

Title	The Wilms' tumor gene, WT1 determines the growth functions of hematopoietic lineage-committed progenitor cells in normal hematopoiesis
Author(s)	白方, 俊章
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46195">https://hdl.handle.net/11094/46195</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>〉</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	白 芳 俊 章
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20101 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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, <i>WT1</i> determines the growth functions of hematopoietic lineage-committed progenitor cells in normal hematopoiesis (WT1 は正常造血において lineage-committed progenitor cells の増殖能に関与している)
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 腫瘍に関連する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、腎臓等の様々な組織の発生、細胞増殖や分化、アポトーシスに重要な働きを持つ。*WT1* は造血器悪性疾患や様々な固形癌に高発現し、*WT1* 発現癌細胞の増殖は *WT1* アンチセンスにより阻害されることから、当初癌抑制遺伝子とされていた *WT1* 遺伝子は癌遺伝子としての働きも持つと考えられる。

未成熟な造血細胞での *WT1* の機能の解析により、未成熟な造血細胞の成長や分化の制御、更には未成熟な造血細胞の白血病幹細胞への形式転換の解析などが進むと考えられる。正常造血では *WT1* 遺伝子は CD34 陽性造血前駆細胞のごく一部に発現しそれらが分化し成熟血球となるにつれ down-regulate される。以前我々は G-CSF 刺激下での *WT1* 過剰発現により造血前駆細胞の増幅が促進される一方、成熟顆粒球への分化が阻害されることを報告した。マウス胎仔肝細胞を使用した実験で、骨髄破壊的放射線照射後に *WT1* 欠損細胞を移植されたマウスは正常造血を回復し得るが、*in vitro* の実験では *WT1* 欠損細胞の野生型細胞と比較してコロニー形成能の低下が示されている。今回、我々は *WT1*-GFP KI mice を作製し *WT1* 発現細胞の分画を調べるとともに *in vivo* 及び *in vitro* でのコロニーアッセイを行い正常造血での *WT1* 遺伝子の役割解析を試みた。

##### 【方法と結果】

*WT1* 遺伝子 exon1 に GFP 遺伝子を挿入し *WT1*-GFP knock-in mice を作製、交配にて *WT1* 遺伝子両側破壊 (*WT1*<sup>G/G</sup>)、*WT1* 遺伝子片側破壊 (*WT1*<sup>G/+</sup>)、野生型 (*WT1*<sup>+/+</sup>) のマウス胎仔肝 (FL) を得て実験に供した。western-blot で *WT1*<sup>G/G</sup> FL では *WT1* 蛋白の発現は認められず *WT1*<sup>G/+</sup> FL では *WT1*<sup>G/G</sup> と *WT1*<sup>+/+</sup> の中間的発現であった。

##### 1) *WT1* 発現細胞の FACS 解析

GFP<sup>+</sup>細胞はc-kit<sup>+</sup>分画では多かったがCD34<sup>+</sup>分画では少なく、Sca-1<sup>+</sup>分画では殆ど認められなかった。GFP<sup>+</sup>細胞は未分化幹細胞レベルよりは分化傾向の前駆細胞レベルに多いと考えられた。

## 2) 造血前駆細胞の *in vitro* での解析

正常造血における WT1 発現の効果を調べるために、WT1<sup>G/G</sup> と WT1<sup>+/+</sup> の FL cell を用いて *in vitro* colony assay を行い比較した。WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では CFU-GM の数が有意に減少していたが、BFU-E と CFU-GEMM の数は減少傾向にあるものの有意な差では無かった。赤血球系造血前駆細胞やより未熟な多系統への分化能を有する造血前駆細胞においてではなく骨髄球系造血前駆細胞においてその増殖に重要な役割を持つことが示唆された。

## 3) 造血前駆細胞の *in vivo* での解析

*in vitro* で WT1 は造血前駆細胞の増殖に重要な役割を持つことが示唆されたが、*in vivo* での正常造血での WT1 発現の効果も調べた。WT1<sup>G/G</sup> と WT1<sup>+/+</sup> の FL cell を骨髄破壊的放射線照射後のマウスに移植し移植後 8 日目 (CFU-S8) 及び 12 日目 (CFU-S12) にレシピエントマウスの脾臓に形成されたコロニー数を計測比較した。CFU-S8 は WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では有意に減少していたが、CFU-S12 では WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では減少傾向はあるが有意な差では無かった。以上より WT1 が *in vivo* で lineage-committed hematopoietic progenitor cells の増殖能力 (CFU-S8 がこれを反映) に重要な役割を持っていることが示唆された。

## 【総括】

WT1 の役割を解明するために WT1-GFP KI mice を作製しその FL cell を使用して実験を進めた。*in vitro* での colony assay では WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では CFU-GM の数が有意に減少していたが、BFU-E と CFU-GEMM の数は減少傾向にあるが有意な差では無かった。*In vivo* での解析で、CFU-S8 は WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では有意に減少していたが CFU-S12 では WT1<sup>+/+</sup> と較べて WT1<sup>G/G</sup> FL では減少傾向はあるが有意な差では無かった。以上の結果から、WT1 が赤血球系造血前駆細胞やより未熟な多系統への分化能を有する造血前駆細胞においてではなく骨髄球系造血前駆細胞においてその増殖に重要な役割を持っていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) は様々な成長因子や受容体の調節に関与し、正常造血では CD34 陽性造血前駆細胞の一部に発現し分化成熟に伴い down-regulate される。G-CSF 刺激下の WT1 過剰発現により造血前駆細胞の増幅は促進されるが、成熟顆粒球への分化は阻害される。本研究では WT1-GFP KI mice を作製しマウス胎児肝の正常造血での WT1 遺伝子の役割を検討した。1) FACS 解析では GFP<sup>+</sup>細胞は分化傾向の強い前駆細胞レベルに多いこと、2) *in vitro* colony assay で赤血球系造血前駆細胞やより未熟な多系統分化能を持つ造血前駆細胞ではなく骨髄球系造血前駆細胞の増殖に重要であること、3) *in vivo* で lineage-committed hematopoietic progenitor cells の増殖能力 (CFU-S8 が反映) に重要であることが示唆された。以上の結果から、WT1 は赤血球系造血前駆細胞やより未熟な多系統分化能を持つ造血前駆細胞ではなく骨髄球系造血前駆細胞においてその増殖に重要な役割を持つと考えられた。

本研究の結果は、正常造血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られる。