

平成16年度自治医科大学医学部 研究奨励賞研究成果報告

器官形成を司る Six タンパク質の標的遺伝子同定と遺伝子制御ネットワーク

人間生物学系専攻 3 年 安藤 善一

1. 背景と目的

Six ファミリー遺伝子は、ショウジョウバエの複眼形成に必須な *sine oculis* のホモログとして同定されたホメオボックス遺伝子であり、マウスおよびヒトでは *Six1* から *Six6* の 6 種類が知られている。その中で、マウス *Six1* と *Six4* は、胚発生過程における発現パターンが酷似し、また、これらの標的遺伝子である *myogenin* のプロモーターを同様に活性化する。しかしながら、これら遺伝子の欠損マウスの表現型はまったく異なる。このことは、*Six1* タンパク質および *Six4* タンパク質が生体において相異なる機能をもつことが原因であると考えられた。

本研究では、*Six1* または *Six4* タンパク質に特異的または共通の転写制御機能を明らかにするため、標的候補遺伝子のレポーターを比較し、それら標的遺伝子の発現調節メカニズムについて解析した。

2. 方法

Six1 および *Six4* タンパク質の標的候補遺伝子は、マウス後腎間葉に由来する mK4 細胞に VP16 融合 *Six1* または VP16 融合 *Six4* タンパク質を過剰発現させ、特異的に誘導される遺伝子を cDNA マイクロアレイ (Agilent 社, 20,371 遺伝子) を用いてスクリーニングした。*Six1* および *Six4* タンパク質による標的遺伝子の調節は一過性形質転換を用いて解析し、プロモーター領域における両タンパク質の結合エレメントは、ゲルシフト法を用いて解析した。

3. 結果

Six1 タンパク質特異的に誘導される遺伝子 300 個、*Six4* タンパク質特異的に誘導される遺伝子 86 個および両タンパク質共通に誘導される遺伝子 63 個を標的候補遺伝子として同定でき

た。次に同定された標的候補遺伝子の *Six1* および *Six4* タンパク質に対する反応性を、リポーター遺伝子法を用いて確認した。*Six1* タンパク質特異的な標的候補遺伝子として同定された *growth arrest specific 1* は、*Six1* および *Six4* タンパク質の量依存的に正に制御された。一方、*chloride channel 5* は、*Six1* および *Six4* タンパク質の量依存的に負に制御された。両タンパク質に共通の標的候補遺伝子として同定された *sodium-potassium-chloride co-transporter (NKCC1)* は、主として *Six1* タンパク質により量依存的に正に制御され、標的遺伝子によって *Six1* と *Six4* タンパク質による制御のされ方が異なることが明らかとなった。

これらの標的候補遺伝子のうち、*NKCC1* プロモーター領域について詳細な解析を行ったところ、転写開始点を +1 として -13/-10, +65/+74 および +89/+92 の周辺に 3ヶ所の *Six1* タンパク質特異的な結合部位が存在し、+135/+138 の周辺に両タンパク質共通の結合部位が 1ヶ所存在することが明らかとなった。置換変異を導入したリポーター遺伝子法の結果から、両タンパク質が同定されたこれらの結合部位を介して *NKCC1* プロモーターを活性化していることがわかった。

4. 考察

生体における *Six1* および *Six4* タンパク質の機能の相違は、標的遺伝子レポーターと DNA 結合特異性の一方または両方の違いによるものであると考えられた。

マウス間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後移植片対宿主病制御に関する研究

地域医療学系専攻 3 年 翁 家国

(背景) 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の造血支持能力と免疫抑制作用が注目されている。既

に欧米では、造血幹細胞移植後の造血系回復促進およびGVHD抑制を目的として、MSCを造血幹細胞と共に移植する臨床研究が行われているものの、そのメカニズムの詳細は不明である。そこで我々は、マウスMSCモデル細胞株を用いて免疫抑制や造血支持に関わる機能分子の同定を行い、科学的基盤に立脚したMSCの臨床応用を目指している。

(方法) マウスMSCモデル細胞株であるC3H10T1/2細胞とその2つの亜株、脂肪前駆細胞の性質をもったA54細胞と筋芽細胞の性質をもったM1601細胞、更にB6マウス由来のprimary MSC (B6MSC)を用いた解析を行っている。これら4種類のMSCを用いてin vitro及びin vivoで免疫抑制能を比較検討することでMSCの持つ免疫制御能力に関わる機能分子の同定と機能解析を目指した。(結果)(1) MitogenとしてConcanavalin Aの存在下にマウス脾細胞を培養しその反応系に4種のMSCを加えた。48時間後に H^3 -thymidineを加え、取り込まれた放射活性を比較することでリンパ球の増殖抑制に及ぼすMSCの効果を比較した。MSCを加えた全ての反応系においてリンパ球の増殖は抑制された。その抑制効果は反応系に加えるMSCのdoseに依存し、A54細胞とB6MSCで強力でありM1601、10T1/2では弱い傾向が観察された。(2)リンパ球の増殖抑制効果においてMSCとリンパ球のcell to cell contactとsoluble factorのどちらが重要であるかを検討するため、(1)の反応系にA54細胞から得られた種々のconditioned mediumを加えた場合とA54を直接加えた場合とでthymidineの取込みを比較した。A54は強力にリンパ球の増殖を抑制するのに比較して、Conditioned mediumを加えた反応系ではリンパ球の増殖抑制効果は殆ど観察されなかった。(3)GVHDの発症に重要とされているリンパ球のTh1分化に及ぼすMSCの効果を検討した。マウス脾細胞からCD4陽性細胞を分離しCSFE (Carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester) でマーキングした後に、Th1誘導条件下(IL-12+anti IL-4+anti CD3/28microbeads)に72時間培養し、FACSでリンパの分裂動態を観察した。Thymidine up-takeの実験結果と同様にA54

細胞とB6MSCはリンパ球のTh1分化を抑制し、更にIFN- γ の産生も強く抑制した。(4)in vivoにおけるallo-reactive T cellの増殖におけるMSCの効果を観察した。BDF1マウス(ハプロタイプb/d)にB6マウス(ハプロタイプb)の脾細胞をCSFEでマーキングした後移植し3日後にドナーのリンパ球の分裂動態をFACSで観察した。A54、B6MSC投与群においてもリンパ球の分裂増殖抑制効果は観察されなかった。(5)マウスGVHD反応におけるMSCの効果をin vivoで観察するため組織適合性の異なる異系マウス間(BALB/C VS B6, BALB/C VS C3H)で骨髄移植を行い、脾細胞を加えることで効率良くGVHDを発症する実験系を確立した。このマウスGVHDモデルを用いて10T1/2由来細胞株のGVHD抑制効果を検討したところ、生存率に及ぼす有意な効果は今までのところ観察されていない。

(考察) 以上の結果をまとめると、MSCはin vitroの実験系においてリンパ球の増殖を抑制し、その抑制効果の発現には、MSCの産生する液性因子よりもリンパ球とMSCの直接の接触が重要であると思われた。またGVHDの発症に重要と考えられているリンパ球のTh1分化においてもリンパ球の増殖を抑制しIFN- γ の産生を抑えることより、in vivoにおけるGVHDの抑制に有効である可能性が示唆されたが、これまで使用したマウスGVHDモデルにおける治療実験では有効性の確認には至っていない。今後の更なる解析が必要である。

活性型FKHRL1によるCML治療薬イマチニブ耐性克服に向けての基礎的検討

地域医療学系専攻3年 菊池 悟

イマチニブは慢性骨髄性白血病chronic myeloid leukemia (CML)の病因となるBCR-ABLチロシンキナーゼを選択的に阻害する分子標的薬剤で、CML治療における第一選択薬である。しかし、近年不応症例や耐性化症例が認められるようになり、その耐性克服が新たな課題となっている。