

審査の結果の要旨

氏名 水野秀明

本研究は急性骨髄性白血病の中でも特に予後不良とされる Evi1 高発現白血病の病態解明を目的とし、マウス骨髄細胞に Evi1 を導入して移植することで得られる Evi1 高発現白血病マウスモデルを用いて、転写因子である Evi1 の標的遺伝子の同定及びその機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Evi1-GFP または GFP を導入して移植したマウスの移植後 4 週間後のおよび白血病発症後の GFP^{pos}Lin^{neg}c-kit^{pos} 分画細胞を用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、これらの 3 グループが各々特徴的な遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。そのうち、Evi1 を導入して移植後 4 週間の細胞で Evi1 を導入していない細胞に比べて RPKM 比 10 倍以上の高発現を認める 31 遺伝子を抽出し、更にそれらを白血病発症後で白血病発症前よりも発現が上昇する 11 遺伝子(i)と、低下する 20 遺伝子(ii)に分類した。(i)の遺伝子群の中から fbp1、(ii)の遺伝子群の中から p57 を抽出し、更に解析を行った。
2. Evi1 と p57 を同時にマウス骨髄(Lin^{neg}c-kit^{pos}Sca-1^{pos})KSL 細胞に transduction し、コロニー形成アッセイを行ったところ、Evi1 強制発現細胞でみられるコロニー形成能の増加効果が減弱し、RNA-seq 結果でみられた p57 の減少が Evi1 高発現白血病において重要であることが示唆された。
3. 更に TCGA-AML cohort のデータを再解析したところ、Evi1 高発現上位 1/3 の白血病患者群において p57 が低い患者群では予後不良であることを見出した。同様の解析を RNA-seq 結果から抽出した他の 30 遺伝子について行ったが、有意な予後の差が認められたのは p57 のみであった。
4. Evi1 をマウス骨髄 KSL 細胞に transduction したところ Fbp1 の mRNA 発現量が速やかに上昇した。また、マウス 32D 細胞株に Evi1-Flag を transduction した細胞で Flag を用いた ChIP を行ったところ、Fbp1 の promoter, enhancer 領域の一部に Evi1-Flag の Enrichment が認められ、Evi1 が Fbp1 の転写を直接制御している可能性が示唆された。
5. Fbp1 が高発現することで解糖系の活性が低下し、G6P の増加を介してペントースリン酸経路の活性が上昇する可能性が考えられた。RNA-seq の結果を用いて Gene

Set Enrichment Analysis を行ったところ、ペントースリン酸経路に関連する遺伝子群が Evi1 高発現細胞で enrich されていることが明らかになった。そこで、Evi1 を transduction したマウス骨髄 KSL 細胞においてペントースリン酸経路の酵素のノックダウンを行いコロニー形成能を評価したところ、ペントースリン酸経路の酵素 (G6pd, Pgd, Rpia) をノックダウンした細胞ではコロニー形成能が有意に低下し、Evi1 高発現細胞の増殖およびコロニー形成においてペントースリン酸経路の活性が保たれることが必要であることが示された。

6. 同様に、Evi1 を transduction したマウス骨髄 KSL 細胞において Fbp1 のノックダウンを行ったところ、コロニー形成能が低下した。Evi1 を transduction したマウス骨髄 KSL 細胞に Fbp1 阻害薬を投与してコロニー形成能を評価したところ、Evi1 を導入した場合にはコロニー形成能の低下が認められたが Evi1 を導入しない場合にはコロニー形成能は変化しなかった。
7. Evi1 高発現白血病マウスモデルの白血病細胞を再移植した Evi1 高発現白血病マウスモデルにおいて Fbp1 阻害薬を腹腔内投与したところ、骨髄中および末梢血中の白血病細胞が Fbp1 阻害薬を投与しない場合に比して減少した。また、Evi1 高発現白血病細胞の再移植時に Fbp1 に対する shRNA を導入した後で再移植する Evi1 高発現白血病マウスモデルにおいて、shRNA を導入した白血病細胞を移植したマウスでは導入しない白血病細胞を移植したマウスよりも発症が遅くなることが示された。

以上、本論文は Evi1 高発現白血病マウスモデルにおいて、RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析から、転写因子である Evi1 の標的遺伝子として p57 と Fbp1 を抽出し、それぞれの遺伝子の Evi1 高発現白血病における役割を探索した。特に Fbp1 はその高発現が Evi1 高発現白血病の糖代謝変容に関わっていると考えられ、ノックダウンおよび薬物による阻害効果の検証を通じて新規治療標的としての可能性を見出した。予後不良の白血病である Evi1 高発現白血病の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。