



Title	Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)
Author(s)	坪井, 昭博
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42719
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	坪井昭博
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15654号
学位授与年月日	平成12年6月30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	Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (白血病発症におけるWT1の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次
	(副査) 教授 金倉 譲 教授 竹田 潤二

論文内容の要旨

【目的】

WT1遺伝子は Wilms 腫瘍の原因遺伝子として単離され、当初 WT1遺伝子を欠失している Wilms 腫瘍の細胞にそれを導入する事により細胞増殖が抑制されるという事実から癌抑制遺伝子と位置付けられた。

その後、我々のグループにより、WT1はほとんどすべての急性白血病細胞にて高発現していること、白血病細胞の発現量と白血病の予後が相関することなどが示された。また、機能的には、白血病細胞に WT1遺伝子特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを加えると腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかになり、これらより、WT1遺伝子は白血病では癌遺伝子としての性格をもつことが推測されるようになった。さらに最近これを支持するデータとして、IL-3 依存性に増殖し、G-CSF の刺激で成熟好中球まで分化するマウス未熟骨髓株 (32D) に WT1を強制発現させ、G-CSF で刺激したところ、元の32D 細胞とは逆に分化が抑制され増殖が誘導されるという現象が見い出された。今回 WT1は血球系では癌遺伝子として働き、G-CSF のシグナル経路を修飾することで増殖を促し、分化を抑制するという仮説を検証することを目的とした。正常では未熟造血細胞でのみ WT1の発現がみられ、分化すると down regulateされるのに対し、白血病では分化マーカーが出現しても WT1に持続高発現がみられる。そこで白血病細胞の normal counterpart である骨髓未熟造血細胞に WT1遺伝子を強制的に高発現させ、G-CSF を含む各種サイトカイン存在下で、増殖、分化に与える影響を colony assay 法ならびにフローサイトメトリーで調べた。

【方法】

1) WT1ベクターと producer cell の作成

full length の human WT1遺伝子をレトロウイルス発現ベクターに組み込んだ。このベクターは murine proliferative sarcoma 由来で neomycin resistant gene (NeoR) を同時に発現する。このベクターをパッケージング細胞株 GPenv+E86 にトランスフォームし、高力価 producer cell を作成した。

また WT1の入っていない empty vector をコントロールベクターとした。

2) マウス骨髓未熟造血細胞の濃縮と WT1遺伝子発現ベクターの導入

マウス C57BL/6 に 5 FU150mg/kg を iv 後 4 日目に骨髓を採取し、3 日間 IL-3, IL-6, SCF 存在下で producer cell と coculture した。

その後ベクターが導入された細胞を濃縮するため上記サイトカインに加えて G418 1mg/ml 存在下で培養を行った。

3) コロニー・アッセイならびにフローサイトメトリー

各種サイトカイン存在下でコロニー・アッセイを行った。サイトカインとして G-CSF, IL-3, IL-6, SCF, TPO, EPO, sIL-6R を単独または組み合わせて使用した。50個以上の細胞を有するものをコロニーとした。ベクターの組み込みと WT1の発現を確認するためコロニーを拾い、RT-PCR 法により WT1遺伝子と NeoR 遺伝子の発現を確認した。また形成されたコロニーの分化度の差を評価するため、Gra-1 (顆粒球系の分化マーカー) と Mac-1 (単球系のマーカー) でフローサイトメトリーを行った。

【成績】

1) WT1強制発現群はコントロール群と比較して G-CSF に反応して骨髄球系コロニー数が増加した。

G-CSF 存在下でコロニー・アッセイした時、WT1を強制発現させた群がコントロール群と比較してコロニー数 (CFU-G, CFU-M) が多く認められた。G-CSF の濃度を変えて調べたところ、コロニー数の差は G-CSF の濃度が低い方が顕著であった。しかし WT1強制発現下でも G-CSF 依存性に永続的に *in vitro* で増殖する細胞株は得られなかった。他のサイトカインでは差を認めなかった。また、サイトカインが存在しない状態では両群ともコロニーを形成しなかった。

2) WT1の強制発現により骨髄球系の分化が抑制された。

G-CSF 存在下で形成されたコロニーをまとめて FACS した。Gra-1と Mac-1の発現が WT1強制発現群で有意に抑制されていた。これにより WT1の持続発現が骨髄球系の細胞の分化を抑制することが示唆された。

3) WT1発現ベクターを導入して形成したコロニーでの WT1遺伝子の発現

G-CSF 存在下で形成したコロニーを個々に拾い WT1遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法で調べた。pick up したすべてのコロニーで human WT1の発現が見られた。これは WT1の持続発現が確認されただけでなく、G418 による濃縮が効果的で、得られた結果は WT1の発現の有無によるものと考えられた。

【総括】

1) 未熟造血細胞 (特殊な細胞株でなく、骨髄未熟造血細胞を濃縮したもの) において WT1は oncogenic に働き得る事が明らかになった。 2) G-CSF は通常増殖シグナルと分化シグナルの両方を伝えるが、WT1が存在すると分化シグナルが抑制される事が示唆された。 3) 白血病発症のためには WT1単独では不十分で、さらなる因子の存在を必要とする事が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子として位置付けられている WT1遺伝子が白血病において高発現していることが報告されているが、白血病における意義については十分に明らかにされていなかった。そこで本研究は白血病の normal counterpart である骨髄造血幼若細胞に WT1を持続発現させ、造血幼若細胞に対する分化や増殖に与える影響を検討したものである。まずマウス造血幼弱細胞にベクターを高率に導入し、その後約80%までベクター導入細胞を濃縮できる系を作成した。これにより WT1持続発現群とコントロール群の比較が可能となった。この系を用い各種サイトカイン (G-CSF, IL-3, IL-6, SCF, TPO, EPO, FLT-3を単独または組み合わせて) 存在下で colony assay を行った。サイトカイン非存在下では両群ともコロニーを形成しなかった。IL-3, IL-6, SCF, TPO, EPO, FLT-3 存在下ではコロニーを形成するも両群に差を認めなかつたが、G-CSF 存在時に WT1持続発現群はコントロール群と比較し有意にコロニーの増殖が促進され、分化が抑制されていた。この結果は WT1遺伝子は白血病においてはむしろ癌遺伝子として働くことを示唆するとともに、G-CSF シグナルの増殖シグナルを促進させ、分化シグナルを抑制するという新たな機能が示唆された。以上より、本研究は白血病の発症機序の解明に寄与することが期待され、学位の授与に値するものと評価する。