

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 木暮 泰寛

本研究は、造血および白血病において重要ながん原遺伝子 *EVII* のヒト細胞における制御について、レポーター細胞株を用いた cDNA ライブラリースクリーニング及び白血病細胞株における *EVII* ヒストンメチル化の探索を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. TALEN 技術を用いてヒト白血病細胞株 HEL とヒト子宮体癌細胞株 HEC1B のゲノム改変を行い、*EVII*-eGFP レポーター細胞株をそれぞれ樹立した。GFP 発現はフローサイトメトリーやウェスタンブロットで確認された。*EVII* を **up-regulate** することが既に知られている MLL 融合遺伝子をゲノム改変 HEL やゲノム改変 HEC1B に導入すると、細胞の GFP シグナルが増強され、レポーター細胞として有用であることが示された。
2. *EVII* 発現細胞株 KU812 より cDNA を抽出し、pMXs-NEO ウイルスによる発現ライブラリーを作成した。
3. 作成したライブラリーからアンフォトロピックレトロウイルス粒子を生成し、レポーター細胞に感染させた。フローサイトメトリーで GFP シグナル強度の上位 3 パーセントイル集団を **single cell sort** し、増殖させてインテグレートされた cDNA 配列を解析した。ゲノム改変 HEC1B を用いた実験において、新規 *EVII* 制御因子の候補となる 2 種類の転写因子の配列が検出された。
4. 3 で得られた結果を確認するため、白血病細胞株で RT-qPCR を行い両転写因子と *EVII* の発現量の相関関係を評価したところ、一方の遺伝子と *EVII* の間に有意な相関を認めた。また、HEC1B 細胞に両転写因子の shRNA を導入したところ、ともに *EVII* 発現量が低下し、これらの遺伝子が *EVII* を制御している可能性が示唆された。

5. 白血病細胞株 KU812、HEL 及び HL60 を用いて *EVII* の転写調節領域の H3K27me3、H3K4me3、H3K36me3、H3K79me2 ヒストンマークを ChIP-qPCR で評価した。3q26 異常を伴わない *EVII* 高発現株である KU812 では、において H3K4me3 や H3K27me3、H3K79me2 が特徴的に亢進していた。

以上、本研究では *EVII* 制御機構を明らかにするため、ゲノム改変技術を用いてレポーター細胞株を作成した。更に、cDNA ウイルスライブラリーを用いた *EVII* up-regulator のスクリーニングを行い、2 種類の候補遺伝子を同定した。また、*EVII* 高発現に関与するヒストンメチル化修飾の候補を同定した。これらは *EVII* の発現制御機構における重要かつ新たな知見であり、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。