

【別紙2】

審査の結果の要旨

氏名 島辺 宗健

本研究は、難治性白血病の発展・進展において重要な役割を果たしていると考えられる白血病関連転写因子Ecotropic viral integration site 1 (Evi-1)について、その転写標的因子の解析を試みたものである。既報の標的遺伝子をもとに標的遺伝子の絞り込み、Evi-1による転写制御機構の解析、半固形培地でコロニーアッセイをする系を用いた細胞増殖に対する検討を行っており、下記の結果を得ている。

1. Evi-1の下流標的候補遺伝子を絞り込む目的で、正常な造血幹/前駆細胞にレトロウィルスを用いてEvi-1遺伝子を導入し、高純度で単離された細胞において定量的PCRに解析からPbx1の発現上昇を認めた。また、Evi-1ノックアウトマウスの胎仔肝臓細胞においても野生型と比べてPbx1発現の低下が認められ、生体骨髓造血幹細胞の報告と一致した。Pbx1の5'端上流側ゲノムDNA領域を用いてレポーターアッセイを行った結果、Pbx1の翻訳開始点から上流0.5kbの領域を介して、Evi-1がPbx1の転写制御を行っていることが示された。

2. Pbx1の転写制御に必要なEvi-1遺伝子の機能領域を同定する目的で、レポーターアッセイにおいて様々なEvi-1変異体を共に一過性発現させて実験を行い、Pbx1の転写制御にはN端側のZinc fingerドメイン及びC端側のZinc fingerドメインが重要であることが示された。Zinc finger領域はDNA結合能を持つことから、既報のEvi-1結合配列の検索、結合可能性のある領域への変異導入を行ったが、レポーター活性に顕著の低下は認められず、Evi-1の結合DNA配列の同定には至らなかった。また、C端側のZinc fingerドメインはAP-1を活性化することから、AP-1を介したPbx1発現の可能性を検討したが、c-Jun及びホルボールエステル（AP-1活性化薬剤）によるレポーター活性の上昇は認められなかった。Evi-1のZinc finger領域を介した転写制御機構は、①未知の結合配列を介してDNAに結合している、α他の転写共役因子と複合体を形成している、という可能性が考えられた。

3. ヒト白血病細胞株HELではEVI-1、PBX1ともに発現が認められ、EVI-1に対するshRNAの導入によりPBX1の発現低下を認め、HEL細胞株においてもEVI-1によるPBX1発現制御の存在が示された。細胞内においてゲノムDNAのPBX1 promoter領域にEVI-1が結合しているのかを検討するために、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。その結果、レポーターアッセイで同定されたEvi-1による制御領域と相同な領域（ヒト）に、EVI-1が結合することが示された。

4. Evi-1ノックアウトマウスのP-Sp領域の細胞を半固形培地で培養すると野生型と比べて著しく低いコロニー形成能を示し、Evi-1遺伝子を導入することでコロニー形成能が回復することが知られている。同様の手法で、Evi-1の下流標的遺伝子Pbx1をレトロウィルスによって導入したが、コロニー形成能の回復を認めなかった。Pbx1以外の下流標的遺伝子の発現上昇が必要である可能性が考えられた。

5. 正常な造血幹/前駆細胞にレトロウィルスを用いてEvi-1遺伝子を導入して、半固形培地で培養をすると、少なくとも6ラウンドの継代を重ねてもコロニー形成が持続され、骨髓芽球異形成を伴う未熟な骨髓性の細胞が認められ、これはin vitroで再現されたEvi-1高発現の形質転換細胞と考えられた。Mock群でコロニー形成が消滅する3ラウンド目以降のEvi-1導入細胞にshRNAによりPbx1の発現を抑制すると、コロニー形成数の減少が認められた。一方、in vitro形質転換能をもつAML1/ETOまたはE2A/HLF遺伝子を導入した細胞においては、

コロニー形成数の減少は認められなかった。Evi-1高発現の白血病細胞の増殖にEvi-1-Pbx1パスウェイが寄与していることが示された。

6. 既報の285例の急性骨髄性白血病患者由来の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。また、東京大学医学部附属病院の急性骨髄性白血病患者由来の白血病細胞を用いた独立した検討においても、正相関傾向が認められた。

以上、本論文は定量的PCR法による標的遺伝子の絞り込み、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法による転写制御解析、半固形培地上でのin vitro形質転換細胞を用いた解析及び臨床検体を用いた解析から、造血幹/前駆細胞及び白血病細胞においてPbx1がEvi-1の下流標的遺伝子であることを明らかにした。白血病発症及びその進展に重要な役割を担う造血系転写因子の標的遺伝子ネットワークを解明することは、造血細胞の悪性化との関係を明らかにする上で非常に重要であり、本研究は正常細胞及び白血病細胞におけるEvi-1-Pbx1パスウェイに関する知見を深めた点で、難治性白血病の発症・進展の分子機構解明に重要な貢献をなすものと評価する。よって、学位の授与に値すると判断する。