

## 論文の内容の要旨

論文題目 hairy and enhancer of split 1 (Hes1)による白血病発症機序の解析

氏名 内田智之

Hairy and enhancer of split 1 (Hes1)は basic helix loop helix (bHLH)型転写抑制因子で Notch シグナルの標的遺伝子として知られている。Hes1 は、他の活性型 bHLH 型転写因子のプロモーターに結合することで、その転写を抑制し、主として細胞の分化抑制に働く。*Hes1*を導入したマウス骨髄細胞は未分化性を維持し、IL-3 依存的に増殖する細胞株になる。また、予後の悪い予後の悪い非小細胞性肺癌や神経膠腫、漿液性卵巣癌で *HES1* の発現量が高い。T 細胞性急性リンパ性白血病の約 50%で Notch シグナルの活性型変異が認められる。活性型 Notch シグナルの下流で *HES1* の発現が上昇する。

当研究室では、慢性骨髄性白血病の急性転化症例の約 40%で *HES1* の発現が上昇していることを明らかにした。この発現上昇は慢性期では認められないため、*HES1* が慢性骨髄性白血病の急性転化に寄与することが考えられた。実際、マウス骨髄移植モデル (マウス BMT モデル)において、慢性骨髄性白血病患者で特徴的に検出される *BCR-ABL* と *Hes1* は協調して慢性骨髄性白血病の急性転化に類似した白血病を発症させることを示した。

本研究の目的は慢性骨髄性白血病急性転化以外の白血病における *HES1* の役割を明らかにすることである。白血病患者骨髄サンプルにおける *HES1* の発現量を解析した。*HES1*

と *BCR-ABL* 以外の遺伝子変異が協調して白血病に関与するかどうかをマウス BMT モデルを利用して検討した。

現在、白血病発症の機構として two hit theory が提唱されている。その説によると、白血病の発症には、細胞の増殖を誘導あるいはアポトーシスを抑制する Class I 変異と細胞の分化を抑制する Class II 変異の 2 つが必要である。Class I 変異には *BCR-ABL*、*FLT3-ITD*、*JAK2* の活性化変異などがあり、Class II 変異には *AML1-ETO*、*PML-RAR $\alpha$*  などがある。それぞれ Class I 単独変異では骨髄増殖性疾患が、Class II 単独変異では骨髄異型成症候群が発症するが白血病は発症しない。Class I 変異と Class II 変異の 2 つが組み合わさることによって白血病が発症する。実際の白血病患者では、*FLT3-ITD* と *PML-RAR $\alpha$*  や *C-KIT* と *AML1-ETO* などの一定の組み合わせが高頻度に認められる。骨髄細胞が未分化能と増殖能の両方を獲得することが白血病発症に必要である。

*Hes1* が導入されたマウス骨髄細胞は、未分化な状態を維持し IL-3 依存的に増殖する細胞株になる。*Hes1* は細胞に未分化能を付加する遺伝子であると考えられる。*Hes1* は細胞の増殖能を付加する Class I 変異の *BCR-ABL* と協調して白血病を発症させる。*Hes1* は Class I 変異と協調して白血病を発症させると考え、急性骨髄性白血病において最も頻度の高い Class I 変異である *FLT3-ITD* に注目した。マウス BMT モデルを用いて、*Hes1* と *FLT3-ITD* が協調して白血病を発症させるか検討した。*FLT3-ITD* を導入した骨髄細胞を移植されたマウスと比べ、*Hes1* と *FLT3-ITD* の 2 つの遺伝子を導入した骨髄細胞を移植されたマウスは、より早期に白血病を発症し死亡した。*Hes1* と *FLT3-ITD* が協調して白血病を発症させることを明らかにした。

マウス BMT モデルにおいて *Hes1* と *FLT3-ITD* が協調して白血病を発症させるため、急性白血病患者骨髄サンプルにおいて *HES1* の発現量上昇と *FLT3-ITD* 変異がともに認められるか解析した。しかし、急性骨髄性白血病患者骨髄サンプルにおいて、*FLT3-ITD* 変異の有無にかかわらず、*HES1* の発現量が高い症例は認められなかった。マウス BMT モデルにおいて *Hes1* と *FLT3-ITD* は協調して白血病を発症させるが、ヒトにおいては有意に多い組み合わせではないことが示唆された。

当研究室は、慢性骨髄性白血病の急性転化症例 20 症例中 8 症例において *HES1* の発現量が高い症例があることを報告している。そのため、骨髄増殖性疾患あるは骨髄異形成症候群から急性骨髄性白血病へ移行した症例で *HES1* 上昇がみられるのではないかと考えた。しかし、骨髄増殖異型成症候群から白血病への移行症例 18 例中 1 例、骨髄増殖性疾患からの白血病への移行症例 12 例中 1 例、*HES1* の発現上昇を認めるのみであった。次に、それ以外の白血病骨髄サンプルについて *HES1* の発現量を調べた。全 79 症例中 5 症例で *HES1* の発現上昇を確認した。その中で、*FIP1L1-PDGFR* 遺伝子変異を伴う慢性好酸球性白血病について注目した。

*FIP1L1-PDGFR* 遺伝子変異は、4 番染色体長腕 (4q12) 上で起こる約 800 kb の欠失の結果、セントロメア側に存在する Fip 1 like 1 (*FIP1L1*) とテロメア側の *PDGFR* (Platelet

derived growth factor receptor alpha)遺伝子が融合したもので、慢性好酸球性白血病の患者の約 14~60%で認められる遺伝子変異である。*FIP1L1-PDGFR* はマウス造血幹細胞を好酸球へ分化誘導する能力を持つ。マウス BMT モデルにおいて *FIP1L1-PDGFR* を導入した骨髄細胞を移植しても、骨髄増殖性疾患を発症するのみで好酸球性白血病は発症しない。*FIP1L1-PDGFR* は白血病発症の Class I 変異として考えられている。

*FIP1L1-PDGFR* を伴う慢性好酸球性白血病患者において *HES1* の上昇が認められたため、マウス BMT モデルにおいて *Hes1* と *FIP1L1-PDGFR* が協調して白血病を発症させるのではないかと考えた。まず、*FIP1L1-PDGFR* によって *Hes1* の発現が誘導されないことを確認した。次に、*Hes1* と *FIP1L1-PDGFR* を用いてマウス BMT モデルを施行した。*FIP1L1-PDGFR* を導入した骨髄細胞を移植されたマウスでは発症までに約 90 日を要したのに対し、*Hes1* と *FIP1L1-PDGFR* を導入した骨髄細胞を移植されたマウスは約 30 日で白血病を発症したと判断した。*Hes1* と *FIP1L1-PDGFR* が協調して白血病を発症させることを明らかにした。*HES1* と *FIP1L1-PDGFR* を導入した骨髄細胞を移植して白血病を発症したマウスの白血病細胞の表面マーカーを解析すると *Siglec-F*、*IL-5Ra* が陽性であった。そのため、マウスは好酸球性白血病を発症したと判断した。さらに、この好酸球性白血病を発症したマウスの骨髄細胞は二次移植も可能であった。ヒトでは *FIP1L1-PDGFR* 遺伝子変異を伴う好酸球性白血病患者にチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブが著効する。今回樹立した好酸球性白血病マウスモデルにイマチニブを投与したところ、非投与群では白血病を発症し死亡するのに対して、投与群において観察期間内に死亡例はなく生存が延長することが確認された。ヒト同様に好酸球性白血病マウスモデルでもイマチニブが著効することが示された。現在、*FIP1L1-PDGFR* にはイマチニブ耐性の T674I 変異や D842V 変異があることが知られており、その変異体に対する有用な治療薬の報告はされていない。このマウスモデルを用いることで、イマチニブ耐性変異体に対してどのような薬剤が有効であるかを *in vivo* で検討できる。今回樹立したマウスモデルを利用し好酸球性白血病の病態解明が進むことが期待される。

次に、細胞株についての検討を行った。*Hes1* を導入したマウス骨髄細胞は IL-3 依存的に増殖する細胞 (*Hes1* 導入細胞株になる。*BCR-ABL* を *Hes1* 導入細胞に導入すると、その細胞は IL-3 非依存的に増殖する能力を獲得する。今回、*FIP1L1-PDGFR* を *Hes1* 導入細胞に導入することでも、その細胞が IL-3 非依存的な増殖能を獲得することを明らかにした。

次に、それらの細胞が IL-3 非依存的に増殖するシグナルの同定を試みた。*Hes1* 導入細胞の増殖には IL-3 が必要である。IL-3 投与によって、その下流では AKT、RAS、STAT のシグナルが活性化する。*BCR-ABL* も *FIP1L1-PDGFR* もチロシンキナーゼの恒常的活性化型変異であり、その下流で AKT、RAS、STAT が活性化する。そこで、*Hes1* 導入細胞に活性化型変異体の *AKT*、*RAS*、*STAT* をそれぞれ単独で導入して IL-3 非存在下で培養可能かを検討した。しかし、いずれも IL-3 非依存的な増殖能は獲得できなかった。次に、*Hes1* 導

入細胞に活性型変異体の *AKT*、*RAS*、*STAT* を 2 種類の組み合わせで遺伝子導入をした。すると活性型 *AKT* と活性型 *RAS* 遺伝子を導入した *Hes1* 導入細胞が IL-3 非依存的な増殖能を獲得することがわかった。したがって、*Hes1* 導入細胞の IL-3 非依存的増殖能獲得には *AKT* と *RAS* シグナルの活性化が必要であることを明らかにした。このことから、*HES1* の上昇と *AKT* と *RAS* の両シグナルの活性化が白血病の病態発症に寄与していることが示された。つまり、*HES1* が上昇していた患者症例で、*AKT*、*RAS* 両シグナルが活性化するような遺伝子変異が存在している可能性が考えられる。

さらに、*Hes1* の細胞を未分化維持する能力について検討した。*Hes1* は bHLH 型転写抑制因子である。*Hes1* の WRPW ドメインにコリプレッサーである *Groucho* が結合する。そこに HDAC がリクルートされ、標的遺伝子を脱アセチル化する。この HDAC による作用で *Hes1* は標的転写の転写を抑制する。HDAC 阻害剤を作用させると、*Hes1* による細胞の未分化性の維持が障害されるのではないかと考えた。HDAC 阻害剤を作用させた *Hes1* 導入細胞は、核が分葉化した細胞となり、Gr1、CD11b の発現が上昇した。今回、HDAC 阻害剤によって *Hes1* 導入細胞が分化することが明らかにした。HDAC 阻害剤が *HES1* の高い腫瘍細胞に対する治療薬になり得る可能性が考えられる。実際に、HDAC 阻害剤である SAHA を投与すると *FIP1L1-PDGFR* を導入した *Hes1* 導入細胞の増殖障害が起きることを確認した。

本研究では、*Hes1* と *FLT3-ITD* が協調して白血病を発症させること、*Hes1* 導入細胞が IL-3 非依存的な増殖能を獲得するには *AKT* と *RAS* シグナルの活性化が必要であること、*Hes1* 導入細胞は HDAC 阻害剤により分化誘導がされることを明らかにした。さらに、*FIP1L1-PDGFR* 遺伝子変異を伴う慢性好酸球性白血病患者で *HES1* の発現量が上昇していることを見出し、*Hes1* と *FIP1L1-PDGFR* を導入した骨髄細胞を移植されたマウスが好酸球性白血病を発症することを示した。この好酸球性白血病マウスモデルはヒト同様にイマチニブが有用であることも確認された。今後、好酸球性白血病の病態解明に今回樹立したマウスモデルが役立つことが期待される。