



Title	The Wilms' tumor gene (WT1) has oncogenic function in leukemogenesis : WT1 overexpression promotes the self-renewal and proliferation of the AML1-ET0-expressing myeloid progenitors and inhibits their differentiation
Author(s)	西田, 純幸
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45460
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 こちら 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 ^{にし}西 ^だ田 ^{すみ}純 ^{ゆき}幸

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19293 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 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 The Wilms' tumor gene (*WT1*) has oncogenic function in leukemogenesis : *WT1* overexpression promotes the self-renewal and proliferation of the *AML1-ETO*-expressing myeloid progenitors and inhibits their differentiation
(WT1 は白血病発症において癌遺伝子的な働きを持つ : WT1 の過剰発現は AML1-ETO 発現顆粒球系前駆細胞の自己複製・増殖を促進し、その分化を抑制する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 川瀬 一郎

(副査)

教 授 金倉 譲 教 授 仲野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

【 目 的 】

ウィルムス腫瘍遺伝子 (Wilms' tumor gene : WT1) は、小児腫瘍である Wilms 腫瘍に関連した癌抑制遺伝子として同定された。WT1 は zinc-finger transcription factor の 1 つで様々な growth factor やその receptor の調節をなし、腎臓を初め様々な組織の発生、細胞増殖・分化、アポトーシスに重要な働きをなしている。一方、ほとんどすべての白血病細胞が野生型 WT1 遺伝子を高発現し、その予後と WT1 発現レベルが逆相関し、白血病再発時にはその発現レベルがより高く認められ、白血病細胞の増殖が WT1 アンチセンスオリゴマーによって抑制されることを我々はこれまでに報告した。以上の結果は、WT1 が白血病発症において癌抑制遺伝子というよりも癌遺伝子的に作用している事を示唆するが、白血病発症における WT1 の詳細な役割については、現在も尚明確になっていない。

(8;21)転座は急性骨髄性白血病 (特に FAB 分類 M2) で最もよく認められる染色体異常の 1 つで、AML1-ETO キメラ遺伝子を生じる。AML1-ETO は造血前駆細胞 (特に顆粒球系前駆細胞) の自己複製を促進し、その分化を抑制する働きがあることが報告されている。一方、様々なモデルマウスの実験結果より、AML1-ETO 単独では白血病発症に至らず、その白血病発症には更なる遺伝子異常が必要であると考えられている。

今回、WT1 を造血前駆細胞に高発現するトランスジェニックマウスを作成し、この骨髓細胞に AML1-ETO を発現させ、AML1-ETO に関連した白血病発症に WT1 がどのような働きを持つかについて解析を行った。

【 方法ならびに成績 】

マウス tec プロモーター下に野生型マウス WT1 (17AA+/KTS+) 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (WT1-Tg) を作成した。このマウスでは、造血細胞、特に造血前駆細胞が WT1 を過剰発現した。WT1-Tg 並びに野生型マウス由来の骨髓細胞へ GFP を共発現するレトロウイルスを用いて AML1-ETO を導入した。同様にして、コントロールベクターをそれぞれのマウス由来の骨髓細胞に導入した。GFP 陽性細胞 (遺伝子が導入された細胞) を

FACS cell sorter を用いて sorting し、以下の実験に用いた。

1) 造血前駆細胞の自己複製・増殖能の解析

FACS-sorting した骨髓細胞を SCF、IL-3、IL-6、EPO を添加したメチルセルロース培地で培養し、培養第 8 日目のコロニー形成を解析した。コントロールベクターを導入した WT1-Tg 由来の骨髓細胞（以下、WT1Tg-BM/empty cell）と AML1-ETO を導入した野生型マウス由来の骨髓細胞（以下、wild-BM/AML1-ETO cell）はそれぞれ、コントロールベクターを導入した野生型マウス由来の骨髓細胞（以下、wild-BM/empty cell）に比べ、第 1 世代コロニー数は、有意に増加した。一方、AML1-ETO を導入した WT1-Tg 由来の骨髓細胞（以下、WT1Tg-BM/AML1-ETO cell）は WT1Tg-BM/empty cell、wild-BM/AML1-ETO cell に比べ、約 2 倍のコロニー形成を認めた。次に、形成されたコロニーを 8 日ごとに経代培養していったところ、コントロールベクターを導入された群では第 5 世代までにそのコロニー形成能は消失したが、AML1-ETO を導入された群ではサイトカイン依存性に顆粒球系コロニーを形成し続けた。その中で、主に骨髓芽球が凝集した blastic colony が出現してきた。形態的に WT1Tg-BM/AML1-ETO cell 由来の blastic colony は wild-BM/AML1-ETO cell 由来のものに比べ明らかに大きかった。そこで、単一の blastic colony を回収し同様に培養して造血前駆細胞の自己複製・増殖能を調べたところ、WT1Tg-BM/AML1-ETO cell 由来の blastic colony は wild-BM/AML1-ETO cell 由来のものに比べ、約 5 倍のコロニー形成能を認めた。以上より、AML1-ETO による造血前駆細胞の自己複製・増殖促進作用は WT1 の過剰発現によってさらに増強されることが明らかとなった。

2) 造血前駆細胞の顆粒球系分化の解析

次に、上記の長期経代培養した wild-BM/AML1-ETO と WT1Tg-BM/AML1-ETO cell を lineage-negative selection し、各群の Lin⁻ cell を G-CSF と IL-3 を添加した液体培地で培養し、その分化・増殖能を解析した。培養第 3 日目に、wild-BM/AML1-ETO Lin⁻ cell は、骨髓球・後骨髓球へ分化（但し、成熟好中球への分化は認めず）し、増殖しなかった。一方、WT1Tg-BM/AML1-ETO Lin⁻ cell では、骨髓球・後骨髓球への分化をほとんど認めず、骨髓芽球の増殖を認めた。以上より、AML1-ETO による造血前駆細胞の顆粒球系分化抑制作用は、WT1 の過剰発現によって増強され、より未熟な段階でその分化が抑制され、G-CSF 刺激で増殖することが明らかとなった。

【 総 括 】

本研究では、AML1-ETO に関連した白血病発症において、WT1 遺伝子がどのような働きを有し白血病発症に関わっているかについて *in vitro* で解析を行った。造血前駆細胞は AML1-ETO により成熟好中球への分化が抑制され、自己複製・増殖が促進した異型造血前駆細胞へと変化する。造血前駆細胞に対する AML1-ETO のこれらの作用は、WT1 の過剰発現により増強された。その結果、AML1-ETO を発現した異型造血前駆細胞は、顆粒球分化がより未熟な段階で抑制され、自己複製・増殖能がより増強された。AML1-ETO に関連した白血病発症において WT1 は癌遺伝子としての機能（発癌を促進）を果たすことが示された。

論文審査の結果の要旨

ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) は、ほとんどすべての白血病細胞で高発現しているが、白血病発症における役割は明らかではない。一方、AML1-ETO は、急性骨髓性白血病でよく認められるキメラ遺伝子であるが、AML1-ETO 単独の異常では白血病発症に至らず、その白血病発症には付加的な遺伝子異常が必要と考えられている。本研究では、AML1-ETO 関連の白血病発症において WT1 の過剰発現の影響について検討した。WT1 と AML1-ETO を共発現した造血前駆細胞は、AML1-ETO を単独発現した造血前駆細胞に比較して、1) 自己複製・増殖能が著明に亢進し、2) G-CSF による顆粒球系分化がより未熟な段階で抑制されることを明らかにした。以上の結果より、WT1 の持続的過剰発現が、AML1-ETO の癌化作用（造血前駆細胞の自己複製・増殖亢進並びに分化抑制）を相乗的に高め、AML1-ETO 発現造血前駆細胞が白血病細胞になる過程で重要であること、そして、WT1 が白血病発症において癌遺伝子の作用を有することが考えられた。

本研究の結果は、白血病発症の機序解明に貢献するものであり、学位授与に値すると考える。