

審査の結果の要旨

氏名 竹田 玲奈

本研究は *ASXL1* 遺伝子変異を有する予後不良な骨髄性白血病において、重要な役割を演じていると考えられるホメオボックス転写因子である *HHEX* に注目し、マウスやヒトの造血幹前駆細胞や白血病細胞を用いた *in vitro* や *in vivo* の実験系で、骨髄性白血病原性における変異型 *ASXL1* と *HHEX* の協調作用の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *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。
2. 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いての内在性 *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（変異型 *ASXL1* と変異型 *SETBP1* 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（変異型 *RUNX1* 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。
3. *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) を行い、標的遺伝子として *MYB* と *ETV5* を同定した。定量 PCR 法にて、*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、一方で内在性 *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することが観察され

た。クロマチン免疫沈降及び定量 PCR 法にて、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。以上より、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。

4. *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。また内在性 *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* を強制発現させると、*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、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* の遺伝子発現亢進し、骨髄性白血病原性を促進していることを明らかにした。*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が示唆された。本研究で得られた知見から、治癒抵抗性で予後不良な *ASXL1* 遺伝子変異陽性の骨髄性造血器腫瘍に対する、新規治療戦略として、*HHEX*-*MYB*/*ETV5* 経路を標的とした阻害薬等は高い治療効果が期待できると考えられ、今後の難治性造血器腫瘍患者に対する治療法開発に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。