

論文の内容の要旨

論文題目 Evi1 Represses PTEN Expression by Interacting with Polycomb Complexes and Activates PI3K/AKT/mTOR Signaling

和訳 Evi1 はポリコム複合体との結合を介して PTEN の発現を抑制し、PI3K/AKT/mTOR シグナルを活性化する

指導教員 黒川 峰夫 教授

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 吉見 昭秀

Evi1 (Ecotropic viral integration site1) は急性骨髄性白血病 (AML), 慢性骨髄性白血病 (CML), 骨髄異形成症候群 (MDS) などの骨髄系腫瘍の病態形成に重要な役割を果たす白血病がん遺伝子である。特に AML においてはその過剰発現が t(8;21), t(15;17) などの染色体転座に特徴づけられる代表的な疾患単位と並んで一大クラスターを定義し、しかも非常に予後不良な臨床像を呈することが、近年の AML 臨床検体を用いた大規模網羅的遺伝子発現解析から明らかにされた。Evi1 は 2 つのジンクフィンガードメインをもつ転写因子として知られ、その標的遺伝子として GATA2 と PBX1 が報告されている。今回私は、Evi1 の新たな機能を解明し、そこから見出される新規分子標的療法の可能性を模索する目的で研究を行った。

まず、Evi1 の新たな標的遺伝子を探索する目的で、網羅的遺伝子解析を行った。Evi1 は G9a や SUV39H1 などのヒストンメチル化酵素と結合することが最近報告され、これらの酵素は一般に転写抑制に働くことから、Evi1 は標的遺伝子の転写を抑制する可能性が示唆されたが、実際に抑制性の標的遺伝子は知られていなかったため、特に Evi1 の抑制性標的遺伝子に着目した。マウスの骨髄細胞に Evi1 をレトロウイルスで導入し、短期間での遺伝子発現変化を解析したところ、がん抑制遺伝子である PTEN の発現が低下していることを見出した。この所見は、前述の大規模網羅的遺伝子発現解析のデータにおいても、Evi1 と PTEN の発現量が有意に逆相関することから裏付けられた。さらに、東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科を受診した白血病患者の患者検体において Evi1 と PTEN の発現量を定量 PCR により解析した。東京大学医学部附属病院を受診した AML 患者あるいは CML 患者のうち、骨髄

検体が入手可能であったそれぞれ 57 例および 44 例を対象とした。なお、この研究については東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得、また「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示、平成 13 年 4 月施行）に則り文書による同意が得られた患者検体を用いて解析した。その結果、AML, CML 双方において、Evi1, PTEN 両者の発現は統計学的有意差をもって逆相関することがわかった。また、CML においては病期が慢性期から加速期、急性転化へと進んだ症例において、Evi1 の発現が高くなると同時に PTEN の発現が低下する傾向が認められ、CML 病勢の進展にも PTEN/AKT/mTOR シグナルの活性化が関与する可能性が示唆された。

そこで、次に PTEN の転写抑制が Evi1 の直接の作用であるか否かを検討するためにレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ (EMSA) およびクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、これらの実験から、Evi1 はその第 1 ジンクフィンガードメインを介して PTEN の promoter 領域に直接結合することを確かめた。

PTEN の下流には AKT/mTOR pathway が存在し、種々のがんにおいて同シグナルは亢進することがある。PTEN は同シグナルを抑制的に制御することが知られており、実際に Western Blot を用いた評価では、Evi1 の導入により骨髄細胞では PTEN がタンパクレベルでも低下し、同時に AKT と mTOR がリン酸化し、活性化していることが確かめられた。この活性は、他のサブタイプの白血病発症の原因となる AML1/ETO, E2A/HLF, あるいは PML/RAR α 融合遺伝子を導入した比較対照の骨髄細胞よりも亢進していた。また、Evi1 を導入した骨髄細胞において EZH2 をノックダウンすると PTEN の発現が上昇し、AKT/mTOR シグナルが不活化した。Evi1 を骨髄細胞に導入することによって生じる生物学的影響の一つとして細胞周期の変化を観察したところ、Evi1 導入細胞ではコントロールと比較して S/G2M 期の cycling cell の割合が増加し、mTOR 阻害剤である Rapamycin を加えることでその効果が相殺されることがわかった。このことから、Evi1 は AKT/mTOR シグナルを介して cell cycling を亢進させ、細胞増殖に関与することが示唆された。

上記の結果から、Evi1 高発現白血病細胞は mTOR 阻害剤である Rapamycin の感受性が亢進していることが予想された。この点を検討するために、まず *in vitro* において AML1/ETO, E2A/HLF, PML/RAR α , mock あるいは Evi1 をレトロウイルスを用いて導入した骨髄細胞を半固形培地で培養し、Rapamycin あるいは LY294002 (PI3K 阻害剤) を加えて比較すると、Evi1 を導入した細胞は他の白血病キメラ遺伝子を導入した細胞と比較して良好な感受性を示した。次に、*in vivo* での rapamycin の効果を検討するために Evi1 高発現白血病マウスモデルを構築した。Evi1 をレトロウイルスで導入した骨髄細胞を非致死量放射線照射 (5.25Gy) したレシピエントマウスに骨髄移植し観察したところ、すべてのマウスは半年から 1 年の間に急性骨髄性白血病 (AML) を発症して死亡した。そこで、白血病マウスから採取した白血病細胞を新たな非致死量放射線照射マウスに移植し、Rapamycin を連日腹腔内投与したところ、溶媒のみを投与したコントロールマウスと比較して有意にその生存が延長した。一方、ともに AML を発症することが知られている TEL/PDGFR-AML1/ETO, あるいは AML1 mutant

(S291fsX300) を骨髄に導入して構築した AML マウスモデルにおいては Rapamycin を投与しても生存延長効果が認められなかった。この結果から、*in vivo* で Evi1 高発現白血病に対して mTOR 阻害剤が特異的にその増殖を抑制することが示された。

さらに、レポーターアッセイおよび ChIP アッセイにより、Evi1 による PTEN の転写制御にはポリコーム複合体が関与する所見が得られた。ポリコーム複合体はヒストン修飾 (H3K27 トリメチル化や H2K119 ユビキチン化) を介してエピジェネティックに多数の標的遺伝子の転写を抑制することが知られ、発達や幹細胞制御、発がんへの関与など様々な機能を有することが近年報告されている。レポーターアッセイにより、Evi1 はポリコーム複合体の代表的な構成因子の一つである EZH2 と相乗的に PTEN のプロモーター活性を抑制することがわかった。また、ChIP アッセイでは Evi1 とともにポリコーム複合体の主要な構成因子である EZH2, SUZ12, BMI1 が PTEN の promoter 領域に見出され、ポリコーム複合体の作用と思われる H3K27 のトリメチル化についても同領域で著明に亢進していることがわかった。また、AML の 5 検体を用いて ChIP アッセイを行ったところ、Evi1 を高発現している検体において同様の結果が得られた。

上記の所見から、Evi1 はポリコーム複合体と結合することにより、ポリコーム複合体を PTEN の promoter 上にリクルートする可能性が考えられた。そこで免疫沈降の実験を行った結果、ポリコーム複合体に属する複数のタンパク質、具体的には PRC2 (Polycomb Repressive Complex2) に属する EZH2, SUZ12, EED, および PRC1 に属する BMI1, RING1, RING2, HPH2 が Evi1 タンパク質と結合することが確かめられた。これらの結合は、免疫染色において Evi1 とポリコーム複合体の構成因子のそれぞれが核内に共在することからも裏付けられた。マウスの骨髄細胞にレトロウイルスを用いて Evi1 を強制発現させると細胞は不死化し、増殖し続けることが知られているが、RNAi の手法を用いて Evi1 を高発現する不死化骨髄細胞における EZH2, SUZ12, EED の発現をそれぞれノックダウンすると、PTEN の発現は脱抑制および下流の AKT/mTOR シグナルの抑制が観察され、また細胞の増殖能は著明に減少した。このことから、Evi1 とポリコーム複合体の interaction が Evi1 による PTEN/AKT/mTOR シグナルの制御および、Evi1 による骨髄細胞の transform に必須であることが示唆された。

以上をまとめると、Evi1 はポリコーム複合体との interaction を介しヒストン修飾を誘導し、エピジェネティックに PTEN の転写を抑制することが示唆された。さらに、PTEN の抑制は下流の AKT/mTOR シグナルの亢進につながり、細胞周期の亢進を介して細胞増殖へと導くと考えられた。これらの結果から mTOR 阻害剤である Rapamycin をはじめとする薬剤、あるいはポリコーム阻害剤 (DNZep) 等は、予後不良白血病である Evi1 高発現白血病に対して非常に有望な分子標的療法となる可能性が示唆され、実際に今回白血病マウスモデルを用いた検討から *in vivo* での Rapamycin の有効性が示された。また、今回用いた Evi1 高発現白血病マウスモデルはヒトの白血病細胞内での Evi1 の機能をよく反映しているものと考えられ、今後の Evi1 高発現白血病の解析を進める上で、大変有用なツールとなるものと考えられた。