

氏 名	こう さき ひで つく 神 崎 秀 嗣
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2130 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO (MTG8) but not by highly expressed Bcl-2 (32Dcl3 細胞の顆粒球への分化は AML1/ETO(MTG8)により阻止されるが高レベルで発現している Bcl-2 によっては阻止されない。)
	(主査)
論文調査委員	教 授 内 山 卓 教 授 淀 井 淳 司 教 授 伊 藤 嘉 明

論 文 内 容 の 要 旨

AML 1 遺伝子はヒトの白血病に於いて最も高頻度で染色体転座のターゲットになっている。そしてAML 1 は染色体転座によりキメラ遺伝子を形成することにより白血病原性に関与すると考えられている。最近白血病細胞でAML 1 に点突然変異を持ち、この結果、機能を失った例が見つかり、AML 1 のloss-of-function変異が白血病発症に関与する可能性が示唆された。t(8;21) 急性骨髄性白血病に伴いキメラ遺伝子AML 1 /ETOが形成される。このキメラ遺伝子の機能を調べると、正常のAML 1 のターゲットとなる遺伝子の発現を強く抑制するという報告が圧倒的に多い。キメラ遺伝子によるターゲット遺伝子の発現抑制は、AML 1 遺伝子のloss-of-functionと似た効果を及ぼすものと考えられ、この観点からAML 1 のloss-of-function変異が白血病原性を持つのはキメラ遺伝子が白血病原性を持つとする概念と必ずしも矛盾しない様に考えられる。しかしAML 1 /ETOはBcl- 2 のプロモーターを活性化しその発現を促進し、これがAML 1 /ETOによる発がん機構であるとする報告がある。Bcl- 2 はアポトーシスを抑制し、この遺伝子の恒常的発現が濾胞性B細胞リンパ腫の原因であるのでこの報告はAML 1 /ETOによる白血病原性を考える上で魅力的である。しかしながらこの報告はわれわれの作業仮説と矛盾する。そこで我々は骨髓前駆細胞株32Dcl 3 を用いAML 1 /ETOがBcl-2の発現を促進する事によって白血病原性を示すかどうか検証した。

32Dcl 3 細胞はIL- 3 依存性に増殖し、IL- 3 をG-CSFで置き換えると顆粒球に分化する。32Dcl 3 細胞はIL- 3 存在下で増殖している時はBcl- 2 を発現しているが、G-CSFに置き換えると急速にその発現は低下するのが観察された。この結果はBcl- 2 の発現が低下する事が細胞分化の必要条件になるのか、それとも分化の結果Bcl- 2 の発現低下が起こるのか2つの可能性を示す。これを検証するためBcl- 2 を発現するプラスミドを32Dcl 3 細胞に導入し安定に発現する細胞のクローンを得て、Bcl- 2 の発現レベルの異なる3種のクローンを親株と比較した。培地から血清及びIL- 3 を除くと親株は早急に死ぬが外因性のBcl- 2 を発現した細胞は増殖因子を除いても死滅する前に親株より長く生存し、既知のBcl- 2 の効果が見られた。次いでIL- 3 をG-CSFに変えて細胞の増殖・分化を観察した。親株及びBcl- 2 を低いレベルで発現しているクローンはG-CSF添加後7日で細胞増殖は止まり形態的に分化した。しかしBcl- 2 を高いレベルで発現している細胞は12日まで増殖し続けたがその後、やはり形態的に分化した。このクローンは恒常的に活性のある強いプロモーターの支配下でBcl- 2 を発現しており、G-CSFを添加後16日経っても親株がIL- 3 存在下で発現しているよりも約8倍高いレベルでBcl- 2 を発現し続けた。これらの結果はBcl- 2 は顆粒球の分化を遅らせる事はできるが完全に阻止することはできない事を明確に示している。一方、AML 1 /ETOは32Dcl 3 細胞で比較的低いレベルで発現してもG-CSF存在下での分化を完全に阻止した。

AML 1 /ETOによる32Dcl 3 の分化の阻止という現象は白血病原性の少なくとも一部の性質を反映しているものと考えられるので今回得られたデータより、我々はAML 1 /ETOが白血病を誘発する際、Bcl- 2 発現促進を主なターゲットとする可

能性は低いと考える。

## 論文審査の結果の要旨

AML1 遺伝子は白血病に伴う転座の結果AML1/ETO等のキメラ遺伝子を形成しAML1のターゲットとなる多くのプロモーターを強く抑制する。一方最近AMLに点突然変異を持つ白血病が見つかった。これらより、AML-1のloss-of-functionが白血病発症の基礎であるとする作業仮説がたてられている。しかしAML1/ETOがBcl-2の発現を促進すると報告があるのでこれを検証した。32Dcl3細胞はIL-3依存性に増殖し、IL-3をG-CSFで置き換えると顆粒球に分化する。32Dcl3細胞はIL-3存在下で増殖している時はBcl-2を発現しているが、G-CSFに置き換えると急速にその発現を低下させた。Bcl-2を発現するプラスミドを32Dcl3細胞に導入し安定に発現する3種のクローンを親株と比較した。これらの結果Bcl-2は顆粒球の分化を遅らせる事はできるが完全に阻止することはできなかった。一方、AML1/ETOは比較的低いレベルで発現してもG-CSF存在下での分化を完全に阻止した。これによりAML1/ETOが白血病を誘発する際、Bcl-2発現促進を主なターゲットとする可能性は低いことが判明した。

以上の研究はキメラ遺伝子の機能解明に貢献し白血病発症機構の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年2月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。