAALC を過剰発現させた骨髄細胞では p53 の経路が有意に活性化していることが明らかとなった。そこで、p53 ノックアウトマウスの骨髄細胞にレトロウイルスで BAALC を過剰発現させてコロニ

一形成能の解析を施行した。すると、BAALC 過剰発現によるコロニー形成能の抑制は p53 非存在下では認められず、mock と同等の増殖能を持つことが分かった。このことから、BAALC 過剰発現による増殖能の抑制は p53 依存性であることが明らかとなった。

以上まとめると、私は今回の研究により、以下の事実を初めて明らかとした。

- ・ BAALC は胎生期における胎盤の組織形成、詳しくは海綿状栄養膜細胞と迷路細胞の成熟に必須である。
- ・ 胎盤が原因となる胎生致死の表現型を示すノックアウトマウスにおいて性別が重要な役割を果たす場合がある。
- ・ BAALC 欠失は胎生期造血において細胞周期を回転させ増殖能を亢進させる。
- ・ BAALC は wild マウスの骨髄において未分化な KSL 分画で高発現している。
- ・ BAALC 過剰発現は p53 経路の活性化を介して骨髄細胞の増殖を抑制する。

前半の2つについては、胎生期の胎盤の組織形成における性別と BAALC の影響を各々明らかにしたことで、発生学や不妊、流産などの産科領域での今後の発展に寄与するものと考えられる。後半の3つからは、BAALC は白血病幹細胞をはじめとする未分化な細胞分画において、細胞周期の回転抑制による静止期の維持に関与し、それが抗がん剤抵抗性となり、予後不良につながるという仮説が想定される。BAALC の過剰発現が p53 経路を活性化することも、BAALC 高発現の AML が予後不良であるという臨床データと一見矛盾する結果であるが、この仮説に従えば、p53 は KSL 細胞において発現が高く、p53 を欠失させると静止期の細胞が減少することが報告されていることから説明可能である。今回、造血幹細胞分画で高発現している BAALC が細胞周期を負に制御し静止期の

維持に關与していることを明らかにしたことにより、静止期にある一部の未分化な白血病幹細胞により白血病が構築されるという、現在提唱されているモデルにおいて、BAALC がその中心的役割を担っている可能性があることを示唆する重要な結果と考えられる。(3944 字)