



TWO FORMS OF Hox11, A T CELL LEUKEMIA ONCOGENE, ARE EXPRESSED IN FETAL SPLEEN BUT NOT IN PRIMARY LYMPHOCYTES

山本, 博之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1576

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001576>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	山本 博之	(山口県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1047号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	TWO FORMS OF Hox11, A T CELL LEUKEMIA ONCOGENE, ARE EXPRESSED IN FETAL SPLEEN BUT NOT IN PRIMARY LYMPHOCYTES (T細胞性白血病由来のHox11がん遺伝子の正常リンパ組織における発現解析)	
審査委員	主査 教授 山本 節 教授 松尾 雅文 教授 千原 和夫	

論文内容の要旨

(序文)

ヒト造血系悪性腫瘍において、多くの疾患特異的染色体転座が同定されている。これら染色体転座は遺伝子の活性化や変異をもたらし、細胞増殖や細胞の不死化を引き起こす。T細胞性白血病においても、これらの染色体切断部位よりいくつかの異なった癌遺伝子が単離されている。HOX11遺伝子も染色体転座 t (10 ; 14) (q24 ; q11) を有するT細胞性白血病の染色体切断部位より単離された遺伝子である。この染色体転座によりHOX11遺伝子はT細胞レセプター遺伝子と並列することにより、T細胞において正常のHOX11遺伝子産物が多量に発現することになる。その結果、T細胞は腫瘍化していくと考えられている。また、HOX11による腫瘍化は、HOX11を胸腺細胞に強発現させたトランジジェニックマウスによっても確認されている。

HOX11遺伝子はホメオボックス蛋白をコードしていることから、発生期の形態形成に重要な役割を演じていることが示唆されている。実際に、Hox11欠損マウスが無脾症になることからも、Hox11が脾臓形成に必須のものであることが明らかにされている。また、HOX11がT細胞の腫瘍化を引き起こすことから、リンパ球の増殖にも関与していることが示唆されている。しかしながら、正常リンパ球の増殖や分化におけるHOX11の機能的な役割については未だ知られていない。このHox11の役割を明らかにするために、半定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって正常マウスリンパ球におけるHox11mRNAの発現を調べた。また、T細胞の白血病化におけるHOX11の役割についても考察した。

(実験方法)

1) 動物

(C57BL/6 X DBA/2) F1マウスを使用した。マウス臍中にプラックがついた日を胎生0.5日と定義した。

2) RT-PCRとサザンプロット法

酸グアニジンチオシアン酸フェノールクロロホルム法によって、全RNAをマウスの種々の器官と胎仔とから抽出し、 $1\ \mu\text{g}$ の全RNAを逆転写してcDNAを作製した。Hox11のエクソン1とエクソン3に特異的なプライマーを用い、 $1\ \mu\text{l}$ のcDNAからPCRを行った。PCRの1サイクルは 94°C 1分、 60°C 1分、 72°C 1分とした。30サイクルのPCRによって得たHox11DNA量をサザンプロット法により測定した。このRT-PCRシステムでは胎生17.5日の胎仔脾臓から得たcDNAの1000倍希釈液中のHox11cDNAが検出できた。また、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (G3PDH) のcDNA量を対照として用いPCRを行い、このPCR産物中のDNA量をエチジウムプロマイドゲル電気泳動法によって測定した。

3) 細胞刺激実験

胸腺細胞と脾臓細胞 ($5 \times 10^6/\text{ml}$) を $5\ \text{ \% CO}_2$ 、 37°C で、 10% 牛胎仔血清を加えたRPMI1640溶液で培養した。これらの細胞をフォルボールエステル (PMA) とイオノマイシンで刺激した。

4) 骨髄細胞培養とフローサイトメトリー解析

骨髄細胞をPA6基質細胞層上で7日間培養した後、インターロイキン7 (IL-7) を継続的に加え、経時的に蛍光抗体とフローサイトメトリーにて培養中のB細胞分化を解析した。すなわち、ビオチンラベル抗マウスCD43 (S7)、FITCラベル抗マウスB220とFITCラベル抗マウス6C3 (BP-1) とを組み合わせた2カラー染色を行い解析した。

(実験結果)

1) 造血器系器官におけるHox11mRNAの発現

マウスにおける造血は胎生8.0日より卵黄嚢の血島で始まり、胎生12日から胎生16日にかけて肝臓が主たる場となる。この時期にリンパ球前駆細胞は血島や肝臓から胸腺や脾臓の原器に移動し分化する。リンパ造血器系器官におけるHox11の発現を調べるために、胎生13.5日における脾臓、胸腺、肝臓、卵黄嚢から得たRNA中のHox11mRNA量をRT-PCRで調べた。その結果、長短2つの長さのHox11が脾臓や胸腺で検出されたが、肝臓や卵黄嚢では検出されなかった。

2) 脾臓におけるHox11mRNAの発現

胎生13.5日から生後4週齢までの脾臓から得たRNA中のHox11mRNA量をRT-PCRで調べた。発現の最大は胎生13.5日にみられ、その後は発生の従って徐々に減少した。Hox11の長短2つの型がこれら脾臓で検出され、短型のHox11がこの時期には優位に発現していた。リンパ球は胎生15.5日以降に脾臓で増加するにもかかわらず、Hox11の発現が低下していくことから発生過程のリンパ球でのHox11mRNAの発現は少ないことが示唆された。そこで、前駆細胞からB細胞系列の細胞へ分化させることのできるIL-7依存骨髄細胞培養において、初期B細胞系列細胞のHox11の発現を調べた。培養中の前駆細胞は継続的なIL-7の刺激で、4日目でプロB細胞 (B220陽性、S7陽性) へ、5日目でプレB細胞 (B220陽性、BP-1陽性) へと分化した。これら培養細胞から得たRNA中のHox11の発現をRT-PCRで調べた。その結果、初期B細胞分化中の培養細胞からはHox11の発現は検出されなかった。これらの結果とHox11欠損マウスが無脾症になることからも、Hox11は脾臓器官形成には主たる役割を演じるが、リンパ球の発生分化には関与しないことが示唆された。

3) T細胞のHox11mRNAの発現

T前駆細胞は胎生13日以降から胸腺葉へ迷入し、CD4、CD8陽性T細胞が胎生16日以降の胸腺で分化する。胎生13.5日から出生までの胸腺から得たRNA中のHox11mRNA量をRT-PCRで調べた。Hox11の発現は胎生13.5日と胎生14.5日の胸腺では検出されたが、その後のT細胞が分化増殖する時

期には検出されなかった。胸腺原器は胎生10.5日の鰓弓に由来し、ここでもHox11が発現していることから、Hox11は胸腺形成には関与しているかもしれないが、胸腺細胞の発生分化には関与していないと考えられた。

4) 活性化リンパ球におけるHox11遺伝子の発現誘導能

HOX11を胸腺細胞に強発現させたトランスジェニックマウスがT細胞性白血病になることから、HOX11はT細胞増殖に何らかの役割を演じていることが示唆された。しかしながら、胸腺や脾臓で分化増殖中のT細胞ではHox11mRNAは検出されなかった。そこで、成獣マウスの胸腺細胞や脾臓細胞をPMAとイオノマイシンで刺激して細胞増殖させた時のHox11遺伝子の発現誘導能を調べた。刺激後72時間までこれら活性化した細胞から得たRNA中のHox11mRNAの発現をRT-PCRで調べた。しかし、これら活性化リンパ球でもHox11の発現は検出されなかった。

(考察)

Hox11mRNAは正常T細胞においてはRT-PCRを用いても検出されなかった。更にPMAとイオノマイシンで刺激した後のT細胞でもHox11遺伝子は誘導されなかった。これらの結果はHox11が正常胸腺細胞の分化増殖とは関わりがないことを示唆している。Hox11mRNAはT細胞系列のJurkat細胞でもRT-PCRで検出されたという報告があり、その発現は細胞周期に依存しているという。Jurkat細胞におけるHox11mRNA量を定量してみると、その発現量は胎生17.5日の脾臓での100分の1以下であった。従って、その発現は形質転換された細胞系列の細胞周期調節の異常な機構によるもので、生理的なものではないかもしれない。

脾臓が発生する期間にHox11mRNAの2つの型が発現していた。Hox11遺伝子のゲノム解析からこれら2つの型が選択的スプライシングによるものであることが明らかにされている。また、短型のHOX11mRNAのみがヒトT細胞性白血病から分離されていることから、長型は短型とは機能的に異なっていることが示唆された。遺伝子の選択的スプライシングにより2つの型のmRNAが機能的に異なった蛋白を作ることは報告されているので、これら2つの型のHox11の機能的な異なりを明らかにする必要がある。

脾臓形態形成に必須の遺伝子がなぜT細胞で発現すれば癌遺伝子となるのか。すでに、HOX11トランスジェニックマウス由来の胸腺細胞では細胞周期が加速されていることが明らかにされている。また、元来はHox11が発現していない脾臓細胞にHOX11を過剰発現させた別のトランスジェニックマウス由来の脾臓T細胞を抗CD3抗体で刺激すると増殖反応の増強を示した。これらの結果は元来発現していないHOX11がT細胞の活性化プログラムを修飾し白血病へ至らしめることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

「審査の要旨」

HOX11遺伝子は染色体転座を持つT細胞性白血病の染色体切断部位より単離された遺伝子で、また、T細胞においてHOX11を過剰発現させたトランスジェニックマウスが白血病化することから、HOX11はリンパ球の増殖や分化に関与する可能性が示されている。正常リンパ球の増殖や分化におけるHOX11の機能的な役割については未だ知られておらず、この役割を明らかにすることは必要であると思われる。本研究者は、半定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって正

常マウスリンパ球におけるHox11mRNAの発現を検討し、正常リンパ球の増殖や分化においてHox11が発現していないことを示し、元来はT細胞において発現のないHOX11がT細胞に大量に発現することによって白血病へ至らせることが明らかにした。

「方法」

1. 動物：(C57BL/6 X DBA/2) F1マウスを使用した。
2. RT-PCRとサザンプロット法：抽出した全RNAからRT-PCRを行った。得られたHox11DNA量をサザンプロット法により測定した。
3. 細胞刺激実験：胸腺細胞と脾臓細胞を培養し、フルボールエステル(PMA)とイオノマイシンで刺激した。
4. 骨髄細胞とフローサイトメトリー解析：骨髄細胞をインターロイキン7(IL-7)存在下で培養し、フローサイトメトリーにて解析した。

「結果」

リンパ造血器系器官におけるHox11の発現を調べるために、マウス胎生13.5日における脾臓、胸腺、肝臓、卵黄嚢から得たRNA中のHox11mRNA量をRT-PCRで調べたところ、Hox11は脾臓や胸腺では検出されたが、肝臓や卵黄嚢では検出されなかった。また、胎生13.5日から生後4週齢までの脾臓から得たRNAのHox11mRNA量をRT-PCRで調べたところ、発現の最大は胎生13.5日にみられ、その後は発生の進行に従って徐々に減少していた。リンパ球は胎生15.5日以降に脾臓で増加するにもかかわらず、Hox11の発現が低下していくことから、脾臓での発生過程のリンパ球でのHox11mRNAの発現は少ないことが示唆された。また、前駆細胞からB細胞系列の細胞へ分化させることのできるIL-7依存骨髄細胞培養において、初期B細胞系列細胞のHox11の発現を調べたが、Hox11の発現は検出されず、リンパ球の発生分化にはHox11は関与しないことが示唆された。また、胎生13.5日から出生までの胸腺から得たRNA中のHox11mRNA量をRT-PCRで調べたところ、Hox11の発現は胎生13.5日と胎生14.5日の胸腺では検出されたが、その後は検出されなかった。T前駆細胞は胎生13日以降から胸腺葉へ迷入し、胎生16日以降の胸腺で分化することから、Hox11は胸腺細胞の発生分化には関与していないことが示唆された。また、成獣マウスの胸腺細胞や脾臓細胞をPMAとイオノマイシンで刺激して細胞増殖させた時のHox11遺伝子の発現誘導能を調べたところ、これら活性化リンパ球でもHox11の発現は検出されなかった。

「結論」

HOX11はT細胞の腫瘍化を引き起こすことから、リンパ球の増殖や分化に関与する可能性が示されているが、正常リンパ球の増殖や分化におけるHOX11の機能的な役割については未だ不明な点が多い。本研究は正常T細胞においてRT-PCRを用いてもHox11mRNAが検出されないことから、元来はT細胞において発現のないHOX11がT細胞に大量に発現することによって白血病へ至らせることが示した。今後のHOX11によるT細胞の腫瘍化についての解明に役立つ重要な知見を得たものとして価値ある研究と認める。よって本研究者は博士(医学)として学位を得る資格があると認める。