

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 AML1-Evi-1 キメラ遺伝子およびその変異体を用いたマウス骨髄前駆細胞不死化の検討

指導教員 黒川峰夫教授

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

内科学専攻

氏名 竹下昌孝

1. 序説

急性白血病症例に認められる染色体転座の切断点から、造血細胞の未分化能維持や血球の分化・増殖に関わる転写因子が多数明らかになっており、転写因子の変異のもたらず造血細胞の分化・増殖調節機構の破綻が白血病の発症および進展の本態であると理解されるようになってきた。

転写因子や白血病関連分子の機能解析は血液領域のみならず固形腫瘍を含む幅広い疾患の病態の解明および新規治療法開発に寄与しているが、未だ多くの種類の骨髄増殖性疾患では、転写因子やキメラ遺伝子の同定はできたもののその分子の上流および下流の分子機序が完全には解明されていない。本研究は、当研究室にてクローニングされたキメラ遺伝子 AML1-Evi-1 の白血病発症における分子機序をより明らかにすることを目的として計画された。

AML1(RUNX1, PEBP2 α)は、DNA 結合領域 runt ドメインを持つ転写因子であり、PEBP2 β (CBF β , core binding factor β)サブユニットとヘテロダイマーを形成して PEBP2 site に結合することで造血に関わる様々な遺伝子の発現を調節している。AML1 をノックアウトすると胎児肝での造血能の喪失や巨核球成熟の障害、リンパ球の発生の障害が認められることから、AML1 は造血細胞の発生、増殖、分化において重要な鍵を担う転写因子と考えられている。

Evi-1 (ecotropic viral integration site)は DNA 結合領域である 2 つの Zinc finger ドメインを持つ転写因子である。Evi-1 は 3q26 転座を持つ骨髄異形成症候群(MDS), 急性骨髄性白血病の一部、慢性骨髄性白血病(CML)急性転化期、MDS 由来白血病の患者検体において高発現が認められる。また正常核型の骨髄性腫瘍でも Evi-1 の高発現を認める例があることから、造血細胞から腫瘍細胞への形質転換において Evi-1 が重要な役割を占めると考えられる。

現在までに、Evi-1 には細胞増殖に関わる 3 つの機能が同定されている。一つ目は、増殖抑制因子 TGF- β シグナルの抑制である。この機能には第 1 Zn フィンガー領域、抑制領域、CtBP 結合領域と複数の領域が関わっている。二つ目の機能は、第 2 Zn フィンガー領域を介して AP-1 活性を上昇させ、細胞増殖を促進させることである。三つ目の機能は、第 1 Zn フィンガー領域を介して MAP キナーゼの一つ JNK (c-Jun N-terminal kinase)と結合し JNK 活性を阻害しアポトーシスを阻害することである。

以上より、Evi-1 は増殖抑制シグナルやアポトーシスシグナルの核内インヒビターとして作用する転写調節因子と考えられている。

AML1-Evi-1 キメラ遺伝子は、t(3;21)(q26;q22)転座を持つ CML 患者検体由来の細胞株よりクローニングされた。t(3;21)(q26;q22)転座は CML の急性転化期および MDS 由来の白血病患者骨髄に認められるが、初発の急性骨髄性白血病では殆どみられないことから、AML1-Evi-1 が造血幹細胞の慢性的機能異常から急性白血病への転換において重要な役割を担うと考えられている。

in vitro での AML1-Evi-1 機能解析では、AML1 による PEBP2 の転写を dominant negative に阻害すること、および TGF- β や G-CSF 刺激による細胞株の分化誘導を阻害することが示されている。

また、マウス骨髄前駆細胞にレトロウイルスを用いて AML1-Evi-1 を導入するとコロニー形成能が延長され、これをマウスに骨髄移植すると、5 ないし 13 ヶ月後に急性骨髄性白血病の病態を呈する。同様の知見は AML1/ETO(MTG8)キメラ遺伝子でもみられるが、この機序が AML1 の機能阻害によるものか、AML1 に融合した遺伝子の活性化によるものか、等の詳しい分子機序については不明の点が多い。

今回我々は、AML1-Evi-1 キメラ遺伝子によるマウス造血前駆細胞の白血化の分子機序および形質転換の標的細胞を明らかにするために以下の 2 つの実験を行った。

AML1-Evi-1 による骨髄前駆細胞の腫瘍化において、Evi-1 の Smad3 との結合、CtBP との結合、c-fos との結合のいずれの機能がより重要であるかを明らかにするため、

AML1-Evi-1 の機能欠失変異体(AE1- Δ ZF1, AE1- Δ ZF2, AE1-DL/AS, AE1- Δ Rep, AE1- Δ Rep Δ CtBP)を作成し、コロニーアッセイを行って野生型 AML1-Evi-1 と比較した。

マウス造血幹細胞(HSC, hematopoietic stem cell)は表面マーカー解析上、KSL 分画(c-kit(+), Sca-1(+), 分化抗原 lineage(-))に含まれていることが知られている。

造血幹細胞からは骨髓球系共通前駆細胞(CMP, common myeloid progenitor)とリンパ球系共通前駆細胞(CLP, common lymphoid progenitor)、さらに CMP から顆粒球/マクロファージ前駆細胞(GMP, granulocyte/macrophage progenitor)と巨核球/赤芽球前駆細胞(MEP, megakaryocyte/erythrocyte progenitor)へと不可逆的誘導が起こる。

AML1-Evi-1 による形質転換の標的細胞を明らかにするため、マウス骨髓前駆細胞から KSL, CMP, GMP の各分画を分離し、AML1-Evi-1 の導入実験およびコロニーアッセイを行った。

各実験において、標的細胞不死化の positive control として、MLL/ENLs を用いた。

2. 方法

レトロウイルスベクターに目的遺伝子の cDNA を挿入し、パッケージ細胞にトランスフェクションしてレトロウイルスを産生させ、Retronectin[®]を使用して目的細胞への感染を行った。

正常マウス骨髓より磁気ビーズ分離法により骨髓前駆細胞(c-kit 陽性細胞)を回収し、AML1-Evi-1 および機能欠失変異体ウイルスの導入を行った。

造血幹細胞分画を分離する実験では、c-kit 陽性細胞表面の lineage, c-kit, Fc γ RIII/II, Sca-1, CD34 各表面マーカーに蛍光色素を結合させ、BD FACSAria を用いて無菌ソーティングを行い、KSL, CMP, GMP に分離して AML1-Evi-1 ウイルスを感染させた。

レトロウイルスを感染させた細胞を回収し、メチルセルロース培地によるコロニーアッセイを行った。10 日間の薬剤選択を行い、形成コロニー数のカウントを行った。その後、コロニー形成細胞を回収して 1.5×10^4 /plate の密度にて再度コロニーアッセイを行った。この replating assay を 7 日おきに繰り返した。

ウイルスの一部は NIH3T3 細胞に感染させ、遺伝子導入による蛋白質の発現確認およびウイルス力価の測定を行った。

3. 結果

3-1. c-kit 陽性細胞への AML1-Evi-1 および各機能欠失変異体導入によるコロニーアッセイ

AML1-Evi-1 では、既報と同様にコロニーの形成が安定して繰り返されたが、機能欠失変異体(AE1- Δ ZF1, AE1- Δ ZF2, AE1-DL/AS, AE1- Δ Rep, AE1- Δ Rep Δ CtBP)ではコロニー形成の延長を認めなかった。

鏡検上は、AML1-Evi-1 では3回目の replating においても遊走能を持つ大型のコロニーが形成され、その構成細胞はマクロファージおよび顆粒球系細胞が主体であった。

以上より、AML1-Evi-1 による骨髄前駆細胞の形質転換には Evi-1 部分の第1および第2 Zn フィンガー、CtBP 結合能、抑制領域のいずれも不可欠であることが示された。

3-2. 造血幹細胞分画への遺伝子導入によるコロニーアッセイ

マウス骨髄より分離した c-kit 陽性細胞を KSL, CMP, GMP に分離し、レトロウイルスにより AML-Evi-1 あるいは MLL/ENLs を導入し、上記と同様にコロニーアッセイおよび replating assay を行った。

AML1-Evi-1 では KSL 分画においてのみ遊走能を持つ大型のコロニーが形成され、コロニー形成能の延長が認められたが、CMP および GMP ではコロニー形成の延長は認められなかった。

MLL-ENLs では、KSL, CMP, GMP いずれの分画に対してもコロニーの増加が認められた。

4. 考察

AML1-Evi-1 による骨髄前駆細胞の不死化においては、Evi-1 部分の Smad3 との結合(第1 Zn フィンガー)、CtBP との結合(CtBP 結合領域)、c-fos との結合(第2 Zn フィンガー)、TGF- β シグナル抑制(抑制領域)のいずれの機能も必須であることが示された。

Evi-1 分子については、第1 Zn フィンガーが TGF- β シグナル転写抑制と JNK の阻害に関与するように、単一のドメインが複数の分子機序に関与しているためドメイン欠失変異体の解析のみから単一の分子機能に絞り込むことは困難である。今後の解析方法として、AML1-Evi-1 あるいはその変異体を導入した細胞に対し TGF β 刺激への応答を観察することや、siRNA を用いて AP-1 の発現を落とした状況下でのアッセイ、JNK の過剰発現環境における AML1-Evi-1 および変異体導入の影響を比較するなどの手法を用いて、Evi-1 の各分子機序と AML1-Evi-1 の形質転換能の関係を解析することが可能と考えられる。

コンディショナルノックアウト法により AML1 をノックアウトした成体マウス造血細胞ではコロニー形成能の延長を認めるが、骨髄移植をすると T および B リンパ球の再構成能が失われる。また、Evi-1 のみをマウス骨髄細胞に導入して骨髄移植を行うと、約 10 ヶ月後に汎血球減少を来して死亡するが急性白血病には至らない。これらの結果を総合すると、AML1-Evi-1 の形質転換能力においては、AML1 の機能阻害および Evi-1 の機能増強に加えて、異なる分子的メカニズムが存在することが予想される。現在 Evi-1 の異所性発現によって直接活性化あるいは抑制される標的分子が明らかになっていないため、Evi-1 に関して今後さらなる知見の蓄積が必要である。

幹細胞を KSL, CMP, GMP に分離して MLL/ENLs を導入すると 3 回目のコロニーアッセイの時点で CFU-blast コロニーに近い形態のものが多数形成される。既報によると、KSL, CMP, GMP いずれの分画も、MLL/ENL の導入により不死化した細胞は表面マーカー上も mRNA 発現上も GMP 様の phenotype となる。このことより、MLL/ENL による白血化の分子機構は CMP よりも下流の分化段階におけるシグナルに関連すると推測される。

一方、我々の実験において AML1/Evi-1 による形質転換の標的が KSL に限られることから、AML1/Evi-1 により形質転換を起こす分子機構が CMP よりも上流にのみ存在するシグナルに依存している可能性があり、幹細胞維持に関わる造血関連因子と AML1-Evi-1 との関連が今後の探索課題である。

AML1-Evi-1 を導入した骨髄をマウスに移植すると、5 ないし 13 ヶ月の期間を経て白血病になることが既報で示されており、MLL/ENLs での発病期間と比較すると長期間を要している。この違いは、コロニーアッセイにおける細胞増加速度の差と一致しており、AML1-Evi-1 からの白血化に第 2 の遺伝子変異を要している可能性がある。

MLL/ENL 導入骨髄によって形質転換された骨髄をマウスに移植する実験では、FLT3 の internal tandem duplication を高発現させることで白血化が促進し発病期間が短縮される。AML1-Evi-1 においても、こうした 2nd hit 因子の検索が今後の検討課題である。