[別紙２]

審査の結果の要旨

氏名　元田　玲奈

本研究は、ヒト白血病において最も高頻度に変異を受けている*RUNX1*遺伝子を対象として、その不活化が白血病初期クローンの形成にどのように関与するのかを、特にヒトでの症例及びマウス実験系で認められていた「*RUNX1*機能消失と*RAS*経路活性化との協調性」という観点から解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

１）これまで、レトロウイルス挿入変異導入法を用いたマウス白血病発症実験で、Rasを負に制御するがん抑制遺伝子*Nf1*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。そこで、本研究では*Nf1*の不活化が白血病発症過程でどのように起こって来るのかを、対象マウスの貯蔵末梢血を用いて逆行性に解析したところ、「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」*Runx1*+/+マウスが見出された。

２）*Runx1*+/+または *Runx1*+/-マウスから骨髄細胞を採取し、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FACS で採取して細胞培養系の実験を行ったところ、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。

３）上記の細胞採取の段階で、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」と「*Runx1*+/+に比べて*Runx1*+/-状態で増加すること」という二つの現象が認められた。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。

４）*Runx1*-/-マウス骨髄の造血幹細胞の頻度を、FACSによるKSL細胞及びside population、LTC-IC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。

５）造血幹／前駆細胞分画を用いて遺伝子発現解析及びアポトーシスアッセイを行ったところ、*Runx1*不全状態では正常に比べ、幹細胞の自己複製能に重要な*Bmi1*や抗アポトーシス因子*Bcl2*の発現上昇が認められた。

6）変異*RAS*は基本的には細胞増殖を刺激する一方、アポトーシス、セネッセンスや細胞分化といった安全装置を惹起することが知られているが、本研究でも、*Runx1*+/+状態への変異*RAS*の導入によって、アポトーシスの顕著な誘導や$p19^{Arf}$の非常に強い発現上昇、セネッセンス関連マーカー遺伝子*Dec1*と $p16^{Ink4a}$の発現誘導が認められた。細胞組織学的にマクロファージへの分化誘導も認められた。

7）*Runx1*-/-状態への変異 *RAS* の導入では、上記の変異 *RAS* による $p19^{Arf}$、*Dec1* 及び $p16^{Ink4a}$ の発現誘導効果は低く抑えられていた。また、変異 *RAS* のマクロファージへの分化促進作用も *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。

以上、本論文は、*RUNX1* の機能不全が造血幹／前駆細胞の量的・質的変化をもたらし、生体初期防御システムの一つである安全装置を抑制することで、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。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、とも言える。また、これまで知られていなかった正常 *RUNX1* の造血幹／前駆細胞における安全装置維持という重要な役割を示唆する研究でもある。今後の更なる研究によって「白血病幹細胞における安全装置の正常化」という観点から新たな治療開発への糸口となる可能性が期待され、学位の授与に値するものと考えられる。