

## 審査の結果の要旨

氏名 吉 見 昭 秀

本研究は白血病発症の過程において重要な役割を演じていると考えられるがん遺伝子 Evi1 の機能を明らかにし、そこから治療標的分子を見出すため、マウスの骨髄細胞に Evi1 の発現を誘導する系やヒトの白血病検体を用いて Evi1 による転写制御やエピジェネティクスとの関わりを検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. Evi1 を強制発現させたマウスの骨髄細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、Evi1 ががん抑制遺伝子 PTEN の発現を抑制することを同定した。Luciferase reporter assay、gel shift assay、クロマチン免疫沈降などの promoter assay により、Evi1 は直接 PTEN の promoter に結合して転写制御することが示された。また、上記の assay により、Evi1 はそのコンセンサス配列に類似した PTEN promoter 上の配列 (5'-AAAAGATAA-3') に結合することを同定した。
2. Evi1 を強制発現させたマウスの骨髄細胞においては、PTEN タンパク質の発現が低下するとともに、その下流の AKT、mTOR のリン酸化が亢進し、活性化することを western blot で確認した。mTOR の活性化を介した生物学的効果として、Evi1 による細胞周期の亢進を確認した。この効果は mTOR 阻害薬であるラパマイシンを投与することで解除された。以上より、Evi1 高発現骨髄細胞のラパマイシンに対する感受性が亢進していることが予想され、実際に colony assay の系でラパマイシンを添加したところ、対照の細胞と比較して Evi1 高発現骨髄細胞はラパマイシンの増殖抑制効果が有意に高いことが確認された。
3. ラパマイシンの白血病細胞に対する in vivo での効果を検討するため、Evi1 高発現白血病マウスモデルを構築した。このモデルから採取した白血病細胞を正常マウスに 2 次移植し、連日ラパマイシンを投与した結果、投与しなかった群と比較して投与群では有意にその生存が延長した。コントロールとして用いた他の白血病モデルにおいてはラパマイシンの効果が確認されなかった。以上のことから、Evi1 高発現白血病に対してラパマイシンを含めた PI3K/AKT/mTOR シグナル阻害薬が有効である可能性が示唆された。
4. Evi1 による PTEN の転写制御が実際にヒトの白血病細胞にも存在するか否かを検討するために、東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科を受診した急性骨髄性白血病 (57 人)、慢性骨髄性白血病 (44 人) の白血病細胞における Evi1 と PTEN の発現量を real-time PCR により定量した。その結果、双方において Evi1 と PTEN の発現量が負に相関することが示され、マウスの実験で示された知見がヒトの白血病細胞においても当てはまる可能性が示唆された。
5. Evi1 による PTEN の転写制御における共役因子を探索するため、特に転写を抑制する働きをもつヒストン修飾因子に注目して、その関与を検討したところ、ポリコーム複合体に属

する EZH2 が Luciferase reporter assay において Evi1 と協調して PTEN の promoter 活性を抑制することがわかった。また、クロマチン免疫沈降によっても Evi1 とポリコーム複合体の構成因子 (EZH2、SUZ12、BMI1) およびポリコーム複合体によりもたらされるヒストン H3 リジン 27 のメチル化修飾が PTEN promoter 上に enrich されることが確認された。さらに、Evi1 と複数のポリコーム複合体構成因子 (EZH2、SUZ12、EED、BMI1、RING1、RING2、HPH2) がタンパク-タンパク結合することが示された。このことから、Evi1 はポリコーム複合体をリクルートすることにより PTEN の発現を抑制するものと考えられた。

6. Evi1 を高発現させたマウスの骨髄細胞において RNA 干渉の手法を用いて EZH2 をノックダウンしたところ、PTEN の発現量が restore され、AKT、mTOR の活性が抑制された。また、これらの細胞は半固形培地上で serial replating capacity を失った。SUZ12、EED のノックダウンでもほぼ同様の結果が得られた。このことから、ポリコーム複合体の阻害薬が Evi1 高発現白血病に対する治療薬となり得ることが示された。

以上、本論文は Evi1 高発現骨髄細胞において、Evi1 がポリコーム複合体をリクルートすることで PTEN の発現を抑制し AKT/mTOR を活性化することを明らかにした。本研究は Evi1 の新たな標的遺伝子の探索から下流シグナルの同定、転写制御に関わるクロマチン修飾因子の発見へとつながり、予後不良と言われる Evi1 高発現白血病に対する複数の治療標的を同定するのみならず、実際にマウスモデルにおける阻害薬の効果を示したものである。ヒト白血病の治療成績向上に結びつき得る貴重な研究成果であることから、学位の授与に値するものと考えられる。