



Title	GPI-anchor deficient mice : Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Author(s)	川越, 一慶
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39848">https://hdl.handle.net/11094/39848</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	川越一慶
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12383号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	GPI-anchor deficient mice : Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (GPIアンカー欠損マウス:発作性夜間血色素尿症における異常血球細胞の優位性獲得機構について)
論文審査委員	(主査) 教授 木下タロウ  (副査) 教授 木谷 照夫 教授 越智 隆弘

## 論文内容の要旨

## [目的]

発作性夜間血色素尿症(PNH)は、後天性の溶血性疾患である。PNHの異常は最初に血液幹細胞に生じ、その結果、血液系の細胞膜表面のGPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカー型蛋白が全て欠損する。この異常幹細胞が正常幹細胞に比べて優位に、クローン性に増殖するため、その異常幹細胞由来の異常細胞が末梢の各種血球で優位に存在する。GPIアンカーの欠損は、その生合成過程の最初の段階に働くPIG-A遺伝子の異常に起因する。多くのPNH患者の解析により、異常細胞ではX染色体に位置するPIG-Aに体細胞突然変異が生じている事がわかった。すなわち、PIG-AはPNH患者におけるGPIアンカー欠損の原因遺伝子である。しかし、PNHの発症に重要なもうひとつの現象である異常血液細胞の優位な増殖が、PIG-A遺伝子の突然変異だけで生じるかどうかは、今のところ不明である。それを調べるために我々は、Pig-a遺伝子を破壊したマウスの作製を企てた。まず、ヒトPIG-AをプローブとしてマウスcDNAライブラリーよりマウスPig-a cDNAを、さらに、それをプローブとしてPig-aのゲノムクローンを得た。これらを解析した結果、マウスPig-aは、X染色体上の位置も含めて遺伝学的にも機能的にもヒトPIG-Aと相同であることがわかったので、マウスPig-aを破壊したキメラマウスを作製した。

## [方法ならびに成績]

## 1. Pig-a欠損キメラマウスの作製

マウスPig-aゲノムのうちexon 2内の開始コドンを含む領域をネオマイシン耐性遺伝子にて置き換えたターゲティングベクターを作製した。このターゲティングベクターをマウスES(embryonic stem)細胞に電気的に導入し、Pig-aと相同組み換えを生じたES細胞を2種類クローニングした。ES細胞は雄由来なので、X染色体上に位置するPig-aは一度の相同組み換えでその機能を失うことが予想された。事実、ES細胞の膜表面に発現しているGPIアンカー型蛋白であるHSA(heat stable antigen)は、FACSによる解析にて消失していることがわかった。それでこのES細胞を用いてキメラマウスの作製を試みた。2種類のES細胞を用い、2通りの方法(aggregation法、injection法)にて作製したにもかかわらず、キメラマウスのキメリズムは5%以下で、高いキメリズムのマウスは1匹も得られなかった。さらに、生まれたマウスの数も本来得られると予想される数よりも少なかった。そこでその理由を確かめるために、Pig-aを破壊したES細胞に再びマウスPig-a cDNAを電気的に導入し、HSAの発

現が回復したES細胞を用いてキメラマウスの作製を試みた。その結果キメリズムが50%を超える高率なキメラマウスが得られ、生まれたマウスの数も明らかに増加した。すなわち、これらの結果はPig-aを破壊したことにより、マウスに致死的な効果をもたらしたと考えられ、Pig-aあるいはGP Iアンカー型蛋白は、マウスの生体形成において必要不可欠なものであることがわかった。

## 2. Pig-a欠損キメラマウスの血液細胞の解析

次に、このキメラマウスの末梢血液細胞のGP Iアンカー型蛋白の発現の有無を調べた。赤血球と好中球は、各血球マーカーとGP Iアンカー型蛋白特異抗体で染色し、BとTリンパ球に関しては、さらにその由来がC57BL/6(卵)か129SV(ES細胞)かを区別できる抗Ly9.1抗体でも染色し、FACSにて解析した。その結果、好中球以外はES細胞由来で膜表面のGP Iアンカー型蛋白が消失している血球細胞の存在が確認された。すなわち、Pig-aを破壊したES細胞からでもGP Iアンカー型蛋白が消失している血液幹細胞が形成され、その血液幹細胞由来の血液細胞が分化誘導されることがわかった。GP Iアンカー型蛋白の消失しているTリンパ球の割合は、赤血球やBリンパ球で見られた割合よりも高い傾向が認められた。

## 3. Pig-a欠損キメラマウスにおけるGP Iアンカー欠損赤血球の経時的変化

PNH患者に見られるような異常血液細胞の優位な増殖がキメラマウスに生じるかどうかを、GP Iアンカー型蛋白消失赤血球の割合を経時的に観察することによって調べた。その結果、マウスの系統やES細胞の種類に関わらず、少なくとも生後8カ月まではGP Iアンカー型蛋白消失細胞の増殖は認められなかった。すなわち、Pig-a遺伝子を破壊しただけではGP Iアンカー型蛋白消失細胞の異常な増殖は認めず、PNH患者に見られるような異常血液細胞の優位な増殖にはPig-a遺伝子以外の要因も必要であることがわかった。しかし、6匹中1匹のマウスにおいて生後12カ月を過ぎた頃からGP Iアンカー型蛋白が消失している赤血球の増加傾向が認められた。(1-10カ月目, 4-7%; 12カ月目, 8%; 13-14カ月目, 12%; 15カ月目, 18%)。

### [総括]

PNH患者における異常血液細胞の優位な増殖が、PIG-A遺伝子の異常だけで生じるかどうかを、Pig-aを破壊したキメラマウスの末梢血を解析することにより確かめた。Pig-aあるいはGP Iアンカー型蛋白は、マウスの生体形成において必要不可欠なものであるらしく、高率なキメラマウスは得られなかったが、低率なキメラマウスの解析にて、末梢血にGP Iアンカー型蛋白が消失している血液幹細胞由来の血液細胞が出現していることが確かめられた。全てのキメラマウスで異常赤血球の割合は、少なくとも生後8カ月までは有意な増加を示さなかった。すなわち、異常血液細胞の優位な増殖はPig-a遺伝子の異常だけで生じるのではなく、他の要因も必要である事がわかった。1匹のキメラマウスにおいて生後12カ月頃、PNH患者に見られるような異常血液細胞の増加が認められた。このマウスには第2の要因が発生したとも考えられるが、詳細は不明である。

## 論文審査の結果の要旨

発作性夜間血色素尿症(PNH)は、血液幹細胞に生じた体細胞変異により血液細胞表面のGP Iアンカー型タンパク質がすべて欠損することにより発症する。赤血球を補体の作用から保護しているGP Iアンカー型補体制御因子が欠損するため、補体の活性化にともなって血管内溶血を起こす。GP Iアンカーの欠損は、この糖脂質の生合成に働くX染色体遺伝子PIG-Aの体細胞突然変異によって起こることが知られている。PNHには、PIG-A遺伝子に変異を生じた異常幹細胞クローンの拡大がともなっているが、発症に必須なこの異常クローンの拡大がPIG-A遺伝子の変異だけで起こるかは不明であった。本研究は、PIG-Aの相同遺伝子であるマウスのPig-aをノックアウトしたES細胞を用いてキメラマウスを作り、Pig-aの変異だけで異常クローンの増加をもたらされるか調べたものである。その結果、キメラマウスの異常赤血球の割合は生後7カ月の間増加傾向を示さなかった。この事は、PNH患者でみられる異常細胞のクローン性拡大には第二の要因が関わっていることを強く示唆している。この成果は、PNHの病態研究の今後の方向性を確立したもので、学位に値する。