

Title	Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor $\beta$
Author(s)	佐々木, 浩一
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40951">https://hdl.handle.net/11094/40951</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">〈a href="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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	佐々木 浩一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13349 号
学位授与年月日	平成 9 年 7 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor $\beta$ (転写活性化因子 core binding factor $\beta$ 欠損マウスでは、胎仔肝臓における造血が欠失する。)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 金倉 讓

### 論文内容の要旨

#### (目的)

t (8;21) (q22;q22) と inv (16) (p13q22) は急性骨髄性白血病 (AML) に特異的で、他の悪性疾患においては観察されない染色体異常である。t (8;21) は、AML の M2 または M4 に見られる染色体異常で、頻度は AML 全体の 20~30% に見られる。また、inv (16) は好酸球の増加を伴う M4 に見られ、M4 の 25% を占める。最近、これらの染色体異常に伴う遺伝子の異常が相次いで明らかにされた。すなわち t (8;21) では AML1 と MTG8 という遺伝子が、また inv (16) では core binding factor  $\beta$  (CBF  $\beta$ ) と平滑筋ミオシン重鎖の遺伝子が、転座に伴って融合シキメラ蛋白を形成していることが判明した。AML1 は転写因子であり、ショウジョウバエの形態形成遺伝子 runt と相同性のあるドメインを持つ。この遺伝子は、レトロウイルスのエンハンサー、プロモーターをはじめ、T 細胞受容体のエンハンサー、GM-CSF, IL-3, M-CSF 及びその受容体のプロモーターなどにも結合することがわかった。一方、CBF  $\beta$  はこの AML1 と二量体を形成するが単独では DNA 結合能を有しない。AML1 は CBF  $\beta$  と二量体を形成することによって、より強く標的の塩基配列に結合することができる。これらお互いに相互作用をする遺伝子が、AML の病因に深く関わっていることがわかり、これら一連の転写因子群が AML の病態にとって非常に重要な働きを担っていることが推定された。そこで CBF  $\beta$  をジーンターゲットングの手法を用いて破壊し、この遺伝子がマウスの正常な造血及び発生においていかなる役割を担っているかを解析した。

#### (方法)

CBF  $\beta$  のマウスホモログである Cbfb cDNA をプローブにして、マウス 129 系統のゲノムライブラリーをスクリーニングし、 $\alpha$  サブユニットとヘテロダイマー形成に必要なエクソン 5 を含むゲノム断片を得た。この制限酵素地図を作成後、エクソン 5 を PGK-neo で置換し、PGK-tk を含むターゲットングベクターを作成した。これを E14-1ES 細胞株に電気穿孔にて導入し、サザン法にてスクリーニングし、11 の相同組換えを起こしたクローンを得た。その 5 クローンを C57BL6/J のプラストシストにインジェクションし、3 クローンに germline transmission を得、PCR 法及びサザン法にてスクリーニングを行い、ヘテロ接合体、さらにホモ接合体を得た。

(結果)

ヘテロ接合体には異常は見られなかったが、ホモ接合体は胎生期 day12.5-13.5で頭蓋内出血、肝臓における造血の欠如によって死亡することが判明した。

中枢神経系への出血は、中脳実質、脳室内、脊髓腔内、脊髓後根神経節、顔面内耳神経核などに認められ、出血部位には yolk sac 由来と考えられる有核の赤血球が多数認められた。

ホモ接合体の胎仔肝臓には、造血細胞がほとんど認められなかった。また、yolk sac のコロニーアッセイをおこなっても造血細胞によるコロニー形成が認められず、極めて未分化な造血系細胞においてのみ発現されていると言われている flk-2/flt-3 の発現が yolk sac において認められなかった。このことは、ホモ接合体は造血幹細胞に近い未熟造血細胞のレベルから欠失していることを示唆している。

以上の表現形は、AML1 欠失マウスと同様であり、Cbfb が生体内において単に  $\alpha$  サブユニットの DNA 結合能を上昇させるのみならず、 $\alpha$  サブユニットの一つである AML1 の正常な働きに必須であることがわかった。同様にその他の  $\alpha$  サブユニットである AML2, AML3 も、Cbfb とヘテロダイマーを形成することが知られており、これらが機能を発揮する上でも Cbfb の存在が必須であろうことが推定される。

(総括)

Cbfb 欠失マウスでは、胎仔肝臓における造血が起こらず、また頭蓋内出血を起こして胎生12.5から13.5日で死亡する。この表現型は AML1 欠失マウスのもと同様であり、生体内において AML1 の正常な機能発現において Cbfb の存在は必須であることがわかった。

## 論文審査の結果の要旨

佐々木浩一君は inv16 を伴う急性骨髄性白血病において転座している遺伝子 core binding factor beta (CBF  $\beta$ ) の生体内での働きを明らかにするため、gene targeting の手法を用いて CBF  $\beta$  欠損マウスを作成した。このマウスを解析することによって、この遺伝子が胎仔肝臓における造血に必須であることを証明した。又 CBF  $\beta$  は転写因子 AML1 とヘテロダイマーを形成することが知られているが、CBF  $\beta$  欠損マウスの表現型は AML1 欠損マウスのそれと極めて類似しており、AML1 機能発現には CBF  $\beta$  とのヘテロダイマー形成が必須であることが推定された。AML1 遺伝子も t (8;21) を伴う白血病において転座している遺伝子であり、急性骨髄性白血病の発症において CBF  $\beta$  および AML1 が共通の経路をへて関与していることが証明された。

この研究は転座による白血病発症メカニズムを明らかにする上で非常に意味のある研究であり、佐々木君への学位の授与の値すると思われる。