

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790668

研究課題名（和文） WT1 遺伝子発現異常による造血幹細胞への影響と白血病発症に関する分子生物学的解析

研究課題名（英文） Overexpression of the WT1 gene effects on proliferation of hematopoietic stem cells, and promotes leukemogenesis.

研究代表者

西田 純幸（NISHIDA SUMIYUKI）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：00403189

研究成果の概要：WT1 遺伝子の発現により造血幹細胞・前駆細胞の増殖が促進し、更に付加的な遺伝子異常が加わることで白血病が発症するという仮説を明らかにするにあたり、今回は WT1 遺伝子による造血幹細胞・前駆細胞への影響に注目し、WT1 トランスジェニックマウスの骨髓細胞を用いて種々の解析を行った。その結果、WT1 遺伝子が持続高発現する造血幹細胞・前駆細胞では、細胞の増殖・分裂が促進されることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：WT1, 造血幹細胞、白血病

1. 研究開始当初の背景

我々が注目し、今回の研究の対象とした遺伝子である Wilms tumor 遺伝子 (WT1) は、急性骨髄性白血病 (AML) をはじめ、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、そして前白血病段階にある白血病関連疾患の骨髓異型性症候群 (MDS) など多くの造血器腫瘍の腫瘍細胞で持続的に高発現しているのみならず、白血病の発生、形質の維持に重要な働きをなしている、ということまでの一連の研究から明らかにしてきた。造血細胞の中でも造血前駆細胞に WT1 を持続的

過剰発現するトランスジェニックマウスを用いた解析より造血前駆細胞の増殖が促進されることが明らかとなった。更に、AML で最も多く認められるキメラ遺伝子である AML1-ETO との協調的作用により、造血前駆細胞の増殖がより促進され、G-CSF 刺激による造血前駆細胞の顆粒球系分化がより未熟なレベルで抑制され、結果、AML を急速にかつ高率に発症することが明らかとなった。以上の結果は、WT1 が白血病発症に関して重要な働きを持っていることを示唆するものである。WT1 遺伝子の発現異常が白血病発症の根

源をなす遺伝子異常の1つと考えられ、白血病発症のモデルとして我々はWT1遺伝子の発現異常を基本とし、これに更なる遺伝子異常が加わる結果として白血病が発症するのではないかと、という1つの白血病発症モデルを考えている。

2. 研究の目的

背景の通り、白血病発症モデルとして用いた造血細胞にWT1を持続的過剰発現するトランスジェニックマウス(以下、WT1-Tg)の造血幹細胞・前駆細胞を用い、これらの細胞レベルにおいてWT1発現異常がどのような影響を与えているのかを、細胞学的さらに分子生物学的に明確にする。更に付加的遺伝子異常(例AML1-ETO)との協調により白血病を発症する白血病モデルマウスの白血病細胞の分子生物学的解析、白血病幹細胞の同定を試み、これらの細胞におけるWT1発現異常の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いた造血幹細胞・前駆細胞のFACS解析

分化マーカー(lineage; Lin)に対するstreptavidin結合抗lineage抗体(Gr-1, Mac-1, Ter-119, CD3, CD4, CD8, B220), FITC標識抗CD34抗体、PE標識抗CD150抗体、APC標識抗c-kit抗体、Cy7PE標識抗Sca-1抗体をWT1-Tgマウスおよび野生型マウスの骨髄細胞に反応させ、フローサイトメトリー(FACS)により造血幹細胞・前駆細胞の割合を解析した。ここでは、c-kit⁺, Sca-1⁺, lineage-negative(Lin⁻)の細胞集団(KSL), KSL細胞を更にCD150で標識し、その発現の有無によってKSL,CD150⁺を造血幹細胞(HSC), KSL,CD150⁻を多能性造血前駆細胞(MPP)とした。

(2) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いたcobble stone area forming cell (CAFC) assay

CAFC assayは、骨髄細胞と骨髄間質細胞を長期共培養し、造血前駆細胞・幹細胞の中・長期的な増殖を評価できる。WT1-Tgの骨髄細胞を用いてCAFC assayを行いWT1遺伝子の造血幹細胞・前駆細胞の増殖に与える影響をin vitroで評価した。

(3) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いたin vivo CFSE proliferation assay

CFSEでラベリングされた細胞は1回の細胞分裂毎にCFSEの蛍光強度は減少する。この特性を用い、WT1-Tg由来の骨髄細胞をCFSEでラベリングし、放射線照射により造血を破壊した同系マウスに骨髄移植を行い、移植後早期における細胞分裂の頻度を解析した。

(4) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いたSide populationの解析

Side Populationとは、DNA色素であるHoechst 33342で細胞を染色しUVレーザーにて励起される傾向を二次元展開することにより得られる細胞の集団であり、ここの造血幹細胞・前駆細胞が多く存在することが言われている。WT1-Tgマウス・野生型マウスの骨髄細胞を分化マーカーを用いてLineage-negative selectionを行い、より未熟な細胞集団に濃縮した状態でSide Population解析を行った。さらにWT1-Tgマウス・野生型マウスそれぞれに5-フルオロウラシル(5-FU)を静脈投与し、DNA合成が活発な造血前駆細胞は死滅させ、造血幹細胞を濃縮した骨髄細胞を用い同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いた造血幹細胞・前駆細胞のFACS解析

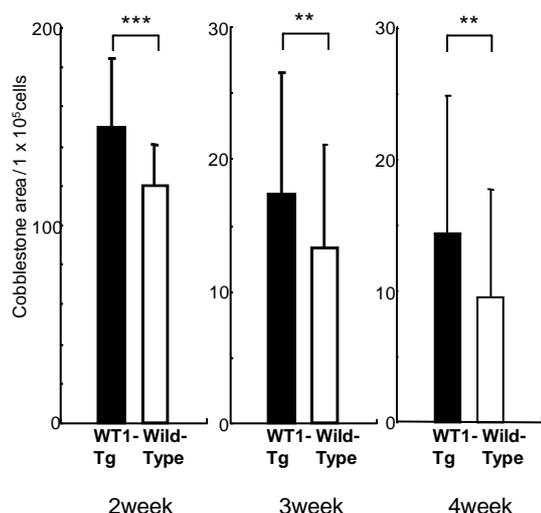
WT1-Tgマウスと野生型マウスの全骨髄細胞中に含まれるKSL細胞の割合を評価したところ、両者に有意な差は認めなかった。更に、HSCとMPPの割合を評価したが、両者に有意な差は認めなかった。

(2) WT1-Tgマウスの骨髄細胞を用いたcobble stone area forming cell (CAFC) assay

WT1-Tg由来の骨髄細胞では、野生型マウス由来の骨髄細胞に比してCAFCは統計的有意差をもって増加した。この結果は、WT1遺伝子高発現が、造血幹細胞・前駆細胞の増殖を促進する作用があることを示唆する。

(Figure 1 参照)

【Figure 1】

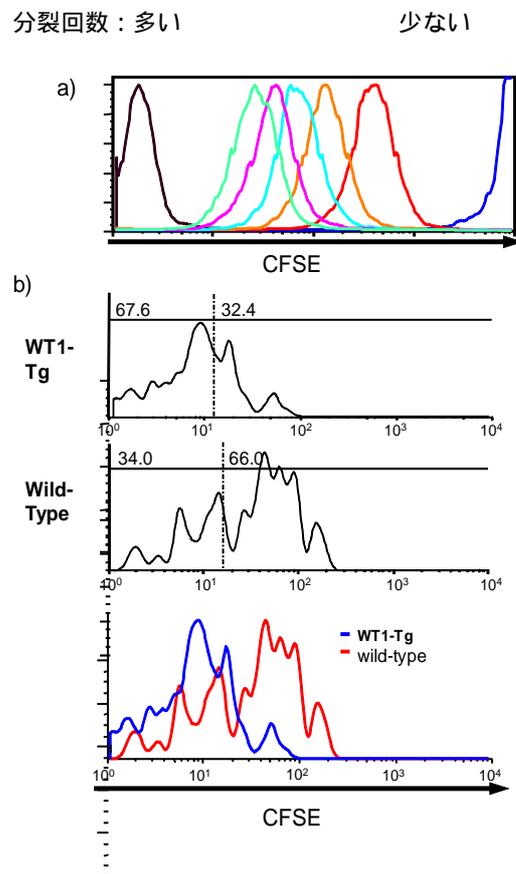


(3) WT1-Tg マウスの骨髄細胞を用いた in vivo CFSE proliferation assay

WT1 遺伝子の造血幹細胞・前駆細胞の細胞分裂に与える影響を in vivo CFSE proliferation assay で評価した。WT1-Tg 由来の骨髄細胞で造血幹細胞・前駆細胞を多く含むより未熟な細胞集団において、CFSE 蛍光強度の低い集団、つまり、細胞分裂が多く認められた細胞集団が、野生型マウスに比して統計的有意差を持って増加した。この結果は、WT1 遺伝子の持続高発現により、造血幹細胞・前駆細胞の細胞分裂が促進されたことを示唆するものである。

(Figure 2 参照)

【Figure 2】



以上の結果より、WT1-Tg の造血細胞（骨髄細胞）中にある造血幹細胞または造血前駆細胞の数的な変化はFACS解析上認めなかったが、CAFC assay と in vivo CFSE proliferation assay の結果では、WT1-Tg 由

来の骨髄細胞では造血幹細胞・前駆細胞の増殖が野生型に比して明らかに細胞増殖亢進を認めた。このことは、WT1 遺伝子の持続過剰発現が、造血幹細胞・前駆細胞の質的な変化を与え、造血増殖シグナルが加わる環境下において、これらの細胞分裂が亢進し、細胞増殖が促進された。つまり、WT1 は造血幹細胞・前駆細胞の増殖を促進することが明らかとなった。更にこの結果は、白血病前段階から白血病発症に至る過程に WT1 遺伝子発現異常が深く関わっていることを強く示唆するものである。

今後、分子生物学的解析を加えることによりこの現象をより明確にすると共に WT1 遺伝子発現異常関連の白血病発症のメカニズムを明確にする。

(4) WT1-Tg マウスの骨髄細胞を用いた Side population の解析

5-FU 未処理の WT1-Tg マウスと野生型マウスの骨髄細胞を用いて行った Side population の解析では、Side Population 全体の割合において統計上有意な差を認めるに至らなかったが、Side population のなかでも最も先端に位置する細胞集団（SP-Tip；より未熟な細胞集団を含むと考えられている）は、野生型マウスに比べ、WT1-Tg マウスにおいてより多い傾向が認められた。

5-FU 処理を加えた WT1-Tg マウス/野生型マウスの骨髄細胞を用いて行った Side population 解析では、Side Population 全体の割合において統計上有意な差を認めるに至らなかったが、SP-Tip は、野生型マウスに比べ、WT1-Tg マウスにおいてより少ない傾向が認められた。5-FU 処理によって WT1 の過剰発現により細胞分裂が盛んとなった造血前駆細胞が減少したため、先の結果と逆の傾向を認めたと考えられた。

以上の結果は、造血細胞における WT1 遺伝子の発現異常により未熟で細胞分裂が盛んな細胞造血前駆細胞の割合が多くなること、つまり、WT1 遺伝子の持続過剰発現は未熟な造血前駆細胞の細胞分裂を促進することが示唆された。これらの結果は先の in vitro assay の結果を支持するものである。

尚、付加的遺伝子異常（例 AML1-ETO）との協調により白血病を発症する白血病モデルマウスを用いたの白血病細胞の同定、分子生物学的解析を目的の1つとしていたが、今回の一連の研究の中においては未だ十分な結果を得るに至っていない。引き続き今後の課題として継続する予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 純幸 (NISHIDA SUMIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00403189

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: