

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 *MLL-SEPT6* による白血病発症機構の解析

指導教官 五十嵐隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 小埜良一

乳児白血病は稀な疾患であるが、初診時白血球数の著増、顕著な肝脾腫、皮膚浸潤などが認められ、最近予後の改善した小児の白血病において、幹細胞移植を含めた集学的治療を行っても依然として予後不良である。近年、乳児白血病の約 80% に染色体 11q23 転座が認められ、この転座を有する症例において特に初診時白血球数の著増が認められ、予後不良であることが明かとなってきた。そこで私は、この 11q23 転座型白血病の病態をより詳細に解明するために、乳児白血病の臨床検体を用いて遺伝子解析を開始した。

そもそも、染色体転座は造血器腫瘍において高頻度に認められる染色体異常の一つである。なかでも 11q23 転座は、乳児白血病や二次性白血病において高率に認められる染色体異常で、各々転座相手部位に対応した特徴を有する急性リンパ性白血病又は急性骨髄性白血病(AML)などの臨床像を呈する。11q23 の切断点近傍からクローニングされた *MLL* 遺伝子はクロマチン構造のリモデリングを介して転写制御を行うと想定されているが、11q23 転座においては *MLL* と転座相手遺伝子が異常な融合遺伝子を形成して、N 末側 *MLL* 断片と C 末側の転座相手遺伝子由来の蛋白断片が融合した異常な *MLL* 融合蛋白が生じることにより、白血病の発症が引き起こされる。これまで約 40 種類の転座相手遺伝子が同定され、その一部は生物学的性状の一端が明らかにされたが、全ての転座相手遺伝子に共通する機能や構造の特徴は見いだされ

子による白血病発症には *MLL* の切断による短縮のみでは不十分で、転座相手遺伝子内の転写活性化能を有するドメインもしくはその近傍を含めた領域との融合、あるいはホモ二量体の形成可能な領域との融合が形質転換に必要であること、マウスの骨髄移植モデルの検討では転座相手遺伝子に応じて様々な潜伏期を経て AML を発症すること、白血病の発症には何らかの遺伝子異常(いわゆる *second hit*)が更に必要な可能性があることなどが報告されてきたが、まだ未解明な点が多い。

本研究において、私は、まず 11q23 と Xq22-24 に異常を有する 3 例の乳児の AML を解析した。患者 1 は 3 ヶ月女児の AML French-American-British (FAB) 分類 M2 で、染色体異常として t(5;11)(q13;q23), add(X)(q22) を有していた。患者 2 は 7 ヶ月男児の AML-M5 で ins(X;11)(q22;q23) を有していた。患者 3 は 6 ヶ月女児の AML-M1 で add(X)(q2?), del(11q?) を有していた。サザンブロット解析では全例で *MLL* 再構成を認めた。患者 1 の RNA を用いた cDNA panhandle polymerase chain reaction (PCR) 法により 108bp の *MLL* エクソン 8 に 117bp の未知の塩基配列が融合した転写産物を検出し、reverse transcription (RT)-PCR によって、この融合転写産物の発現を確認した。この未知の塩基配列を用いたデータベース検索と cDNA ライブラリーのスクリーニングによって、*MLL* の新規転座相手遺伝子としてマウスの *Sept6/Septin6* のヒトホモログである *SEPT6/SEPTIN6* を単離した。*SEPT6* は少なくとも 12 個のエクソンから構成され、選択的スプライシングによって、少なくとも 2 種類の転写産物を有し、各々 C 末のアミノ酸が一部異なる 48.8kDa, 49.7kDa のタンパク質をコードすると予想された。この *SEPT6* 蛋白質は C 末に coiled-coil region、中央に septin ファミリーで高度に保存されている GTP 結合ドメインを有していた。septin ファミリーでは *SEPT6* の他、既に *SEPT5/CDCRELI*、*SEPT9/AF17q25/MSF* が *MLL* の転座相手遺伝子として報告されており、いずれもほぼ全長が *MLL* 断片と融合するという共通点が認められた。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析の結果、*SEPT6* は Xq24 にマッピングされ、更に *MLL*、*SEPT6* の FISH 解析を行ったところ、患者 1 の染色体異常は単純な相互転座の t(5;11)(q13;q23) ではなく、t(X;11)(q24;q23) を含む複雑な染色体異常であることが示唆された。また、患者 2、3 は Xq22-24 と 11q23 を含む複雑な染色体異常を有していたため、RT-PCR を行ったところ、*MLL-SEPT6* 融合転写産物が検出された。更に FISH 解析を行い、患者 2 では 11q23 の Xq22-24 への挿入が確認され、患者 3 は、患者 1 と同様な結果で、単純な相互転座ではないと考えられた。これらのことから *SEPT6* の転写方向が *MLL* と逆のために複雑な染色体異常を呈している可能性が示唆された。

ノーザンブロット解析の結果、約 2.3kb、約 3.1kb、約 4.6kb の 3 種類の *SEPT6* の転写産物が胎児の肺、肝臓、腎臓と、成人の脳以外の全ての組織で検出された。一方、約 2.7kb の転写産物は胎児及び成人の脳で検出され、相対的に成人よりも胎児において強く発現していた。一般に septin の発現は神経系に特徴的なものが多いことから、*SEPT6* 蛋白が脳において他臓器と異なる機能を果たしている可能性や胎生期における脳の発達に関与している可能性が示唆された。

これまでに他のグループから 5 例の *MLL-SEPT6* 陽性白血病の報告があり、今回解析した 3 例と併せた 8 例を検討すると、全例乳児期発症の AML で、一般に *MLL* 融合遺伝子による AML では FAB 分類で M4、M5 の占める割合が高いのに対して、*MLL-SEPT6* 陽性白血病では 8 例中 5 例で FAB 分類が M1 または M2、残り 3 例が M4 または M5 と診断されており、一定の傾向を示さなかった。また、今回の解析結果と同様な複雑な染色体異常をいずれも有しており、*SEPT6* と *MLL* の転写の向きが逆であるためと考えられた。

次に *in vitro* における *MLL-SEPT6* の形質転換能を解析するため、レトロウイルスを用いてマウスの造血前駆細胞に遺伝子導入を行い、コロニー形成能を検討したところ、比較的未熟で異型性を有する細胞によって構成される大型で細胞が密集したコロニーが replate ごとに増加したことから、*MLL-SEPT6* は *in vitro* で造血前駆細胞の分化を阻害し、増殖能を増強することが示された。形質転換した細胞は interleukin-3 依存性に増殖し、オリゴクローナルで、RT-PCR にて *MLL-SEPT6* を発現していることが示され、*MLL-SEPT6* が直接造血前駆細胞の不死化に寄与していることが確かめられた。また fluorescent activated cell sorting (FACS) 解析を行い、Gr-1, CD11b が陽性、c-Kit が弱陽性に対し、Sca-1, Ter119, B220, CD3 は陰性であったことから、骨髄系の lineage に限局し、ある程度分化した段階で分化停止していることが示された。以上の結果は、これまでの *MLL-LTG19/ENL* などを用いた報告とほぼ同様であった。

SEPT6 断片内における形質転換に必要な領域を決定するため、*SEPT6* 内の主要構造である GTP 結合ドメインや coiled-coil region を欠く mutant を作成して、同様に遺伝子導入を行い、コロニー形成能を検討したところ、いずれも形質転換能を失っており、*MLL-SEPT6* の形質転換においては、*SEPT6* 内の 2 個の主要ドメインの両方が共に必要であることが示された。最近、*MLL-GAS7* や *MLL-AF1p* で coiled-coil region を介した二量体形成が形質転換において重要な役割を果たしていることが示されており、*SEPT9* のように coiled-coil region を持たない septin でも *MLL* とそのほぼ全長が融合して白血病を発症することから、*SEPT6* は融合断片全体として二量体または多量体形

成に寄与している可能性も考えられたが、**MLL-SEPT6** 融合蛋白としての多量体形成能の検討が更に必要である。

MLL-SEPT6 により形質転換した細胞の *in vivo* における腫瘍形成能を検討するため、骨髄移植モデルとして致死下の照射を行った同系のマウスに、**MLL-SEPT6** により形質転換した細胞を静注したところ、約7ヵ月の観察期間において8匹中4匹が骨髄増殖性疾患を発症して死亡した。これまでの **MLL-LTG19/ENL** などを用いた解析と比べ、臨床像と比較して潜伏期が長く、かつ臨床像(乳児 AML)とも異なっていた。マウスとヒトの病態の差異を反映している可能性や、転座相手遺伝子 **SEPT6** の分断効果が反映されていないことなど今回の解析系が十分にヒトの白血病発症機構を再現できていない可能性が考えられた。

今回用いた **MLL-SEPT6** 導入によるマウス骨髄細胞の形質転換モデルは、今後 **SEPT6** の分断効果及び **SEPT6** 断片の果たす役割のより詳細な解析や、ヒトの白血病発症機構をより正確に再現可能なモデル系の構築を行っていく過程で、ある種の **MLL** 融合遺伝子の白血病の発症機構の解明に役立つことが期待される。