

審査の結果の要旨

氏名 吉識 由実子

本研究は、難治性白血病において高発現することが知られている Evi-1 遺伝子の白血病発症機序を明らかにするため、半固形培地におけるマウス骨髄単核球不死化の系を用いて Evi-1 の機能解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

- 1 . Evi-1 の各機能ドメイン (第 1 Zinc finger ドメイン、第 2 Zinc finger ドメイン、CtBP (C-terminal binding protein) 結合ドメイン、抑制ドメイン、acidic ドメイン) を欠失する Evi-1 ドメイン欠失変異体を作製した。また、Evi-1 と co-repressor である CtBP との結合が阻害される Evi-1 DL/AS 変異体、Evi-1 の DNA への結合が阻害される Evi-1 R205N 変異体を用意した。これらの変異体を 3T3 細胞へ強制発現させ、ウェスタン・ブロッティング法にて蛋白発現を確認した。また、Evi-1 DL/AS は、免疫沈降ウェスタン・ブロッティング法にて CtBP との結合が Evi-1 と比較して減弱することを確認した。
- 2 . Evi-1 ドメイン欠失変異体を用いて細胞不死化能を検証した結果、第 1 Zinc finger ドメイン、第 2 Zinc finger ドメイン、CtBP 結合ドメイン、抑制ドメインを欠失するドメイン欠失変異体では細胞不死化能を認めず、Evi-1 導入による骨髄単核球の不死化には acidic ドメインを除く全てのドメインが必要と考えられた。
- 3 . Evi-1 DL/AS 変異体、Evi-1 R205N 変異体を用いて細胞不死化能を検証した結果、どちらも細胞不死化能を認めず、Evi-1 導入による骨髄単核球の不死化には CtBP の Evi-1 への結合、Evi-1 の DNA への結合が必要と推測された。
- 4 . Evi-1 導入による不死化細胞に、CtBP に対する shRNA をレトロウイルスにより導入し CtBP の遺伝子発現を抑制した結果、形成コロニー数は有意な変化を認めなかった。これにより、CtBP と Evi-1 の結合は骨髄単核球の不死化に関与するが、一旦不死化した細胞の維持増殖には大きな影響を及ぼさないと考えられた。
- 5 . Evi-1 導入による不死化細胞に c-Jun に対する shRNA をレトロウイルスにより導入し、c-Jun の遺伝子発現を抑制した結果、形成コロニー数は有意に抑制された。これにより、Evi-1 導入による不死化細胞の維持増殖には c-Jun が重要と考えられた。

以上、本論文はマウス骨髄単核球の細胞不死化において第 1 Zinc finger ドメイン、第 2 Zinc finger ドメイン、CtBP 結合ドメイン、抑制ドメインが必要であることを明らかにした。また、Evi-1 導入による不死化細胞の維持増殖には c-Jun を介した細胞増殖作用が重要である可能性が示された。以上の結果から CtBP, c-Jun の関与する分子経路が Evi-1 関連白血病の新たな治療標的となりうると考えられた。この結果は予後不良白血病の病態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。