[別紙１]

論文の内容の要旨

論文題目：　Runx1 inactivation promotes leukemogenic potential by enhancing stemness

和訳：　Runx1不活化は幹細胞性増強を介し　白血病化に関与する

指導教員：小児科　五十嵐　隆　教授
指導委託先教員：Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore
伊藤　嘉明　教授

東京大学大学院医学系研究科
平成１３年４月入学
医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名：元田　玲奈

近年、白血病細胞は白血病幹細胞という限られた細胞集団から産生されると考えられるようになり、それらは正常造血幹細胞の持つ自己複製能や多分化能などの「幹細胞性」を基本的に保持していると考えられている。本研究では、成体型造血幹細胞の発生に不可欠であり、ヒト白血病において最も高頻度に変異を受けている *RUNX1* 遺伝子の不活化が、幹細胞性の増強を介して如何に白血病に関与するのか、特に白血病初期クローンの形成における役割の解明を試みた。

RUNX1 は転写因子 PEBP2/CBF のαサブユニットで、DNA 非結合性βサブユニット（PEBP2β/CBFβ）とヘテロ二量体を形成する。その DNA 結合領域が *Drosophila* の *runt* 遺伝子産物と高い相同性を持つことから、Runt-related gene, *RUNX* と呼ばれる。近年、*RUNX1* の変異が白血病に深く関与することが判明したことから、そのメカニズムの解明が注目を浴びている。

ヒト白血病において、*RUNX1*変異の多くは染色体転座であり、産生されるキメラタンパクは対立遺伝子座に残存する正常RUNX1に対して優性阻害効果を持つ。また、近年点突然変異も同定され、この変異体も転写因子としての正常機能を欠く為、*RUNX1* 関連白血病においてはその機能消失が共通の発症メカニズムであると考えられている。一方、健常人にもキメラ遺伝子が同定されること、また、時期特異的キメラ遺伝子導

入マウスや*Runx1*欠損マウスが白血病を自然発症しないことなどにより、*RUNX1*変異のみでは白血病は発症せず、協調的に働く付加的遺伝子変化が必要である、と考えられている。

これまで当研究室では、*Runx1*半数体不全と協調的に働く付加的遺伝子変異の同定の為に、内在性レトロウイルスを持つBXH2マウスを用いたレトロウイルス挿入変異導入法が試みられて来た（BXH2-*Runx1*+/-マウス系）。この方法により、がん原遺伝子*Ras*を活性化する変異、例えばRasの負の制御因子であるがん抑制遺伝子*Nf1*（Neurofibromatosis type 1）の不活化変異が、*Runx1*+/-マウスにおいてはより起こりやすいことが示されていた。これは、ヒト白血病で従来認められていた「*RUNX1*機能消失と*RAS*経路活性化との協調性」をマウス実験系でも示唆する結果として重要視されていたが、その詳細な機序は不明であった。

一方、本研究は、上記の *Nf1* の不活化が起こっていた白血病マウスの解析を更に進めて行く中で、「白血病発症前の早期に、末梢血の一過性白血球増加に対応して *Nf1* 不活性化クローンが出現したが存続せずに消失した」BXH2-*Runx1*+/+マウスを見出した。上述の知見と合わせて考えると、*Runx1* 不全のような何らかの遺伝子異常を同時に持っていれば、このようなクローンの存続は維持されるのではないかと予想された。

そこで、ヒトでの症例及びマウス実験系で示された「*Runx1* 機能消失と *Ras* 経路活性化との協調性」を細胞培養系で実験的に検討した。*Runx1*+/+または *Runx1*+/- B6 純系マウスから骨髄細胞を採取し、*GFP* を選択マーカー遺伝子として持つレトロウイルスベクターを用いて発がん性変異 *RAS* を導入し、「変異 *RAS* の導入された造血幹／前駆細胞」を c-Kit+ GFP+ 細胞として FACS（fluorescence activated cell sorting）で採取して用いた。7 日間の液体培養・10 日間のコロニーアッセイいずれの場合でも、変異 *RAS* による細胞増殖刺激効果は *Runx1*+/-状態によって更に促進されることが示された。

上記の細胞採取の段階で、興味深い二つの現象が認められた。一つは造血幹／前駆細胞分画が、変異 *RAS* 導入によって劇的に減少すること、もう一つは *Runx1*+/+に比べて *Runx1*+/-状態で増加することである。時期特異的 *Runx1* 欠失マウス（*Runx1*-/-状態）細胞を用いた実験でも、これらの二つの現象は同様に認められた。この *in vitro* 実験で見られた「*Runx1* 不全（*Runx1*+/-及び *Runx1*-/-）状態における造血幹／前駆細胞増加」は、*in vivo* でも見られることが確認された。すなわち、*Runx1*-/-マウス骨髄の造血幹細胞の頻度を、FACS による KSL（c-Kit+ Sca-1+ Lineage-）細胞及び side population、細胞培養系を用いた LTC-IC（long-term culture-initiating cell）という３つのアッセイ系で解析したところ、いずれのアッセイでも、幹細胞分画が正常の約２倍増加していることが示された。これらの増加の機序を検討する為、アポトーシスアッセイや遺伝子発現解析（RT-PCR、 real-time PCR）を行った結果、「*Runx1* 不全による

造血幹／前駆細胞の増加」は、*Bcl2* 発現上昇による細胞死抵抗性や *Bmi1* 発現増加を介した造血幹／前駆細胞の自己複製能亢進、などに起因する可能性が考えられた。

他方、発がん性 *Ras* は基本的に細胞増殖を刺激するが、同時に $p19^{Arf}$ 経路の活性化を通してアポトーシス、セネッセンス（細胞老化）といった安全装置（後述）を惹起することも知られている。実際、*Runx1*+/+ c-Kit+ 細胞への変異 *RAS* の導入は非常に強く $p19^{Arf}$ 発現上昇を誘導し、また、セネッセンス関連マーカー遺伝子 *Dec1* と $p16^{Ink4a}$ の発現も誘導した。アポトーシスも変異 *RAS* の導入によって誘導され、興味深いことにこの影響は全骨髄細胞に比べ、c-Kit+ 分画で顕著に現れており、より未熟な細胞ほど変異 *RAS* によるアポトーシス感受性が高い可能性を示した。以上の知見は、先述の FACS 結果で示された「変異 *RAS* による造血幹／前駆細胞の劇的減少」が、この $p19^{Arf}$ 経路を介したアポトーシスやセネッセンスに起因する可能性を示唆している。

このような変異 *RAS* による影響に対し、*Runx1* 不全はそれを打ち消す方向に働くことが実験結果から推測された。すなわち、変異 *RAS* による $p19^{Arf}$、*Dec1* 及び $p16^{Ink4a}$ の発現上昇は、*Runx1*-/-細胞で低く抑えられていた。元来、Bmi1 が $p19^{Arf}$ 及び $p16^{Ink4a}$ の抑制に関わっていることから、この抑制効果はおそらく *Runx1* 欠失による *Bmi1* 発現上昇によるものと考えられる。また、Runx1 は $p19^{Arf}$ の発現を正に制御することが知られ、その欠失の影響も、変異 *RAS* 導入による $p19^{Arf}$ 発現誘導の抑制に加担している可能性が考えられる。変異 *RAS* はアポトーシス、セネッセンスに加え、細胞分化も誘導することが知られている。血液細胞の場合、マクロファージへの分化が促進される。この *RAS* による作用もまた *Runx1* 不全状態により抑制され、骨髄系未分化細胞が観察された。

本来、発がん性 *Ras* のような変異が起こると、基本的に細胞増殖が刺激される。しかし、同時に細胞自律的に異常増殖を感知する安全装置が働き、アポトーシス、セネッセンスや分化が誘導され、多くの場合、その異常細胞は個体内より排除されてしまう。これはがんに対する生体側の初期防御システムの一つとして近年重要性が注目されており、前述の BXH2 マウスで観察された「一過性末梢血白血球増加」と「早期の *Nf1* 不活化クローンの消失」を説明し得るメカニズムであると考えられる。

本研究は、*RUNX1* が造血幹細胞／前駆細胞における安全装置の維持に不可欠であり、その機能不全は発がん性 *RAS* を発現する白血病初期クローンの個体内維持に積極的に関与することを初めて示唆した点で意義深い。実際、ヒト白血病で *RUNX1* 機能消失と *RAS* 経路活性化が同時に見られることが多い理由の一つもここにあると考えられ、これらの遺伝子異常の協調性を説明する新しい視点を提唱した、と言える。がんにおける「安全装置の破綻」の更なる研究は、新たな治療開発への糸口となる可能性が期待される。