

## 【別紙 1】

### 論文の内容の要旨

論文題目            **Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells**

造血幹/前駆細胞及び白血病細胞において **Pbx1** は **Evi-1** の  
下流標的遺伝子である

氏     名            島辺   宗健

#### 【はじめに】

白血病は血球もしくは骨髄細胞のガンであり、白血球の増殖で特徴づけられる。白血病は、急性骨髄球性、慢性骨髄球性、急性リンパ球性および慢性リンパ球性に大別される。**Evi-1** (*ecotropic viral integration site-1*)は、マウスに白血病を引き起こす遺伝子として同定され、急性骨髄球性白血病 (AML) の 8-10% で高発現が認められている。**Evi-1** が位置する染色体 3q26 周辺の染色体異常で高発現が認められる。加えて、正常核型においても高発現が認められ、治療抵抗性を示す予後不良因子として考えられている。**Evi-1** は DNA 結合 **Zinc finger** ドメインを有しているにも関わらず、下流標的遺伝子の同定はわずかであり、初期造血発生における **Gata2** の制御が近年報告されたのみであった。本研究では、私は **Evi-1** の下流標的遺伝子同定のために標的候補遺伝子を解析し、**Evi-1** が **Pbx1** の **promoter** 領域に結合し転写制御していることを見出した。また、**Evi-1** による形質転換細胞の増殖に **Evi-1-Pbx1** パスウェイが関与していることを明らかにした。

#### 【材料および方法】

##### ・標的候補遺伝子 **Pbx1** の同定

5-FU を投与した野生型 C57BL/6 の雌マウスから骨髄造血幹/前駆細胞を採取し、レトロウイルスにより遺伝子を導入した。mock または **Evi-1** を遺伝子導入された細胞 (GFP 陽性細胞) のみを FCM に

て単離し、RNA を抽出し標的候補遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法にて比較した。また、Evi-1 欠損マウスの胎仔肝臓に含まれる造血細胞における Pbx1 の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。

#### ・ Evi-1 による Pbx1 の発現制御解析

Pbx1 の 5' 端上流側ゲノム DNA 領域をレポーターベクターに挿入し、レポーターアッセイを行った。挿入領域を変えることにより EVI-1 による制御領域を解析した。また、様々な EVI-1 変異体を用いて、発現制御に必要な Evi-1 の機能ドメインを解析し、AP-1 シグナルとの関わりを調べるために c-Jun 及び PMA を用いて解析した。さらに Chromatin Immunoprecipitation 法 (ChIP 法) を用いて細胞内における EVI-1 のゲノム上 PBX1 promoter 領域への結合を解析した。

#### ・ 形質転換細胞及び Evi-1 欠損細胞を用いた Evi-1- Pbx1 パスウェイの機能解析

レトロウイルスにより Evi-1 遺伝子を導入された骨髄造血幹/前駆細胞の *in vitro* における形質転換能を colony replating assay にて解析した。また、その形質転換細胞において Pbx1 に対する shRNA を用いた発現抑制による、コロニー形成能に対する影響を検討した。一方で、Evi-1 欠損 P-Sp (Para-aortic splanchnopleural) 細胞を用いて、Pbx1 遺伝子の導入による CFC (Colony forming capacity) の回復を検討した。

### 【結果】

#### ・ Pbx1 発現は Evi-1 による転写制御を受ける

レトロウイルスによって Evi-1 遺伝子を導入された細胞は FCM によって高純度で単離された。定量的 RT-PCR による解析から Pbx1 の発現上昇が認められた。また、胎仔肝臓に含まれる造血細胞での Pbx1 の発現は野生型マウスに比べて Evi-1 欠損マウスにおいて有意に低く、成体骨髄造血幹細胞の報告と一致した。Pbx1 が Evi-1 により直接的に制御されているかを解析するために、マウス Pbx1 の 5' 端上流側ゲノム DNA 領域をレポーターベクターに挿入し、レポーターアッセイを行った。様々な長さのゲノム DNA を挿入して解析した結果、Pbx1 の翻訳開始点から上流 0.5kb の領域を介して、Evi-1 が Pbx1 の転写制御をしていることが明らかとなった。

#### ・ Pbx1 発現に必要な Evi-1 の機能ドメインの同定

Evi-1 は様々な機能ドメインを有しており、N 端側及び C 端側の Zinc finger ドメインは DNA 結合に重要である。また、Smad3、CtBP、JNK など様々なタンパク質と相互作用することが知られている。様々な EVI-1 変異体を用いてレポーターアッセイを行った結果、N 端側の Zinc finger ドメインまたは C 端側の Zinc finger ドメインを欠損した EVI-1 の変異体ではレポーター活性の上昇が認められなかったことから、これらのドメインが Pbx1 の発現制御に必要なものであると考えられた。しかしながら、結合 DNA 配列の同定には至らず、C 端側の Zinc finger ドメインを介した AP-1 シグナルの関与も否定された。

#### ・ HEL 細胞において EVI-1 は転写調節因子として PBX1 promoter に結合する

ヒト白血病細胞株 HEL において shRNA による EVI-1 の発現抑制により、PBX1 の mRNA 及びタンパク質の発現低下が認められた。このことから、HEL 細胞においても PBX1 は EVI-1 により正に制御されていると考えられた。細胞内でゲノム DNA の PBX1 promoter 領域に EVI-1 が結合しているのかを調べるために、この HEL 細胞株を用いて ChIP 法にて検討した。その結果、レポーターアッセイで同定された Evi-1 による制御領域 (マウス) と相同な領域 (ヒト) に、EVI-1 が結合することがわかった。

・ **Pbx1** は **Evi-1** による形質転換細胞の **efficient propagation** に必要である

マウス骨髄由来造血幹/前駆細胞に **Evi-1** を強制発現させ、半固形培地にて培養すると、コロニーを形成する。mock 導入細胞が 3 ラウンド目でコロニー形成ができなくなるのに対し、**Evi-1** を強制発現させた細胞ではコロニー形成が持続し、形質転換が認められる (図 1(a))。Mock 導入細胞は分化した形態を示し、マクロファージのみが観察されるのに対し、**Evi-1** を強制発現させた細胞では骨髄芽球異形成を伴う未熟な骨髄性の細胞が認められた。3 ラウンド目以降の **Evi-1** 強制発現細胞において shRNA により **Pbx1** の発現を抑制すると、コロニー形成数が減少した (図 1(b))。しかしながら、In vitro において形質転換をすることが知られている **E2A/HLF** 及び **AML1/ETO** を強制発現させた細胞では、この shRNA によるコロニー形成数の減少は認められなかった。以上のことから、**Pbx1** は **Evi-1** による形質転換の維持に必要であると考えられた。一方、**Evi-1** 遺伝子の導入により回復される、**Evi-1** 欠損 **P-Sp** 細胞の **CFC** は、**Pbx1** 遺伝子の導入では認められなかった。

・ **AML 患者の白血病細胞における EVI-1 と PBX1 の発現相関**

既報の 285 例の **AML** 患者由来白血病細胞におけるマイクロアレイデータを解析したところ、**EVI-1** と **PBX1** の発現に正相関が認められた (Table 1)。また、東京大学医学部附属病院の **AML** 患者由来白血病細胞を用いた独立した検討においても、正相関の傾向が認められた。

**【考察】**

**Evi-1** 高発現が予後不良を示す報告は続いており、そのメカニズム解明の臨床的意義は高い。近年、その分子メカニズムとしてエピジェネティック制御因子の **HDACs**、**HMTs**、**micro RNAs** との関係が報告されてきている。標的遺伝子の解析でも進展がみられ、**PTEN**、**SIRT** が同定された。今回、私は **Evi-1** を強制発現したマウス骨髄由来造血幹/前駆細胞を用いて、**Pbx1** が **Evi-1** により上方調節を受ける遺伝子であることを同定した。その発現制御には **Evi-1** の N 末側及び C 末側 **Zinc finger** ドメインが関与しており、**Pbx1 promoter** 領域 (-0.5 kb 領域) に結合して制御していた。また、**Pbx1** 発現を抑制すると **Evi-1** によって形質転換した細胞のコロニー形成能が減弱することを明らかにした。さらに、**AML** 患者由来の白血病細胞を用いた解析から、ヒト白血病細胞においても **EVI-1** と **PBX1** の発現が正相関していることを示した。この結果は **Evi-1** が有する白血病細胞の増殖・維持に **Pbx1** が寄与していることを示す重要な所見と考えられた。**Pbx1** は **ALL** で発見された(1;19)転座による **E2A-Pbx1** のキメラ遺伝子として同定され、**Hox** 及び **Meis** タンパクの co-factor として転写制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。胎仔造血細胞での **Pbx1** 発現及び、**Pbx1** が造血幹細胞の自己複製に関与することが報告され、胎仔造血における **Evi-1-Pbx1** パスウェイの関与が考えられたが、**Pbx1** 遺伝子の導入では **Evi-1** 欠損 **P-Sp** 細胞の **CFC** の回復は認められず、**Evi-1** の他の標的遺伝子が必要であると考えられた。また、白血病化において **Evi-1** と **Hox** が協調して働くことから、これら 3 者に協調が考えられた。加えて、**Evi-1** 及び **Pbx1** は造血器腫瘍を含む複数の癌腫で高発現が認められていることから、**Evi-1-Pbx1** パスウェイは様々な組織での癌細胞の増殖に寄与していると考えられた。

Table 1. 急性骨髄性白血病患者 285 例における EVI-1 と PBX1 発現間でのピアソンの相関係数

<i>PBX1</i> probe	<i>EVI-1</i> probe: 221884_at		<i>EVI-1</i> probe: 215851_at	
	r	P	r	P
205253_at	0.156	0.008	0.107	0.072
212148_at	0.135	0.023	0.040	0.500
212151_at	0.139	0.019	0.032	0.588
217617_at	0.125	0.035	0.077	0.195

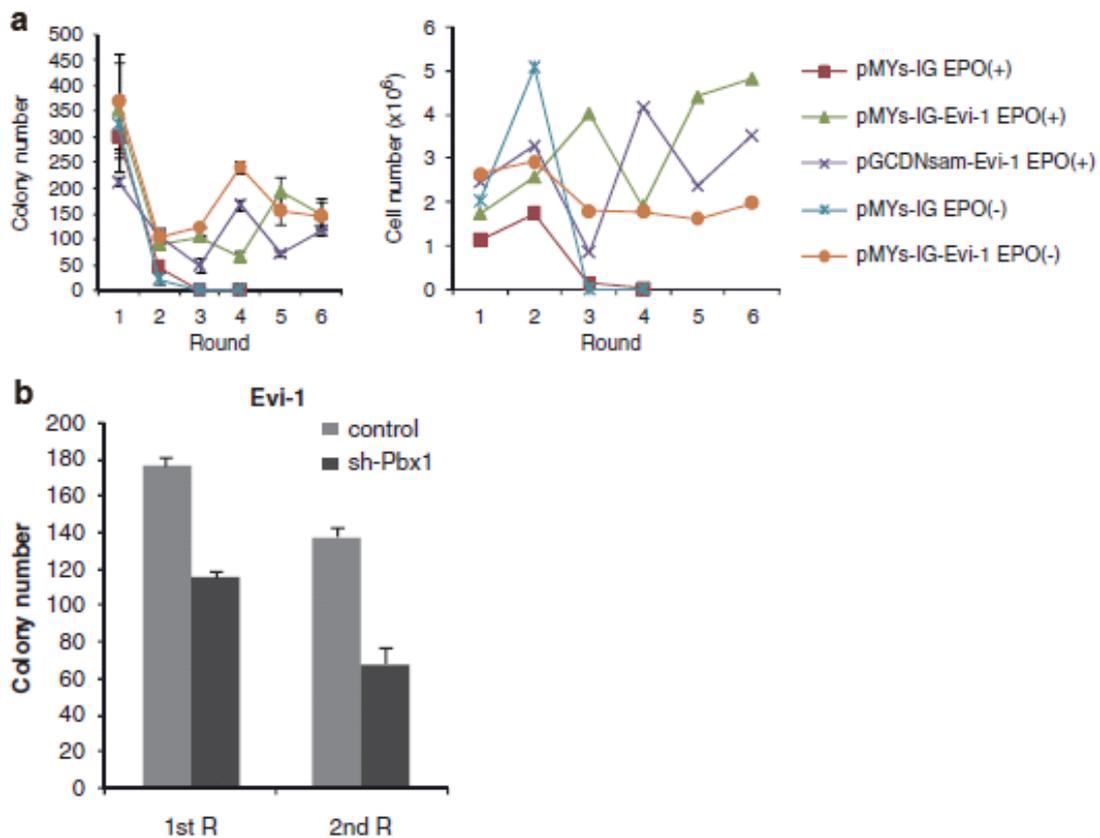


図 1

(a) Evi-1 を強制発現させた造血幹/前駆細胞は mock と比較しコロニー形成が持続した。

(b) Evi-1 により形質転換された細胞は Pbx1 に対する shRNA (sh-Pbx1)によりそのコロニー形成数が低下した。