

論文の内容の要旨

論文題目 C/EBP α 変異体による白血病発症機構の解析

氏名 戸上 勝仁

CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α)は N 末に 2 つの Transactivation domain (TAD)を、C 末に bZIP ドメイン(DNA 結合、ダイマー形成ドメイン)をもつ転写因子で、顆粒球の分化に必須の転写因子である。一方、細胞増殖抑制機能も有していることが知られており、増殖と分化、両方の制御に関与するため、その機能異常は単独で白血病発症に繋がる可能性がある。実際に C/EBP α 遺伝子変異は染色体異常のない AML の約 10%に認められる。

C/EBP α はイントロンレス遺伝子で、同じ mRNA の異なる開始コドンから 2 つのアイソフォーム、42kDa の C/EBP α -p42 と 30kDa の C/EBP α -p30 が翻訳される。ショートフォームの C/EBP α -p30 はダイマー形成、DNA 結合能は保たれているが、TAD を 1 つ欠き、C/EBP α -p42 に対してドミナントネガティブに作用する事が分かっている。

AML で認められる C/EBP α 遺伝子変異は N 末変異 (C/EBP α -N^m)と C 末変異(C/EBP α -C^m)の 2 つに大別することができる。C/EBP α -N^m はフレームシフト変異で、変異がはいることで N 末側に終止コドンがはいる、C/EBP α -p30 のみが翻訳されるようになる。一方、C/EBP α -C^m はインフレーム変異で、bZIP ドメインに変異がはいることでダイマー形成能、DNA 結合能の減弱ないし欠失を生じる。

これまでの研究で、C/EBP α -N^m に関しては C/EBP α -wild type(WT)に対するドミナントネガティブ効果や、分化抑制作用などといった機能を有することが分かっているが、AML 発症における C/EBP α -C^m の機能的役割については不明な点が多い。本研究では C/EBP α -C^m に注目し、その機能について解析を行った。

今回、ヒト AML 患者で認められた C/EBP α -N^m : T60fs \times 159、C/EBP α -C^m : 304_323 duplication、N321D、K313KK、299_304 duplication を用いた。C 末変異体 4 種類に関しては以下、C/EBP α (304_323 dup.)-C^m、C/EBP α (N321)-C^m、C/EBP α (K313 dup.)-C^m、C/EBP α (299_304 dup.)-C^m と表記して区別する。C/EBP α -C^m は C 末変異体 4 種類を総括した表記とする。

まず、C/EBP α 変異体の転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより検討した。C/EBP α binding site を含んだ p(C/EBP)2TK を Reporter vector として使用し、C/EBP α -WT 及び C/EBP α 変異体の転写活性を調べた C/EBP α -WT が強い転写活性能を示すのに対して、C/EBP α -N^m、C/EBP α -C^m ともに転写活性能は認められなかった。次に、C/EBP α -WT に対するドミナントネガティブ効果を検

討するため、C/EBP α -WT と C/EBP α -N^mもしくは C/EBP α -C^mを同時にトランスフェクトした。C/EBP α -WT で認められた転写活性が C/EBP α -N^mを同時にいれることで、その転写活性が有意に抑制された。一方、C/EBP α -WT と C/EBP α -C^mを同時にいれた場合は C/EBP α -WT 単独の場合と、その転写活性に有意差は認められなかった。

免疫染色で C/EBP α -WT 及び C/EBP α 変異体の細胞内局在を検討した。C/EBP α -WT、C/EBP α -N^m、C/EBP α -C^mを 293T 細胞へトランスフェクションし、48 時間後に染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、C/EBP α -WT 及び C/EBP α 変異体ともに核内に局在していたが、分裂期の細胞を観察すると、C/EBP α -WT、C/EBP α -N^mは染色体上に認められるのに対して C/EBP α -C^mは染色体上に認められなかった。

以上の結果から、C/EBP α -N^m、C/EBP α -C^mは C/EBP α -WT に対するドミナントネガティブ効果及び、その局在において異なることが示された。以降は、今回注目した C/EBP α -C^mについて研究をすすめた。

顆粒球の分化における C/EBP α -C^mの機能について検討するため、G-CSF により好中球へ分化するマウス骨髄細胞株 32Dcl3 細胞を用いて分化試験を行った。32Dcl3 細胞へ pMYsIP-mock、pMYsIP- C/EBP α -C^mを導入後、puromycin (1 ng/mL)で selection し安定発現株を作成後、G-CSF (50 ng/ml)で 6 日間培養し、細胞形態の観察と顆粒球の分化マーカーで、分化するに従い発現が高くなる CD11b をフローサイトメトリーを用いて測定した。コントロールとして、それぞれのトランスフェクタントを IL-3 1 ng/ml で培養した。mock は IL-3 で培養した場合と比べ、G-CSF で培養すると 6 日目には成熟顆粒球へ分化していたが、C/EBP α -C^m 導入細胞では G-CSF で培養した場合も mock と比べて有意に未熟な細胞が残存していた。また、mock は IL-3 に比べ G-CSF の刺激で CD11b の発現が高くなっているのに対して、C/EBP α -C^m 導入細胞では変化がなかった。

次に、Primary cell における増殖能、分化誘導能を検討するため、マウス骨髄細胞から採取した単核球へ mock もしくは C/EBP α -C^mを導入しコロニーアッセイを行った。pMYsIG-mock、pMYsIG- C/EBP α -C^mをマウス骨髄単核球へ導入後、GFP 陽性細胞をソートした。1×10⁴細胞/dish で播種し、7 日後にコロニー数をカウントし、同細胞濃度で継代した。その結果、Mock では継代不可能であったのに対して C/EBP α -C^m 導入細胞では繰り返し継代可能で、継代可能となった細胞はサイトスピンで確認したところ、芽球様の幼若細胞であった

つまり、C/EBP α -C^mは G-CSF による 32Dcl3 細胞の分化を抑制し、マウス骨髄細胞を不死化することがわかった。

In vivo での C/EBP α -C^mの機能をマウス骨髄移植モデルを用いて検討した。マウス骨髄細胞より採取した単核球 (Ly5.1 マウス)に pMYsIG- C/EBP α -C^mベクターによって作成したウイルスを感染させ、放射線照射後の Ly5.2 マウスへ移植した。移植細胞は Ly5.1 を指標に、レトロウイルスベクター感染細胞は GFP を指標にフォローしていくことが可能である。

C/EBP α -C^mは移植から 3~12 ヶ月で、著名な肝脾腫を伴う AML を発症し、骨髄は GFP、Gr1、CD11b、c-Kit 陽性のやや分化傾向を示す腫瘍細胞に占拠されていた。C/EBP α -C^mの中で、最も発症時期が早かった ZIP domain の point mutation である N321D について、さらに研究を行った。

マイクロアレイを用いた DNA 及び microRNA (miR)の網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプル

ルはC/EBP α (N321D)を移植しAMLを発症したマウスと mock を移植したマウスの骨髄を用いた。それぞれ3匹、計6匹の解析を行った。

得られたマイクロアレイの結果から t 検定で P 値<0.05 のプローブ 4285 個、3068 遺伝子に注目した。3068 遺伝子に関して Gene ontology (GO)解析を行い、P 値<0.005 の GO term 27 個、その中で白血球の分化及びアポトーシスに関連した遺伝子の Absolute fold change 上位 5 遺伝子をそれぞれ抽出した。この抽出した遺伝子の中から、がん抑制遺伝子でこれまでに造血器腫瘍に関連した報告のある Egr1 に注目した。Real time PCR で Egr1 の発現を比較したところ、やはり、C/EBP α (N321D)白血病発症マウス骨髄において、著しく抑制されていることが明らかとなった。

次に、Egr1 の標的遺伝子の発現を Real time PCR を用いて比較したところ、C/EBP α (N321D)発症マウス骨髄では Pten が著しく低下していることがわかった。そこで、Pten の下流、AKT のリン酸化についてウェスタンブロットで確認したところ、C/EBP α (N321D)白血病発症マウス骨髄細胞ではコントロールの骨髄細胞に比べて AKT のリン酸化が入りやすい状態であることが明らかとなった。

さらに、miR マイクロアレイの結果から、Egr1 をターゲットとする miR-183 が C/EBP α (N321D)白血病発症マウス骨髄において高くなっていることがわかった。

miR-183 は多くの癌で発現が高くなっており、miR-183-Egr1-PTEN Network の腫瘍化における重要性が固形腫瘍において報告されている。

以上、本研究で C/EBP α -C^m は顆粒球の分化を抑制し、マウス骨髄細胞を不死化することがわかった。また、C/EBP α (N321D)による白血病マウスモデルでは miR-183 の発現が上昇し、Egr1 及び Pten が著しく抑制されていることを明らかにした。

C/EBP α (N321D)による白血病化に miR-183-Egr1-PTEN Network が関与していることが示唆されたが、C/EBP α (N321D)による miR-183 の発現制御機構まで明らかにすることはできなかった。そのメカニズムの解析は今後の課題であると考ええる。