

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Evi-1 is a transcriptional target of MLL oncoproteins in hematopoietic stem cells.

Evi-1は造血幹細胞におけるMLL白血病タンパクの転写標的である

指導教員 黒川峰夫教授

東京大学医学系研究科 平成18年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

荒井 俊也

転写因子Ecotropic viral integration site-1 (Evi-1)は正常造血機能に不可欠であるほか、骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などで高頻度に活性化されていることが知られており、特に急性骨髄性白血病においては予後不良因子の一つであることが知られている。白血病細胞においてEvi-1が活性化されるメカニズムとしてEvi-1が存在する箇所の染色体(3q26)の転座が最もポピュラーであるが、同転座が無くてもEvi-1を高発現している症例が多数あり、そのような場合にEvi-1が活性化される機構は不明であった。ただし、最近の白血病検体を用いた遺伝子発現プロファイル解析の報告によると、Evi-1高発現症例には高頻度に11q23転座を有するMLL関連白血病が見られ、両者の分子生物学的に関係している可能性が示唆されていた。また、私の研究室で以前行われた実験で、MLL関連白血病における白血病キメラ遺伝子の一つMLL/ENLで不死化した骨髄細胞では、Evi-1欠失を誘導するとその増殖能が著明に低下することが判っていた。これらの事実に基づき、MLLキメラ遺伝子がEvi-1を活性化しているという仮説を立て両者の関係を解析した。

まず、幼若なマウス骨髄細胞にMLL/ENL遺伝子を導入し、半固形培地上で不死化させた後にEvi-1の発現を調べたところ、正常な骨髄の幼若細胞と比べてEvi-1の発現が亢進していることが判った。他の白血病キメラ遺伝子(E2A/HLF)を用いた実験ではこのような現象は見られなかった。また、MLLキメラ遺伝子の重要な転写標的としてHoxA9, Meis1が知られており両者の共発現によりMLLキメラ遺伝子のphenotypeをおおよそ再現することが可能であるが、この両者の共発現で不死化した骨髄においてもEvi-1の発現亢進は見られなかった。同様の解析をタモキシフェンで発現誘導可能なMLL/ENLコンストラクトを用いて行い、不死化してEvi-1の発現が亢進した細胞でMLL/ENLの効果をシャットオフすると短時間でEvi-1の発現が低下するこ

とを確認した。

次に移植の系を用いて *in vivo*における MLLキメラ遺伝子と Evi-1の関係を解析した。 *in vitro*と同様に白血病遺伝子を導入した骨髄細胞を sublethallyに照射したマウスに移植し、白血病発症を誘導した。 MLL/ENL, MLL/AF9の MLLキメラ遺伝子で誘導された白血病の細胞で Evi-1の発現を解析したところ、高頻度に Evi-1の発現亢進を認めた。一方対照の *c-myc/bcl2* 共発現により誘導された白血病細胞では、Evi-1の発現亢進は見られなかった。また、Evi-1の発現が亢進していた例では、ヒト白血病症例と同じように、Evi-1の isoformである Evi-1a と Mds1/Evi-1の双方の発現が亢進していた。

これらの結果から MLLキメラ遺伝子が直接 Evi-1の転写を活性化していると考え、プロモーターの活性化を解析した。 Evi-1a転写開始点近傍で動物種間の相同性の高い約 7kbのゲノム領域について MLL/ENLをイフェクターとしたレポーターアッセイを行い、Evi-1a転写開始点より 2 kb上流に MLL/ENLによる活性化領域があることを見出した。 Mds1/Evi-1プロモーターについても同様の解析を行い、Mds1/Evi-1転写開始点上流 1kb以内に MLL/ENLによる活性化領域があることを見出した。さらに、Evi-1を高発現している白血病細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行い、MLL/ENLがレポーターアッセイで見出された Evi-1のプロモーター領域に結合することを確認した。レポーターアッセイについては MLL/AF9をイフェクターとした場合でも同様の結果が得られた一方で、HoxA9, Meis1の共発現ではプロモーターの活性化を認めなかった。 MLL/ENLの deletion mutantを用いたレポーターアッセイで CXXC domain (DNA結合ドメインであることが知られている)を欠く mutantではプロモーターの活性化能が激減することが判り、MLL/ENLが同ドメインを介してプロモーターに結合しているものと考えられた。

白血病マウスの系において、MLL/ENLが導入されても全例で Evi-1の発現が亢進するのではないことが判った。 Evi-1の活性化の有無は MLLキメラ遺伝子の導入された細胞の違いに影響されると仮説を立て以下の実験を行なった。 MLL/ENLはマウスの幼若な細胞分画である KSLのみならず、myeloid方向に分化した CMPや GMPをも不死化させることができ、不死化した細胞の形態は表面抗原のプロファイルには差がないことが既に報告されている。この KSL, CMP, GMPの3分画を MLL/ENLで不死化させ Evi-1の発現を解析した。その結果、Evi-1の発現亢進は MLL/ENLで不死化した KSL由来細胞でのみ認められた。 HoxA9など既知の転写標的の発現には差が見られなかった。さらに、Evi-1<sup>null/flox</sup>マウスの骨髄細胞を用いて同じ実験を行ない KSL, CMP, GMP由来の不死化細胞に Cre-GFPウイルスを感染させて Evi-1をノックアウトしたところ、KSL由来の不死化細胞でより強い半固形培地上でのコロニー形成能の低下を認めた。このことから MLLキメラタンパクによる Evi-1の活性化は幼若な骨髄細胞分画で起こり、活性化された Evi-1は不死化細胞の増殖能に寄与していることが判った。

最後に公開されているマイクロアレイデータを解析して本研究と矛盾しないデータを得た。 2004年の NEJMに 300例近い急性骨髄性白血病患者の遺伝子発現プロファイルを解析した報告があるが、その中で 13例の MLLキメラ遺伝子を有する 11q23転座白血病症例に着目すると、うち 5例で Evi-1の発現が亢進していた。 5例と残り 8例の遺伝子発現パターンを GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) というツールを用いて解析した結果、5例の Evi-1発現の亢進しているサンプルで高発現傾向にある遺伝子は造血幹細胞で発現の高い傾向にある遺伝子であり、逆

に8例のEvi-1発現の低いサンプルで高発現傾向にある遺伝子は分化した前駆細胞で比較的発現の高い遺伝子であることが判った。また、マウスKSLでGMPに比べて高発現を示す遺伝子群の発現が、Evi-1高発現のMLL白血病でより高い傾向にあることも判った。

本研究により、急性骨髄性白血病細胞においてEvi-1が活性化される機構の一つにMLLキメラタンパクによる転写制御があることが明らかになった。Evi-1の発現は白血病細胞の増殖能やself-renewal活性に大きく寄与していることから、この機構が臨床例におけるMLL関連白血病の難治性に影響している可能性は十分に考えられる。また、MLLキメラタンパクによるEvi-1の活性化が幼若な骨髄細胞分画でのみ起こることは、Evi-1の活性化に必要な共因子が存在する可能性を示唆している。そのようなものがわかれば、MLL関連白血病を離れたよりuniversalな条件でのEvi-1の活性化機構を理解する手掛かりになるかも知れない。