

論文の内容の要旨

論文題目 **c-Kit** の活性化変異と融合遺伝子 **AML1-ETO** による白血病発症モデルの作成とその解析

氏名 鍵山 侑希

c-Kit は細胞外領域に 5 つの immunoglobulin-like ドメインを有し、細胞内領域には juxtamembrane ドメイン及び 2 つの kinase ドメイン I/II を持つレセプター型チロシンキナーゼであり、PDGFR α/β 、Flt3 などとサブクラスを形成している。c-Kit はレセプターとしてそのリガンドである SCF を介して二量体を形成すると互いをリン酸化することで活性化し、下流へとシグナルを伝えることで細胞の増殖や生存に寄与している。c-Kit の発現は造血幹細胞 (HSC)、肥満細胞、生殖細胞、メラノサイト、及び腸管の蠕動運動に関わるカハール細胞に主に認められ、事実、c-Kit の機能欠損マウスとして知られる *W/W^v* マウスは低形成性貧血、肥満細胞、生殖細胞、メラノサイト、カハール細胞の欠損が認められる。一方で、c-Kit は血液疾患との関連性が高く、骨髄増殖生疾患 (MPN) や急性骨髄性白血病 (AML) 患者の骨髄細胞において活性化型変異がしばしば認められる。c-Kit の変異部位は様々な箇所では認められているが、とりわけ kinase ドメイン II に位置する 816 番目の Asp に集中して認められる。この 816 番目の Asp はキナーゼの活性化ループに位置しており、Tyr、His、Asn、Val と置換の種類が多く、肥満細胞白血病、マストサイトーシス、急性骨髄性白血病など様々な疾患に関係している。

AML は骨髄系の造血細胞が腫瘍化し、分化障害を引き起こす血液疾患である。近年、t(8;21) 転座により生ずる融合遺伝子である AML1-ETO を認める AML 患者の 46.8%に c-Kit の強発現が有意に検出される例が報告されている。AML1 は造血を司る転写因子であり、主に HSC からの細胞分化を規定する一方、ETO は Nervy homology region (NHR) ドメインを介し mSin3-NCOR-HDAC 複合体と会合し転写活性を負に制御する因子である。融合遺伝子の形成は AML1 の転写活性化ドメインが欠失し ETO の NHR ドメインは保たれていることから、AML1-ETO は AML1 の転写活性及びそれに伴う細胞の分化に対し抑制的に働くことが知られている。

AML の発症には細胞の増殖に関わるクラス I 遺伝子、細胞の分化に関わるクラス II 遺伝子の両変異が協調的に働いて進行していくという 2 段階仮説が提唱されており、実際にクラス II 遺伝子変異である AML1-ETO のノックインマウスはそれ単独では血液疾患の発症に至らないことが分かっている。また、クラス I 遺伝子変異である c-Kit の活性化変異は細胞に異常増殖をもたらす変異として知られていることから、マウス c-Kit の活性化変異が AML1-ETO と共存して AML の発症を引き起こすということは、ここ一年で徐々に明らかになりつつある。

本研究では、c-Kit の活性化変異 (Kit^{D814V}) と AML1-ETO をレトロウイルスベクターにより同時に骨髄細胞に導入しマウスに移植する BMT モデルの作成を行い、このモデルマウスが AML または MPN を発症する事を確認した (平均発症日数 23.5 日±7.8 日: n=8)。一方で、Kit^{D814V} を単独で骨髄細胞に導入し移植したマウスは MPN (平均発症日数 29.9 日±4.8 日: n=8)、T 細胞性白血病 (平均発症日数 77.5 日±13.6 日: n=4) 及び B 細胞性白血病 (平均発症日数 49.7 日±6.3 日: n=3) と様々な疾患の発症を呈した他、同じ AML1 の変異であり AML1-ETO と同様に分化抑制をもたらす変異体として知られる AML1^{S291fsX300} と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウスは AML を発症せず全てのマウスにおいて MPN の発症を呈した (平均発症日数 17.3 日±4.2 日: n=9)。発症マウス骨髄中の腫瘍細胞をフローサイトメトリーによって解析したところ、AML1^{S291fsX300} と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウス骨髄では CD11b/Gr-1 の強発現する成熟した骨髄系細胞の集積が認められる一方で、AML1-ETO と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウス骨髄中では CD11b/Gr-1 の発現は低く、細胞形態的にも幼若な細胞の集積が認められた (図)。このように、AML1-ETO と Kit^{D814V} を同時に

骨髄細胞に導入し移植したマウスは分化障害を伴って早期に AML/MPN の発症をもたらす一方で、AML1^{S291fsX300} と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウスでは同様に協調して顕著に早い期間で発症をもたらすものの、AML1 という同じ遺伝子から生じた変異であるにもかかわらず AML にみられるような骨髄細胞に分化障害が認められないことから、AML1-ETO の特徴的な構造がこの種の AML でみられる分化障害に重要であることが改めて分かる結果となった。更に、AML1-ETO と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウスにおいて、腫瘍化した骨髄細胞は serial transplantation において継続的な白血病の発症をもたらすという結果から、発症マウスの骨髄中に腫瘍細胞を供給するとされる白血病幹細胞 (LSC) の存在が示唆される。そこで、腫瘍細胞中の Lineage⁺細胞と Lineage⁻細胞そして KSL 細胞をそれぞれソーティングしてマウスに移植したところ、Lineage⁻細胞と KSL 細胞は Lineage⁺細胞と比較し LSC の濃縮が認められた。現在のところ、AML1-ETO 陽性 AML において確立された LSC の同定には至っていないため、本研究では細胞表面タンパクを中心に LSC の同定を試みるというアプローチから、腫瘍中の KSL 細胞と正常 KSL 細胞の遺伝子発現プロファイルの作成を行い、いくつかの因子を候補に挙げた。その中の因子でも、CD200R1 の発現は定量的 PCR の結果、正常骨髄細胞や正常 HSC、そして白血病骨髄細胞全体の発現量と比較し、白血病骨髄内に部分的に存在する幼若な細胞分画に限局して高い値を示すことが分かった。即ち、この因子は発症マウス骨髄中の幼若な腫瘍細胞に特徴的な発現パターンを有している可能性が示唆される。次に CD200R1 の抗体を利用し、発症マウス骨髄のフローサイトメトリー解析を行ったところ、Lineage⁻の細胞分画に CD200R1 の発現が高い細胞が存在し、この発現は Sca-1 の発現と相関していることが分かった。一方で、こうした発現パターンは正常骨髄内では認められなかった。

更に、AML1-ETO 以外の種々の白血病関連遺伝子変異 (Kit^{D814V}、AML1^{S291fsX300}、AML1^{D171N}、FLT3-ITD、BCR-ABL、MOZ-TIF2) を導入した KSL 細胞の CD200R1 の発現解析を行ったところ、CD200R1 はこれら遺伝子変異では発現が誘導されず、その発現誘導は AML1-ETO 特異的であることが分かった。また、既に報告されている FLT3-ITD と AML1-ETO とを同時に骨髄細胞に導入することで発症する AML のモデルマウスの骨髄では、AML1-ETO と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウス同様 CD200R1 の特徴的な発現上昇が認められ、この発現パターンは MOZ-TIF2 を骨髄細胞に導入し移植してできる AML モデルマウスには認められなかつ

た。従って、CD200R1 はマウスレベルにおける AML1-ETO 陽性 AML に特徴的な発現上昇を示すことが分かった。この結果を受け、limiting dilution assay によって白血病細胞中の CD200R1 の発現細胞から LSC の濃縮が可能かどうかを検証したところ、Lineage の細胞分画における CD200R1 の発現が高い分画と低い分画の LSC frequency に大きな差を認めることは出来なかった。従って、CD200R1 の解析から LSC の同定を試みたが、CD200R1 が有用な LSC マーカーとなり得る結果を得ることは出来なかった。

本研究では、AML1-ETO 陽性 AML における有力な LSC マーカーの同定に至る事は出来なかったものの、マウスにおいて CD200R1 の発現が AML1-ETO 陽性 AML を特徴づける一因子であることを明らかにした。AML1-ETO によって発現誘導される CD200R1 は AML1^{S291fsX300}、AML1^{D171N} などの違うタイプの AML1 変異に対し発現誘導が起こらないことから、AML1 への ETO の付随に伴う何らかのエピジェネティックな発現調節が関わっている可能性があるが、現時点では明らかではない。AML は多数の白血病原因遺伝子によって引き起こされ、本研究ではそのうちの一つの遺伝子変異セットにより生じる AML の解析に過ぎない。本研究の更なる展開には、ノックアウトマウスを用いた解析や AML1-ETO 陽性 AML においてヒト白血病検体で検証し CD200R1 の発現解析を行うことが必要である。

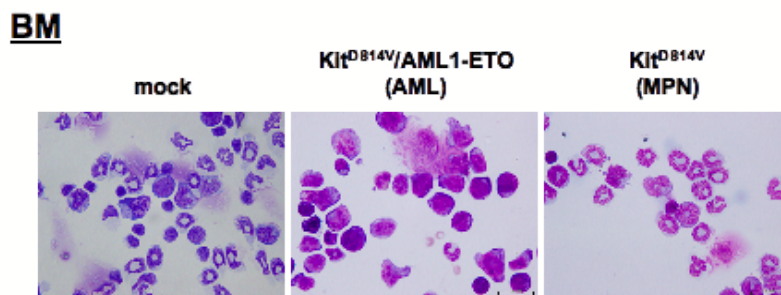


図. AML1-ETO と Kit^{D814V} を同時に骨髄細胞に導入し移植したマウス骨髄は分化障害により幼若細胞の集積が認められる