

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 荒井 俊也

本研究は急性骨髄性白血病細胞においてしばしば高発現している転写因子 Ecotropic viral integration site-1 (Evi-1) の MLL キメラタンパクによる転写活性化機構の存在を明らかにするため、マウス骨髄細胞に白血病キメラ遺伝子を導入して遺伝子発現の変化を解析した Evi-1 プロモーターのレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降を施行したものであり、下記の結果を得ている。

1. 幼若なマウス骨髄細胞に代表的な MLL キメラ遺伝子である MLL/ENL および MLL/AF9 をレトロウイルスで導入し、半固形培地上で不死化させた後に Evi-1 の発現変化を解析した。その結果、正常な骨髄幼若細胞と比べて Evi-1 の発現が亢進していることが示された。他の白血病キメラ遺伝子 (E2A/HLF)、および MLL キメラ遺伝子の重要な転写標的である HoxA9, Meis1 の共発現によって不死化された細胞ではこのような Evi-1 の発現亢進を認めなかった。Tamoxifen で発現誘導可能な MLL/ENL-ER コンストラクトを用いた同様の実験により MLL/ENL のシャットオフにより Evi-1 の発現は短時間で低下することが示されたことから、Evi-1 は MLL キメラ遺伝子によって転写活性化されていると考えられた。
2. 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。その結果、MLL キメラ遺伝子で誘導された白血病細胞では高頻度に Evi-1 が発現亢進することが示された。
3. Evi-1 の 2 つの isoform である Evi-1a と Mds1/Evi-1 のプロモーター活性化をレポーターアッセイで解析した。その結果、Evi-1a 転写開始点より 2 kb 上流、Mds1/Evi-1 転写開始点上流 1kb 以内に MLL/ENL, MLL/AF9 による活性化領域があることが示された。クロマチン免疫沈降により、MLL/ENL タンパクがこの Evi-1 活性化領域に結合することが示された。
4. MLL/ENL の deletion mutant を用いたレポーターアッセイで DNA 結合ドメインである CXXC domain を欠く mutant でプロモーターの活性化能が激減しており、MLL/ENL が同ドメインを介して活性化領域に結合していると考えられた。
5. マウス骨髄の KSL, CMP, GMP 分画を MLL/ENL で不死化させて Evi-1 の発現を解析した結果、最も幼若な KSL を起源とする不死化細胞でのみ Evi-1 の発現が亢進することが示された。
6. Evi-1^{null/flox} マウスの KSL を MLL/ENL で不死化し Cre-GFP ウイルスで Evi-1 をノックア

ウトしたところ半固形培地上でのコロニー形成能の著明な低下を認めた。このことから、活性化された Evi-1 が不死化細胞の増殖能に寄与していることが示された。

7. 公開されている急性骨髄性白血病患者のマイクロアレイデータを解析し、その結果 Evi-1 高発現と低発現の MLL キメラ白血病における遺伝子発現傾向が、それぞれ未分化な造血幹細胞と分化した前駆細胞に似る傾向があることが示された。

以上、本論文は幼若な骨髄細胞において MLL キメラタンパクが直接に Evi-1 の発現制御に寄与していることを明らかにした。本研究は MLL 関連白血病の難治性機構の解明や、正常造血細胞における Evi-1 の転写制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。