



Title	Very low frequencies of human normal CD34+ hematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumor gene WT1 at levels similar to those in leukemia cells
Author(s)	保仙, 直毅
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43694
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	保 仙 直 毅
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 8 5 7 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Very low frequencies of human normal CD34 ⁺ hematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumor gene WT1 at levels similar to those in leukemia cells (ヒト正常 CD34陽性造血前駆細胞中に WT1遺伝子を白血病細胞と同じレベルで発現する細胞が極めて低頻度に存在する)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 吉崎 和幸 教授 金倉 譲

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) はほとんど全ての白血病で高発現しており、白血病の発症において重要な役割を持つと考えられている。一方、WT1は正常ヒト骨髓 CD34陽性造血前駆細胞において、白血病細胞の100分の1のレベルで発現していることも明らかになっている。しかし、正常造血前駆細胞の中に WT1を白血病と同じように高発現する細胞がわずかにあって、それらの細胞において WT1が down-regulate されないことが白血病の発症に関与しているのか、それとも、正常造血前駆細胞の多くが WT1を低レベルで発現していて、その中で、WT1を異常高発現する細胞が出現し、白血病になっていくのかということについては、明らかではない。そこで、WT1を発現する正常 CD34陽性造血前駆細胞を同定し、その特性を解析することを目的として実験を行った。

【方法ならびに成績】

健常人より得た CD34陽性骨髓細胞を fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いて、1細胞ずつ lysis buffer 中に sorting し、各々の細胞における、WT1 mRNA の発現を 2種類の single-cell RT-PCR 法を用いて解析した。1つは PolyA-PCR+ SS-PCR 法で、半定量性を持ち、また1つの細胞に関し多数の遺伝子の発現の解析が可能である。具体的には、1細胞中の全 mRNA から dT primer を用いて cDNA を合成した後、terminal transferase を用いて cDNA の 5' 端に polyA を付加し、それを dT-X primer (dT primer の 5' 側に random sequence をつなげた primer) を用いて PCR にて増幅することにより、1細胞由来の cDNA library を得るという方法である。もう1つは nested sequence-specific RT-PCR 法で、逆転写反応および PCR 反応を標的とする遺伝子に specific な primer を用いて行う方法である。この方法は1細胞に関して解析可能な遺伝子の数は限られるが、前者に比べ感度が高かった。

single-cell polyA-PCR+ SS-PCR 法による解析では、WT1の発現は4/319 (1.3%) の正常 CD34陽性骨髓細胞に見られた。この結果を確認するため、定量性は低い、より感度の高い nested sequence-specific RT-PCR 法を用いてさらに解析を行ったところ、15/1,315 (1.3%) の正常 CD34陽性骨髓細胞に WT1の発現が見られた。合計すると、19/1,634 (1.2%) の CD34陽性骨髓細胞に WT1の発現が認められた。CD34⁺CD38⁻細胞と CD34⁺CD38⁺細胞の間で WT1陽性細胞の頻度に差は見られなかった。さらに、半定量性を持つ PolyA-PCR+ SS-PCR を用いた検討により、

WT1発現正常 CD34陽性骨髄細胞 1 細胞の WT1 mRNA 発現レベルは WT1を高発現する白血病細胞株 K562と同じレベルであることが明らかになった。

次に、WT1発現 CD34陽性細胞における分化特異的遺伝子 (myeloperoxidase、granulocyte-colony stimulating factor receptor、 β -globin、GATA-1、SCL) および、細胞周期特異的遺伝子 (proliferating nuclear cell antigen、thymidine kinase、thymidylate synthetase、DNA polymerase α 、E2F-1、Cyclin E1、Cyclin B1、Aurora 1、polo-like kinase、cdc25B) の発現を解析したところ、WT1は未分化で dormant な細胞にも、分化し増殖している細胞にも発現していることが明らかになった。

WT1は exon5全体と exon9の一部 (KTS と呼ぶ) の二つの alternative splicing site の有無により、4つの主な spliced form が形成される。そこで、WT1発現 CD34陽性細胞において dominant に発現される spliced form を解析したところ、CD34⁺CD38⁻細胞では様々な spliced form の発現が見られたのに対して、CD34⁺CD38⁺細胞では10細胞中8細胞が17AA+KTS+の spliced form を dominant に発現していた。

【総括】

この研究により、ヒト正常 CD34陽性造血前駆細胞中に WT1遺伝子を白血病細胞と同じレベルで発現する細胞が約1.2%存在する事が明らかになった。この WT1発現正常造血前駆細胞は白血病細胞の normal counterpart と考えられ WT1の downregulation が block されることが白血病発症の引き金になっている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

1. 正常骨髄が低レベルの WT1を発現しているが、その原因となる細胞を初めて同定したこと。
2. 正常骨髄細胞において、WT1発現細胞の頻度とその single-cell レベルでの発現レベルを初めて明らかにしたこと。
3. WT1発現正常造血前駆細胞の特徴 (dormant or proliferating; uncommitted or committed) を明らかにしたこと。
4. WT1を高発現する白血病細胞の normal counterpart を見出し、白血病における WT1の高発現は結果ではなく、原因 (それが downregulate されないことにより白血病を発症する) である可能性を示唆したこと。
5. 4の theory によれば、ほとんど全ての白血病が WT1を高発現していることを説明できること

以上は画期的な成果である。よって、本研究を学位に値するものと認める。