

論文の内容の要旨

論文題目 白血病関連遺伝子 EVI-1 の正常造血における下流標的の探索

氏名 千葉 晶輝

【序文】

*Ecotropic viral integration site 1 (EVI1)*を高発現する急性骨髄性白血病(Acute Myeloid Leukemia; AML)は極めて予後不良な一型だが、正常造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell; HSC)の維持にも EVI1 は必須なため治療標的とするのは難しい。EVI1 の下流標的が発現量および細胞の状態によって大きく異なっている可能性があり、造血細胞と AML 細胞での下流標的の違いを明らかにすることが、難治性 AML の病態解明と治療標的の探索につながると考えられた。しかしながら、*in vivo*では Evi1 の発現が長期の骨髄再構築能を有する HSC に限局しており、その後のアッセイに必要な細胞数が十分確保しにくいこと、また網羅的解析に使用可能な品質の anti-EVI1 抗体がないことが、これまで EVI1 の正常造血における下流標的の探索を困難にしていた。

本研究では EVI1 の正常造血における下流標的の探索を目的とし、3×FLAG タグを *Evi1* 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウス造血細胞株 32D-cl3 を用いてクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を施行した。また *Evi1* 遺伝子をノックアウトした 32D-cl3 を用いて RNA シーケンス(RNA-seq)を施行し、正常造血細胞に特異的な EVI1 の下流標的の候補を絞り込み、正常造血幹細胞においてもそれらの遺伝子の発現制御に EVI1 が関与している可能性を示した。

【主な材料と方法】

***Evi1* ノックアウト 32D-cl3 細胞株および 3×FLAG タグノックイン 32D-cl3 細胞株**

CRISPR/Cas9 system を用いて作成した。両者とも sgRNA/Cas9 ベクターの作成、ノックイン細胞株作成ではドナーベクター (pFETCh_Donor)の作成も行い、エレクトロポレーションで細胞株に遺伝子導入、選択およびシングルセルソーティングを行ってクローン化した。

***Evi1* 条件付きノックアウトマウス (*Evi1* cKO マウス)**

*in vivo*での *Evi1* cKO マウスの作成には、*Evi1* fx/fx マウスを Mx1-Cre トランスジェニックマウスと交配させ得られた個体 (*Evi1* cKO マウス×Mx1-Cre トランスジェニックマウス; *Evi1* fx/fx Mx1-Cre (+)マウス) をジェノタイプングし、6-8 週齢時に 500 mg の Polyinosinic-polycytidylic acid (pIpC; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)を 3 日おきに 3 回腹腔内注射することで造血細胞特異的に Cre リコンビナーゼの発現を誘導した。

ChIP-seq

レトロウイルスを用いて 3×FLAG-EVI1 をマウスの造血細胞に導入し、AML を発症させたマウスの AML 細胞、および 3×FLAG タグを *Evi1* の 3' 端にノックインした 32D-cl3 細胞をそれぞれ 2×10^7 個回収し、anti-FLAG 抗体で ChIP を行い、製造者推奨のプロトコールでライブラリーを作成し ChIP-seq を行った。

RNA-seq

Evi1 ノックアウト 32D-cl3 細胞株 2 クローン及び野生株 32D-cl3 細胞株 2 クローンからそれぞれ 1×10^7 個ずつ全 RNA を分離し、製造者推奨のプロトコールでライブラリーを作成し RNA-seq を行った。また、*Evi1* を外因性に発現させた細胞を移植したマウスの、移植後 1 ヶ月および AML 発症後(約 10 ヶ月)の細胞を利用して同様に RNA-seq を行った。

【結果】

***Evi1* ノックアウト 32D-cl3 細胞株は野生株に比して G-CSF 刺激で分化方向に進みやすい**

IL-3 存在下では細胞数に差がつかなかったが、G-CSF 存在下の場合で、測定 day 5・day 6 の時点で細胞数の違いに有意差が認められた。また顆粒球の分化マーカーである Gr-1 の陽性率により検証したところ、day 7 の段階で *Evi1* ノックアウト細胞株では野生株より Gr-1 陽性率の増加を認め、*Evi1* の非存在下では造血細胞は分化しやすいと考えられた。

ChIP-seq の結果と抽出遺伝子群の検証

32D-cl3 細胞株は day 3 の、EVI1 の発現が保たれつつ分化が進んでいると考えられる細胞および day 0 の未分化性を保った細胞の 2 種類、1 検体ずつ 2 検体の ChIP-seq を行い、このうち day 0 特異的に見られるピークは、EVI1 と協調して造血細胞の未分化性に関わる遺伝子群として考えられる。これらの遺伝子群を解析したところ、HDAC class I (histone deacetylase)、RAC1 (RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1) signaling に関わる遺伝子群などが抽出された。

RNA-seq の結果と候補遺伝子の絞り込み

Evi1 ノックアウト 32D-cl3 細胞株 2 種および野生株 2 種の RNA-seq から得られた発現変動遺伝子の中で、倍率変化 (Fold Change) が 2 以上、偽発見率 (False Discovery Rate: FDR) が 0.05 未満の統計学的有意差のある遺伝子群を抽出したところ、ノックアウト細胞株で遺伝子発現が有意に上昇した遺伝子は 152、低下した遺伝子は 155 であった。先の ChIP-seq で day 0 特異的にピークのあった 6494 領域と *Evi1* ノックアウト細胞株で遺伝子発現が低下する 155 遺伝子に共通する遺伝子を抽出したところ、24 遺伝子が同定

された。

***in vivo*での検証に向けての候補遺伝子のさらなる検証**

24 遺伝子の *in vivo* での発現量を検討するため、EVI1 を過剰発現した細胞を移植して白血化したマウスの、移植後早期および AML 発症後の細胞を利用した RNA-seq 解析結果を参照した。上記 24 遺伝子のうち、移植後早期に発現量が増加し AML 発症後には発現量が低下していた遺伝子、すなわち EVI1 によって発現が増加するものの AML 発症には関わっていないと思われる遺伝子は、*Blm*(*BLM RecQ like helicase*), *Gfi1*(*Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor*), *Gfod1*(*Glucose-Fructose Oxidoreductase Domain-Containing Protein 1*), *H2-dma* (*Histocompatibility 2, class II, locus Mb2*), *Mfsd2b* (*Major facilitator superfamily domain containing 2B*)の 5 遺伝子のみであり、これらの遺伝子の正常造血における意義を検証することとした。

***H2-dma* ノックアウト、*Mfsd2b* ノックアウト 32D-cl3 細胞株は、*Evi1* ノックアウト 32D-cl3 細胞株と同様に、野生株に比して G-CSF 刺激で分化方向に進みやすい**

上記のうち *H2-dma*, *Mfsd2b* のノックアウト 32D-cl3 細胞株の day 7 の段階での分化の程度を、Gr-1 の陽性率により検証したところ、day 7 の段階で *H2-dma* ノックアウト細胞株、*Mfsd2b* ノックアウト細胞株はいずれも野生株より Gr-1 陽性率の増加を認めた。*H2-dma*, *Mfsd2b* いずれも非存在下で造血細胞は分化しやすいと考えられ、これは *Evi1* ノックアウト細胞株と同様の性質を示している。この結果から、これらの遺伝子は EVI1 と協調して正常造血における未分化性維持に関わっている可能性が示唆された。

***Evi1* cKO マウスで *Evi1* を条件付き欠失させると *H2-dma*, *Mfsd2b* の発現量が低下する**

Evi1 cKO マウス骨髄中の LSK 分画細胞 20,000 個を蛍光セルソーターでソートし、LSK 分画細胞での mRNA 発現量を *Evi1* cKO マウスとコントロールマウス(それぞれ N=3)において比較したところ、*H2-dma*, *Mfsd2b* は *Evi1* cKO マウスにおいて *Evi1* の欠失と連動して発現量が低下した。この結果から HSC においてもこれらの遺伝子の発現制御に EVI1 が関与している可能性があることが示された。

【考察】

本研究で私は AML 関連遺伝子 EVI1 の正常造血における下流標的の探索を目的とし、3×FLAG タグを *Evi1* 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウス造血細胞株 32D-cl3 を用いて ChIP-seq を施行した。また、*Evi1* 遺伝子をノックアウトした 32D-cl3 を用いて、RNA-seq を施行した。これらの解析を行い正常造血特異的な EVI1 の下流標的の候補を絞り込んだ。さらに HSC の未分化性の維持に、これらの遺伝子が関与している可能性があることを示した。

今回同定された標的遺伝子のさらなる機能や、正常造血において EVI1 とどのように関連しているかに関しては、今後ノックアウト細胞株や(条件付き)欠失マウスを利用した検証が必要であると考えます。また少ない細胞数でも網羅的に解析ができる技術が近年報告されており、正常マウスの *Evi1* 遺伝子領域の 3' 端に 3×FLAG タグをノックインしたマウスを用いての今後の検証も期待される。