

論文の内容の要旨

論文題目 Functional analysis of myeloid leukemogenesis induced by mutant ASXL1 and HHEX

(変異型 ASXL1 と HHEX による骨髄性白血病原性の機能的解析)

氏名 竹田玲奈

エピジェネティック調節因子である *ASXL1* (*Additional Sex Combs Like1*) 遺伝子の体細胞変異は、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患などの骨髄性造血器腫瘍において頻回に認められ、独立した予後不良因子であることが知られている。このような造血器腫瘍患者で検出される *ASXL1* 遺伝子変異の大半は、最終エクソンに生じるナンセンス変異もしくはフレームシフト変異である。その結果、C 末端側アミノ酸配列を欠損した変異型 ASXL1 タンパク (ASXL1-MT) 生じる。当研究室の先行研究において、造血器特異的にこの ASXL1-MT を発現させたコンディショナルノックイン (ASXL1-MT-cKI) マウスを樹立した。ASXL1-MT-cKI マウスは骨髄異形成症候群様の造血障害を来すが、2 年間の観察期間において骨髄性白血病の発症を認めなかった。このことから、骨髄性白血病への形質転換には *ASXL1* 変異のみでは不十分であり、付加的因子の関与が示唆されていた。そこで、先行研究において ASXL1-MT と協調して白血病への形質転換を誘導する因子を探索するために、ASXL1-MT-cKI マウスを用いて白血病レトロウイルス遺伝子挿入変異解析を行った。レトロウイルスを投与された ASXL1-MT-cKI マウスは、コントロール群と比較して早期に骨髄性白血病を発症することから、ASXL1-MT を有する造血幹前駆細胞は白血病発症の感受性が高まっていることが示唆された。また、白血病を発症したマウスの解析により、複数個体で共通して、ホメオボックスファミリー転写因子である *HHEX* (*Hematopoietically-expressed homeobox protein*) 遺伝子近傍にレトロウイルスが挿入変異されていることが明らかとなった。このことから、本研究では HHEX と ASXL1-MT の骨髄性白血病原性における潜在的協調作用の可能性について着目し検証することとした。

まず、ASXL1-MT と HHEX の協調性機能について、マウス及びヒトの造血幹前駆細胞を用いて *in vitro* で検討した。ASXL1-MT と HHEX は協調して造血幹前駆細胞の細胞増殖を促進し、細胞周期の S/G2/M 期の細胞割合を増加させ、アポトーシスや分化を抑制していることが分かった。またマウス移植モデルを用いて *in vivo* における協調性機能の検討を行った。RUNX1-ETO9a 及び FLT3-ITD 白血病モデルにおいて、ASXL1-MT と HHEX はマウス生体内においても協調して、白血病への形質転換を促進し、骨髄性白血病の発症を誘導すること明らかにした。

次に、CRISPR-Cas9 システムを用いて内在性 *HHEX* 遺伝子をノックアウトすることに

より、ASXL1-MT を発現する白血病細胞における内在性 HHEX の役割について検討した。当研究室で樹立した 2 種類のマウス白血病細胞 cSAM 細胞 (ASXL1 遺伝子変異と SETBP1 変異をマウス骨髄細胞へ遺伝子導入し形質転換したマウス白血病細胞) と cRAM 細胞 (RUNX1 遺伝子変異を ASXL1-MT-cKI マウス由来の骨髄細胞へ導入し形質転換したマウス白血病細胞) を用いた。またヒトの ASXL1 変異陽性の白血病細胞株として MEG-01 細胞や Kasumi-1 細胞を含む複数種類の細胞株を用いて検討を行った。内在性 HHEX 遺伝子を欠失した ASXL1 変異陽性の白血病細胞は、in vitro および in vivo において白血病原性が減弱した。ゆえに、内在性 HHEX は ASXL1 遺伝子変異を有する白血病細胞の細胞生存の維持において重要であることが示唆された。

さらにこの ASXL1-MT と HHEX の骨髄性白血病原性における協調作用の分子学的メカニズムを探索すべく、RNA シークエンス解析 (RNA-seq) 並びにクロマチン免疫沈降シークエンス解析 (ChIP-seq) を行った。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による解析では、ASXL1-MT と HHEX を共発現させた細胞は白血病幹細胞に関する遺伝子群の発現が上昇しており、一方で単球・マクロファージ分化に関する遺伝子群の発現が減少していた。また、ASXL1-MT と HHEX の標的遺伝子として MYB と ETV5 を同定し、ASXL1-MT と HHEX 発現状態による MYB 及び ETV5 の遺伝子発現レベルの変化について定量 RT-PCR 法を用いて検証した。ASXL1-MT と HHEX を共発現させたマウス骨髄細胞やヒト血液細胞では、MYB 及び ETV5 の遺伝子の発現レベルの増加が観察された。一方、内在性 HHEX 遺伝子をノックアウトさせたマウスおよびヒトの ASXL1 変異陽性白血病細胞においては、MYB 及び ETV5 の遺伝子発現レベルは有意に減少した。つづいて、HHEX や ASXL1-MT の MYB や ETV5 に対する遺伝子制御メカニズムについて、クロマチン免疫沈降及び定量 PCR 法を用いて検討した。HHEX は MYB および ETV5 のプロモーター領域に直接結合し、これらの遺伝子発現を上昇させることが分かった。また ASXL1-MT の発現により MYB 及び ETV5 のプロモーター領域における H2AK119 のユビキチン化レベルが減少することから、ASXL1-MT はこれら標的遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾を介して転写を促進していることが示唆された。また MYB 及び ETV5 のプロモーター領域に対するルシフェラーゼレポーターアッセイの解析から、HHEX と ASXL1-MT は、単独発現時よりも共発現させた時に、より強い転写活性を誘導したことから、HHEX と ASXL1-MT は上述のような異なるメカニズムを介して、共に標的遺伝子 MYB と ETV5 の遺伝子発現を促進することが示唆された。

最後に、ASXL1 変異を有する白血病細胞における内在性 MYB 及び ETV5 の役割について CRISPR-Cas9 システムを用いて検討した。内在性 MYB 遺伝子の欠失により、ASXL1 変異陽性の白血病細胞は、アポトーシスの亢進を認め、コロニー形成能及び細胞増殖能が減弱した。また ETV5 遺伝子の欠失は、白血病細胞の分化を促進し、コロニー形成能や細胞増殖能を減弱した。さらに、内在性 HHEX 遺伝子を欠失した cSAM 細胞に MYB もしくは ETV5 を発現させると、HHEX 喪失により減弱したコロニー形成能が部分

的に回復されることを示した。これらのデータから、マウス及びヒトの *ASXL1* 変異陽性白血病細胞において、*MYB* および *ETV5* は骨髄性白血病原性や細胞生存の維持において重要な役割を果たすことが示唆された。

以上より、本研究では *ASXL1*-MT と *HHEX* は協調して、標的遺伝子である *MYB* 及び *ETV5* の遺伝子発現を上昇させ、骨髄性白血病原性を促進していることを明らかにした。また *ASXL1* 遺伝子変異を有する白血病細胞において、*HHEX*-*MYB/ETV5* 経路は白血病原性や細胞生存の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究で得られた知見から、現在も治癒困難な予後不良因子 *ASXL1* 遺伝子変異を有する骨髄性造血器腫瘍の新規治療戦略として、*HHEX*-*MYB/ETV5* 経路を標的とした阻害薬等の治療法開発が期待される。