

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification of A Novel Fusion Gene, TTL, Fused to TEL, in Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;13)(p13;q14) And Its Implication in Leukemogenesis

和訳 白血病に認められた t(12;13)(p13;q14) 転座の新規融合遺伝子の単離と解析

指導教官 平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 喬 穎

近年、白血病に関連する染色体転座の切断点近傍の遺伝子が次々と単離され、転座により形成されたキメラ遺伝子やキメラ蛋白の役割が徐々に解明されつつあり、これらの融合遺伝子形成が白血病の発症に極めて重要な役割をもつことが判明してきた。TEL(translocation-ETS-leukemia)は、ETV6(ets translocation variant 6)とも称され、t(5;12)(p31;p13)転座を有する CMMoL(慢性骨髄単球性白血病)患者から、PDGFR $\beta$  遺伝子に融合する遺伝子としてクローニングされた。TEL 遺伝子の産物は N 末端側に HLH(helix-loop-helix) domain と C 末端側に ETS(E-26 transforming specific) DNA binding domain を有することから核内転写因子である ETS ファミリーの一員と考えられる。TEL は ETS 結合部位(GGA-A/Tモチーフ)に特異的に結合し、下流遺伝子の転写を抑制することにより転写制御因子として機能する。また、TEL は、12 番染色体短腕における染色体異常の半数以上に関与することが知られており、TEL 遺伝子内の切断点は転座により異なること、様々な染色体との転座により種々の融合遺伝子を形成することで造血器腫瘍の発症に関与することが知られている。これまでに、TEL と融合する遺伝子として、チロシンキナーゼである PDGFR $\beta$ , ABL, JAK2, TRKC, ARG, SYK

や、転写因子である AML1, MN1, MDS1/Evi1, CDX2、その他に STL, BTL, ACS2, ARNT, PAX5, HLXB9, MDS2 の計 17 種類が報告されている。これらのうち一部の融合遺伝子は、白血病の発症に関与することが示されているが、融合する遺伝子が色々なため、形成されるキメラ型遺伝子の構造から 12p13 転座型白血病に共通の発症機構を想定するのはきわめて困難であった。従って、TEL の新しいパートナーのクローニングは、癌化における TEL 遺伝子の役割をさらに理解する上で極めて重要である。

t(12;13)(p13;q14) 転座は、AML, CML, MDS および ALL の症例にみられ、少なくともこれまでに 12 例以上が報告されている。しかし、その転座に関与する遺伝子はこれまで不明であった。そこで、今回、私は、成人 ALL 症例にみとめられた t(12;13)(p13;q14) 転座に関与する遺伝子の同定を試み、TEL と融合遺伝子を形成する新規遺伝子 TTL(twelve-thirteen, translocation, leukemia)を単離した。症例は、46歳男性、FAB分類にて急性リンパ性白血病 ALL-L2 (pre-B)と診断された。白血病細胞の染色体分析では、t(12;13)(p13;q14) 転座を認めた。この転座は、TEL の存在する 12p13 領域に転座点を持つことより TEL 遺伝子内での転座が予想されたため、まず TEL 遺伝子座に存在するコスミドプローブを用いて、FISH による切断点領域の同定を行った。FISH の結果より、12 番染色体上の切断点は TEL 遺伝子の exon2 近傍に存在することが明らかになった。TEL 側の切断点が存在する領域をさらに詳細に同定する目的で、サザン解析を行ったの結果、この症例における 12 番染色体の転座点は、TEL の exon 1 と exon 2 の間に存在することが明らかになった。TEL 遺伝子が相互転座により新たな融合遺伝子を形成することが予測されたため TEL 遺伝子に融合する新規遺伝子配列を同定する目的で、患者白血病細胞より抽出した mRNA を用いて、3'-RACE 及び 5'-RACE を行った。TEL exon 1 にプライマーを設定して行った 3'-RACE により、TEL exon 1 が未知の塩基配列 450bp と融合していることが判明した。Radiation Hybrid Mapping の結果、を用いた解析により、この新規配列は染色体 13q14 上の配列であることが確認された。さらに、この新規塩基配列を含む遺伝子の全長を単離同定する目的にて、この新規配列をプローブとして、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。RT-PCR により、この新規遺伝子の発現

が確認されていた精巣及び脳細胞由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングに用いた。その結果、133 アミノ酸をコードする新規遺伝子 TTL (twelve-thirteen, translocation, leukemia) を同定した。また、TTL には精巣由来の 2090bp (TTL-T) と、脳細胞由来の 3252bp (TTL-B1)、3390 bp (TTL-B2) の 3 種類のスプライシングフォームが認められた。ヒト組織における TTL の発現はノザン法では確認出来なかったが、RT-PCR においては、検討した 17 種の組織全てにおいて ubiquitous に発現していることが確認された。また、t(12;13) (p13;q14) 細胞を用いた RT-PCR 解析では、TEL の exon1 と TTL の 3' 側の新規融合遺伝子 (TEL/TTL) 及び、TTL の 5' 側と TEL の exon2 以下とが結合した 2 種類のスプライシングフォームをもつ TTL/TEL-1 と TTL/TEL-2 が認められた。TEL/TTL 融合遺伝子の予想産物は 31 アミノ酸である。また、TTL/TEL-1 は TTL exon5b より TEL exon2 に in-frame で結合していた。TTL/TEL-2 は、TTL と TEL の exon2 と out-of-frame に融合していた。そのため、以後 TTL/TEL-1 融合遺伝子産物の機能解析のみを行った。TEL の HLH 領域と ETS 結合領域を持つ TTL/TEL-1 融合蛋白は、461 アミノ酸からなり、ETS Binding Site (EBS) を用いたレポーターアッセイの結果、TEL 蛋白同様、EBS (ETS-binding site) プロモーターに対して抑制的に作用し、しかも、その転写抑制作用は、TEL 蛋白に比して 3 倍以上強力であることが明らかとなった。さらに TEL の N 末端の欠失変異体 (TEL $\Delta$ 75) を用いた検討でも同様に転写抑制作用の増強を認めたことから、この転写抑制作用の増強効果は、TEL の N 末端が欠失する結果生じていることが明らかになった。

TEL 遺伝子はさまざまな遺伝子と融合するため、癌化への関与の形態は多様である。例えば、TEL/PDGFR $\beta$  のような tyrosine kinase を含む融合遺伝子では、TEL の HLH 領域を介しホモダイマー形成することで、C-端チロシンキナーゼが恒常的、非調節的な活性化をし、この結果、細胞の無秩序な増殖をひき起こして、細胞の癌化に関与すると考えられている。また、t(12; 21) では、TEL/AML1 が、AML1 の TCR $\beta$  エンハンサー活性に対してドミナント・ネガティブ に作用することが細胞の白血病化に重要であることを示唆されている。TEL/CDX2 と TEL/MDS1/EVI1 では、融合転写産物内に TEL の機能的ドメインが存在しな

いことから、TEL プロモーターによる CDX2 と EVI1 の異所的な発現が腫瘍化に関与すると推定されている。TEL/MN1, TEL-STL, BTL-TEL, TEL-ACS 等は、TEL 遺伝子の破壊や局在部位の変化が腫瘍化に関与すると考えられる転座例である。一方、TEL 自身の腫瘍化への関与については、現在 TEL の機能的消失が重要であるとの推測がなされているが、転座に関与しないアレルにおける点突然変異の割合は必ずしも高いわけではなく、TEL が癌抑制遺伝子として機能するか否かに関しては確定的な証拠はない。本症例では、MN1/TEL、TEL/ACS2 および STL/TEL の場合と同様、TTL/TEL および TEL/TTL 両方の相互融合遺伝子の発現が確認された。TTL/TEL は、461-アミノ酸をコードする融合遺伝子で、TEL 遺伝子の HLH および ETS 領域の両方を含んでいる。同様の例は、MN1/TEL、STL/TEL、BTL/TEL、ACS2/TEL、HLXB9/TEL および PAX5/TEL でも報告されている。私は、TTL/TEL 蛋白質の転写抑制作用を検討したところ、TTL/TEL は EBS-プロモーターに対して、TEL の約 3 倍の抑制活性を示すことを明らかにした。また、野生型 TEL の 5'-端を欠く TEL の欠失変異体も TTL/TEL と同様の作用を認めることから、転座により欠損した TEL 蛋白質の N-末端側の領域が、その転写抑制作用に阻害的に働くことが推察された。以上より、t(12;13)(p13;q14)による白血病発症のメカニズムその一つとして、TEL の機能的増強に関与する可能性を示唆された。これは従来の TEL の機能的喪失が白血病化に重要である仮説とは対立するものであるが、TEL 関連転座の多様性と考えた場合、造血、細胞の分化のある特定の時期においては TEL の機能の過剰が白血病の発症に重要な役割を果たす可能性も否定し得ないと考えられる。この点に関しては今後の検討が必要である。

以上のように私は急性リンパ性白血病に認められた染色体転座である t(12;13)(p13;q14)の切断点より、TEL 遺伝子に融合する 18 番目の相手遺伝子として、新規遺伝子 TTL を単離した。TTL/TEL は TEL の転写抑制活性をさらに増強することが示され、TEL の N-末端側部分に TEL の転写抑制作用に関与する regulatory sequence が存在する可能性が示唆された。