

氏名	こじま なおこ 小島 直子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1704号		
学位授与の日付	平成30年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文題目	Apoptosis-inducing Factor, Mitochondrion-associated 2, Regulates Klf1 in a Mouse Erythroleukemia Cell Line (Apoptosis-inducing Factor, Mitochondrion-associated 2 (Aifm2) はマウス赤白血病細胞株において Klf1 を制御する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	白澤 専二
	(副査) 福岡大学	教授	高松 泰
	福岡大学	教授	宮本 新吾
	福岡大学	講師	自見 至郎

## 内容の要旨

### 【序論】

赤血球造血は Gata1 や Klf1 などの転写因子によって正に制御されているが、逆に負に制御する機構も赤血球造血の恒常性を維持する上で重要である。これまでの報告では、Apoptosis-inducing Factor, Mitochondrion-associated 2 (Aifm2) は、細胞内のミトコンドリア内膜 (MIS) に存在し、細胞内の恒常性維持など、様々な細胞内プロセスの制御に関与する因子である一方で、細胞傷害時には、MIS から切断・放出されて核内部へ入り、DNA を断片化、クロマチン凝縮を発生させ、TP53 依存性アポトーシスを誘発するフラビンタンパク質ファミリーであることが知られている。しかし、赤血球造血における Aifm2 の機能については不明である。

### 【目的】

本研究は、Aifm2 の赤血球造血過程における機能について検討することを目的として行った。

### 【対象と方法】

DMSO 投与下で赤血球最終分化へ誘導可能なマウス赤白血病細胞株 (MEL) における *Aifm2* の mRNA 発現量を qRT-PCR 法を用いて調べた。次に MEL 細胞における Aifm2 タンパク質の発現及び局在を調べるため、免疫細胞化学染色 (immunocytochemistry: ICC) を行った。

MEL 細胞における *Aifm2* の機能を評価するため、siRNA による発現阻害実験を行い、May-Giemsa 染色による細胞形態変化の観察を行った。更に細胞死を評価するため、トリパンブルー染色による生死細胞の計数を顕微鏡下で実施し、アポトーシスに関しては annexinV と propidium iodide (PI) による 2 重染色を行った後、細胞をフローサイトメトリー (以下、FCM) 法にて解析した。加えて、アポトーシスを分子レベルで評価するため、アポトーシス関連遺伝子 *Bax*・*Bcl2*、細胞生存関連遺伝子 *Mc11*、細胞増殖関連遺伝子 *Myc*・*Ccnd1* の mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて解析した。また赤血球造血能における影響については、同様に qRT-PCR 法にて赤血球造血関連遺伝子 *Gata1*・*Klf1*・*Hba1*・*Hbb* の mRNA 発現量を測定することで評価した。また siRNA 導入 24 時間後に赤血球造血を誘導する薬剤である DMSO を添加し、24 時間培養後に赤血球造血関連遺伝子の発現を評価した。

### 【結果/考察】

通常の MEL 細胞においては、内因性の赤血球造血を正に制御する分子と考えられている *Dok2* 遺伝子よりも、*Aifm2* は有意に高い発現を示した ( $p < 0.001$ )。また、ICC のデータから、*Aifm2* タンパク質はこれまでの報告と同様に、MEL 細胞においては核と細胞質に局在しており、アポトーシス誘導による分化抑制に関与していることが示唆された。*Aifm2* の発現阻害実験では、siRNA 導入後 24 時間の細胞において *Aifm2* の mRNA 発現を低下させたが、形態上一部に肥大した細胞がみられたものの、顕著な違いは認められなかった。生細胞数は、*Aifm2* siRNA 導入細胞 ( $205,166 \pm 11,918.2$ ) と対照 siRNA 導入細胞 ( $199,200 \pm 31,146.8$ ) 間で統計的に有意な差は見られなかったが、死細胞数は *Aifm2* siRNA 導入細胞 ( $17,300 \pm 2,605.0$ ) のほうが対照 siRNA 導入細胞 ( $30,566 \pm 2,974.0$ ) に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ )。FCM 法によるアポトーシス解析では、siRNA 導入後 24 時間における生細胞 (annexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>)、アポトーシス初期の細胞 (annexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>)、アポトーシス後期の細胞 (annexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) の割合を測定したところ、いずれの分画においても両者間で統計的に有意な差はみられなかった。*Bax*・*Bcl2*・*Mc11*・*Myc*・*Ccnd1* の発現解析では、アポトーシス誘導因子 *Bax* の発現が 2.3 倍の上昇を示すものの、それに連動する抗アポトーシス因子 *Bcl2* の発現低下が認められず、それ以外の mRNA の発現にも有意な差はみられなかった。総じて、通常の MEL 細胞では、*Aifm2* の発現低下により、死細胞数が減るものの、アポトーシスへの関与は不明であった。

赤血球造血の初期の段階に関連すると考えられる *Gata1*, *Klf1* のような造血関連転写因子、および最終分化段階に関与するヘモグロビン構成タンパク質である *Hba1*・*Hbb* の発現変化を調べたところ、通常の MEL 細胞では *Klf1* が  $2.9 \pm 0.2$  倍上昇 ( $p < 0.001$ ) し、*Hba1* と *Hbb* はそれぞれ  $0.60 \pm 0.2$  倍 ( $p < 0.05$ )、 $0.5 \pm 0.2$  倍 ( $p < 0.01$ ) と減少した。以上より MEL 細胞を初期分化段階へ誘導している可能性が示唆された。さらに DMSO 添加により、MEL 細胞を赤血球最終分化へ誘導させると、*Hbb* の発現は  $1.6 \pm 0.2$  倍 ( $p < 0.05$ ) に上昇するものの軽微で、その他に大きな変化も認められなかった。

## 【結論】

MEL 細胞株を用いた実験により、*Aifm2* の発現抑制により、アポトーシスとは関係なく、*Klf1* の発現を誘導していることより、分化誘導前では、*Aifm2* は *Klf1* の発現を抑制していることが示唆された。今後 *Aifm2* と *Klf1* を含む他の赤血球造血関連転写因子の関連を調べることで、新たな赤血球造血機構の解明につながる可能性がある。

## 審査の結果の要旨

マウス胎仔の造血に必須の遺伝子である *Runx1*、*Myb*、*Evi1* をノックアウトしたマウスにおける胎齢 10.5 日目の造血幹細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した結果、*Aifm2* 遺伝子を造血に関連する可能性が高い新規遺伝子として、申請者のグループは同定し、*Aifm2* の機能解析を行った。

これまでの報告では、*Aifm2* は、細胞内のミトコンドリア内膜 (MIS) に存在し、細胞内の恒常性維持など、様々な細胞内プロセスの制御に関与する因子である一方で、細胞傷害時には、MIS から切断・放出されて核内部へ入り、DNA を断片化、クロマチン凝縮を発生させ、アポトーシスを誘発することが知られている。しかし、赤血球造血における *Aifm2* の機能については不明である。本論文では、赤血球様細胞へ分化誘導可能な細胞であるマウス赤白血病細胞株 (MEL 細胞) において、*Aifm2* が核内において、アポトーシス誘導因子というよりも、赤血球造血を正に制御する *Klf1* の発現を下方制御する因子として赤血球造血を抑制している可能性が高いことを初めて報告した。今後、*Aifm2* と *Klf1* を含む他の赤血球造血関連因子の関連を調べることで、新たな赤血球造血機構の分子レベルでの解明につながる可能性がある。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、結論、主な質疑応答は以下のとおりである。

### 1. 斬新さ

赤血球様細胞へ分化する MEL 細胞を用いて、*Aifm2* が赤血球造血に関わる様々な遺伝子発現を正に調整する重要な転写因子として知られている *Klf1* の発現を負に制御していることを初めて示した。

### 2. 重要性

*Aifm2* は、ATP 産生による酸化還元反応の制御による活性酸素の調整を行い、細胞の恒常

性維持に関与する他、細胞傷害時においてはDNA断片化、クロマチン凝縮によるアポトーシスの誘発に関与するタンパク質である。Aifm2の赤血球造血における機能については不明である。本論文において、Aifm2が赤血球分化の因子として重要なKlf1の発現を負に制御していることが明らかとなった。近年、iPS細胞やES細胞から生体外で赤血球を大量に産生する技術の確立が期待されているが、赤血球造血を負に制御するためのメカニズムを解明することも将来重要な課題となりうる。

### 3. 実験方法の正確性

本研究に使用したMEL細胞は赤血球分化の実験では一般的に用いられているものであり、免疫細胞化学染色（ICC）、siRNAを用いた発現阻害実験、フローサイトメトリー法、qRT-PCR法による相対mRNA発現量の測定については、いずれも最低3回は実施し、統計学的にも正確な手法を用いた。

### 4. 表現の明確さ、および結論

研究目的、方法、実験結果、考察は、いずれも明確に記載された英語論文と判断される。なお、申請者は今回、MEL細胞において、Aifm2が赤血球造血に関与しているという仮説に基づいて実験を行っている。siRNAを用いた発現阻害後の実験により、Aifm2発現抑制下のMEL細胞において、mRNAレベルではあるが、赤血球造血に必須な転写因子であるKlf1の発現に顕著な上昇が見られたことから仮説に対する最終的な結論も妥当と判断した。

### 5. 主な質疑応答

学位申請論文の内容の発表の後、以下の質疑応答が審査員から申請者に対して行われた。

Q1:

*Dok2*と*Aifm2*を比較した理由は何か？

A1:

*Dok2*については、実験を行っていた杉山研究室で論文として報告されていたものであり、単純に、赤血球の分化誘導に関連する遺伝子として、*Aifm2*の発現量と比較しました。尚、*Dok2*は造血においては、*Aifm2*とは逆に造血を促進する方向に作用しております。

Q2:

Aifm2は通常はミトコンドリア内膜に存在し、障害を受けた細胞の場合は核へ移行してアポトーシスを誘導するということが、MEL細胞については定常的に（導入前の状態では）どのように存在しているのかがFigure1のICCの結果からだと分からない。つまり、ミトコンドリア内膜に存在しているAifm2が核に移行することで分化に影響を与えるのか、もともとAifm2が核に存在していて影響を与えるのかが分からない。

A2:

ご指摘の通りであり、Figure1の結果はAifm2の発現抑制前の染色のみであり本結果からご質問の回答については何も言うことができません。また、本来なら核と細胞質を染色する方法に加えて、厳密にミトコンドリア内膜における局在を調べるためにはミトコンドリアの蛍光染色も行うべきであったと考えております。

Q3:

Figure3の「viable cells」とPIとAnnexin Vで染色した際の「Living cells」は違う細胞なのか。「Early apoptotic cells」、「Late apoptotic cells」をアポトーシスに陥った細胞だと捉えると、(前のスライドの)dead cellsとの整合性が取れていないのではないかと。ゲートのセッティングは問題ないか？

A3:

死細胞除去を行なった後の「viable cells」を対象としてPIとAnnexin Vで二重染色をして解析をしています(viable cellsの一部がLiving cellsである。)。今回のAnnexin Vを使ったアポトーシス解析の実験系ですが、細胞によってはAnnexinVに染まりやすい特性があるため、適切な方法であったかどうかについては検討の余地があるものの、アポトーシスについては差がなかった結果を示すべく提示しています。ゲーティングについて、今後同様の実験をする際には再検討が必要であると考えています。

Q4:

(Aifm2の発現抑制後に)死細胞数が減っているのにも関わらず、生細胞数が増えていない点についてどの様に解釈しているか？論文で言いたかったことは何なのか？

A4:

今回、死細胞数が減っているにも関わらず、その死細胞を除去し生細胞を対象としたフローサイトメトリーの結果が変わっていないという結果の解釈ですが、実験系が最適な手法ではなかった可能性が挙げられます。また、論文から言える内容は、Aifm2の発現阻害に伴い、①アポトーシスについては何も確認できなかったこと、②赤血球造血については転写因子であるKlf1のmRNA発現量が増加したこと、の2点です。

Q5:

Aifm2の発現を抑制した時、Klf1の発現が上昇したにも関わらず、Hba1とHbbが低下しているのは何故か？分化することを示す結果になっていないのではないかと？

A5:

分化誘導していないMEL細胞において、siRNA導入後24時間においては、Aifm2の発現を抑制した時、Klf1が上昇しました。Klf1は初期分化に関連するので、最終分化のマーカであるHba1とHbbに関しては、逆に低下する可能性があります。分化について詳細に

示すためには、赤血球造血関連遺伝子の発現量について 48, 72 時間後などの経時的な変化を提示するべきでした。

Q6:

DMSO 添加後、ヘモグロビン構成タンパク質の発現量は上昇したのか？つまり MEL 細胞は分化の能力があると言えるのか？

A6:

こちら DMSO 添加前後での赤血球造血関連遺伝子の発現変化を示してはおりませんが、添加後の赤血球造血関連遺伝子の mRNA の発現の絶対量は増加していることは確認しており、問題なく分化することを示唆しております。

Q7:

MEL 細胞は本実験に適している細胞なのか？MEL 細胞は白血病の細胞株であり、腫瘍細胞であるために正常な分化状態を表現していない可能性もある。まずは CD34 などを発現している細胞を対象とするべきだが、それが難しかったのであれば、他の細胞株についても同様の結果が得られるのか解析してみると良かったのではないかと。

A7:

多くの論文で示されているように、赤血球様細胞への分化という点では、MEL 細胞はグロビン合成を行い、ヘモグロビンの定量もできることから、ある一種の分化誘導系であることは間違いないのですが、正常な赤血球造血の遺伝子発現パターンとは若干異なっていると考えております。したがって、MEL 細胞が一つの目安にはなりますが、全てを表わしている訳ではないと考えております。また、生体から採取した細胞や他の細胞株である K562 を用いて同様の実験を行うことでより本質的な結論を導くことができたということはその通りであり、本研究は MEL 細胞についてのみの報告であり、今後そのような実験を行うことが重要であると認識しております。

Q8:

臨床上的観点から見たときに、赤血球が作られてばかりでは多血症になるため、*Aifm2* のような遺伝子が働いて、赤血球造血を制御しているということを示すものなのか？

A8:

はい、その様に解釈しております。*Aifm2* が *Klf1* の転写を制御することで赤血球分化を抑制する方向に働いていることが示唆されうると考えております。

Q9:

DMSO 添加により強制的に分化させるしか方法はないのか？

A9:

DMSO は細胞への透過性が高く、赤血球系の細胞の他に色々な細胞の分化誘導に用いられる薬剤のため、時に解釈が難しくなる時があります。本来なら生体から採取した赤芽球などの細胞を用いた分化誘導系を用いることが本質的な赤血球造血における作用を明らかにするためには必要であると考えます。

Q10:

赤血球造血の分化誘導をするということを言うためには、遺伝子の mRNA の発現量のみでなく、MEL 細胞が実際に分化をしているという何らかのデータを示さないといけなかったのではないか。

A10:

はい。全くご指摘の通りでございまして、分化させるときは1日のデータだけでなく、タイムコースで観察した結果も示す必要があったと考えます。

以上の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、結論、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。