

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 戸上 勝仁

本研究は CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) 遺伝子変異体による白血病発症機能についてマウス骨髄移植モデルを用いて解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. AML 患者で認められた C/EBP $\alpha$ -C 末変異体(C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup>)が転写活性能を失っており、C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> は C/EBP $\alpha$ -N 末変異体(C/EBP $\alpha$ -N<sup>m</sup>)と異なり、C/EBP $\alpha$ -WT に対してドミナントネガティブに作用しないことが 293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより示された。
2. C/EBP $\alpha$ -WT 及び C/EBP $\alpha$  変異体の細胞内局在を免疫染色で検討したところ、C/EBP $\alpha$ -WT 及び C/EBP $\alpha$  変異体ともに核内に局在していたが、C/EBP $\alpha$ -WT、C/EBP $\alpha$ -N<sup>m</sup> が染色体上に認められるのに対して C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> は染色体上に認められなかった。
3. G-CSF で成熟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 mock、C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> を導入後、安定発現株を樹立し、G-CSF で 6 日間培養して比較したところ、形態及び分化マーカー(CD11b)の発現から、C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> が G-CSF による 32Dcl3 細胞の分化を抑制することが示された。
4. 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 $\alpha$ -C<sup>m</sup> を導入しコロニーアッセイを行った。その結果、Mock では replating 不可能であったのに対して C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> 導入細胞では繰り返し replating 可能で、replating 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 $\alpha$ -C<sup>m</sup> はマウス骨髄細胞を不死化することが示された。
5. *In vivo* での C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> の機能についてマウス骨髄移植モデルを用いて検討した。C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> 導入細胞を移植したマウスは、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 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。
6. C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> の白血病発症における標的遺伝子を探索する目的で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。C/EBP $\alpha$ -C<sup>m</sup> を移植し AML を発症したマウスと mock を移植したマウ

スの骨髄を比較した。その結果、がん抑制遺伝子である *Egr1* が *C/EBPα-C<sup>m</sup>* 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。また、*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/EBPα-C<sup>m</sup>* 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/EBPα-C<sup>m</sup>* 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/EBPα-C<sup>m</sup>* 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。

以上、本論文は *C/EBPα-C<sup>m</sup>* が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、また、*C/EBPα-C<sup>m</sup>* による白血病発症マウス骨髄では *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/EBPα-C<sup>m</sup>* による白血病発症機構の分子メカニズムは明らかになっていない点が多く、本研究では *C/EBPα-C<sup>m</sup>* による白血病化に *miR-183-Egr1-PTEN Network* が関与している可能性を示唆する結果が得られており、学位授与に値するものと考えられる。