

博士論文

論文題目 ヒト白血病遺伝子 *EVI1* の制御因子の探索

氏 名 木暮 泰寛

# ヒト白血病遺伝子 *EVI1* の制御因子の探索

所属 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 血液・腫瘍病態学

指導教員 黒川峰夫 教授

氏名 木暮泰寛

## 目次

目次 .....	2
要旨 .....	5
序文 .....	6
実験方法 .....	13
細胞株と培養 .....	13
ゲノム DNA 抽出 .....	13
TALEN 発現ベクター及びドナーベクターの作成 .....	14
エレクトロポレーションによる TALEN 発現ベクター及びドナーベクターの導入 .....	16
付着細胞に対するトランスフェクション .....	19
ウェスタンブロットによる EVI1 及び GFP の発現確認 .....	19
フローサイトメトリー及びソーティング .....	20
cDNA library の作成 .....	21
培養細胞からの RNA 抽出、cDNA 作成、 <i>EVI1</i> , <i>MDS1EVI1</i> 発現量の定量 .....	24
アンフォトロピックレトロウイルス粒子の作成及びレトロネクチン法による細胞株 への感染 .....	26

ゲノム改変細胞株を用いたライブラリースクリーニング .....	27
shRNA を用いたノックダウン実験 .....	29
クロマチン免疫沈降 .....	31
結果 .....	33
TALEN によるゲノム改変 .....	33
ドナーベクターの構築 .....	36
ゲノム改変細胞株の選択 .....	38
細胞株への遺伝子導入、遺伝子導入後の GFP シグナル確認、Puromycin セレクシ ョン及び目的配列がゲノムに Integrate されていることの確認 .....	42
<i>MLL</i> 融合遺伝子はゲノム改変 HEL 細胞の GFP シグナルを増強する .....	48
cDNA ウイルスライブラリーの作成 .....	50
GFP 陽性細胞分画は濃縮できなかつた .....	53
Single cell sorting を併用したスクリーニング .....	55
HEC1B の改変 .....	59
改変 HEC1B 細胞において、 <i>EVI1</i> 発現と GFP シグナルは相関する .....	62
ゲノム改変 HEC1B 細胞の GFP シグナルは <i>MLL</i> 融合遺伝子によって上昇する ...	65

ゲノム改変 HEC1B を用いたライブラリースクリーニング.....	67
ヒストン修飾による <i>EVI1</i> 転写調節の検討.....	78
考察.....	82
参考文献.....	91
謝辞.....	106

## 要旨

白血病遺伝子 *EVII* は造血器腫瘍で高頻度に活性化されており、*EVII* 高発現白血病は極めて予後不良である。*EVII* が発現亢進する機構は不明な点が多い為、*EVII* 高発現制御機構について探索を行った。

TALEN を用いて *EVII*-2A-eGFP レポーター細胞を樹立した。また、*EVII* 高発現白血病細胞株の cDNA 発現ウイルスライブラリーを構築しスクリーニングを施行し、*EVII* up-regulator 候補因子の *AHR*, *TARDBP* を同定した。また、*EVII* のヒストン修飾を検討し、*EVII* 高発現に H3K4me3, H3K27me3 や H3K79me2 が関与している可能性を明らかにした。

## 序文

*EVII* (*ecotropic viral integration site-1*) は、ヒト染色体 3q26 上に位置する *MDS1 and EVII complex (MECOM)* locus にコードされている転写因子である。1988 年、*EVII* はマウス骨髄系腫瘍モデルでレトロウイルスの common integration site に存在する遺伝子として発見された<sup>1</sup>。*EVII* にはいくつかのアイソフォームが存在することが知られているが、これまで最もよく調べられているものは、1051 amino acid からなる 145 kD のタンパクである。このタンパクは N 末端より 7 つの zinc finger domain (第 1 zinc finger domain)、CtBP 結合ドメイン、central transcription repression domain、3 つの zinc finger domain (第 2 zinc finger domain)、そして C-terminal acidic region から構成されている<sup>2-4</sup>。

マウスモデルにおいて、Evi1 は胎児・成体の造血幹細胞特異的に発現している。Evi1 のホモ欠失個体においては、マウスは骨髄不全・出血・発育不全により E10.5 で死亡する。特に、Evi1 欠失により造血幹細胞が減少する<sup>5</sup>。

Evi1 を成体マウスでコンディショナルノックアウトすると、造血幹細胞の self-renewal が減少し、造血幹細胞の減少をきたす<sup>6</sup>。Evi1 は造血において重要であり、特に造血幹細胞を維持する上で必須の遺伝子であることがわかる。

ヒトにおいても、*EVII* 遺伝子は造血幹細胞と深く関連していると考えられている。 *EVII* 遺伝子は CD34 陽性分画の quiescence と関連している<sup>7</sup>。また、造血幹細胞で特徴的に発現している遺伝子の一部は *EVII* によって制御されていることが示唆されている<sup>8</sup>。

ヒトの疾患においては、*EVII* は急性骨髄性白血病 AML、慢性骨髄性白血病 CML あるいは骨髄異形成症候群 MDS などで高頻度に活性化されている転写因子である<sup>9-13</sup>。特に AML においては、*EVII* 高発現白血病は臨床的に特徴のある一群を形成していることが知られている。まず、成人のヒト白血病において、全体の 1%程度に認められる染色体異常  $\text{inv}(3)(\text{q}21\text{q}26)$ あるいは  $\text{t}(3;3)(\text{q}21;\text{q}26)$ は *EVII* の高発現を伴うことが知られている。この染色体異常は現在標準的に利用されている白血病分類基準である Classification of Tumors of haematopoietic and Lymphoid Tissues (2008)においても独立した病型として記載されている。これらの染色体異常を伴う白血病では、末梢血の血小板増多や、骨髄において異型を伴う巨核球が頻繁に観察される。また、*mixed lineage leukemia (MLL)* 関連白血病においては、約 27% で *EVII* の高発現が認められる<sup>14</sup>。これらの機序以外にも *EVII* の高発現を伴う白血病は知られており、ま



とめると白血病全体のおよそ 8–10%は *EVII* 高発現白血病である。*EVII* 高発現白血病は極めて予後不良であることが知られている<sup>13,15</sup>。例えば、285 名の白血病の遺伝子発現プロファイルと予後を関連付けて解析した Valk らの報告によると、*EVII* 高発現クラスターの予後は他のどのクラスターよりも予後不良であった<sup>13</sup>。また、昨今の Xenograft モデルの進歩によって、ヒト白血病においても Leukemia Stem Cells (LSCs) が存在することが知られるようになった。この LSC 分画では *EVII* を含む造血幹細胞関連遺伝子の発現が上昇している<sup>16</sup>。

*EVII* が転写制御する遺伝子はいくつか知られているものがある。例えば、*Gata2* や *Pbx1* については、*Evi1* がそれぞれの遺伝子の制御領域に直接結合し、転写を活性化させる<sup>5,17</sup>。あるいは、*EVII* は *PTEN* の転写を直接抑制することが知られている<sup>18</sup>。また、*EVII* は直接 *CEBPE* や *SERPINB2* の制御領域に結合し、転写を抑制する<sup>19</sup>。以上に示すように、expression profiling や chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequence を行うことで、*EVII* が制御する遺伝子(群)は比較的容易に網羅的に解析されうる。しかしながら、ヒト白血病においてどのように *EVII* はどのように制御され、発現亢進しているのかを調べるためには、上述のアプローチとは別種の方法が必要である。

*EVII* 発現制御における最も新しい研究は、inv(3)(q21q26)あるいは t(3;3)(q21;q26)異常に関するものである。この異常を伴う細胞では、本来 *GATA2* を制御すべきエンハンサーが *EVII* に近接することにより *EVII* の過剰発現に繋がることが示された<sup>20,21</sup>。これは、遺伝子転座という構造的なヒントに着目したアプローチである。また、*EVII* を正に制御する転写因子もこれまでに幾つか知られている。たとえば、*MLL* 白血病で高頻度に *EVII* が高発現していることを手がかりにして、*MLL/ENL* や *MLL/AF9* が *EVII* プロモーター領域に直接結合し転写を亢進させることが分かっている<sup>22</sup>。

より網羅的なアプローチとしては、Luciferase assay とコンピュータによる転写因子結合モチーフ解析がある。これらの組み合わせにより、*RUNX1* と *ELK1* が協調し *EVII* の転写を直接的に亢進させることがわかった<sup>23</sup>。しかし、この方法では転写調節領域の選択および候補遺伝子の両面で恣意的なバイアスが入ってしまうという可能性があった。そこで本研究では、更に網羅的にヒト細胞における *EVII* 制御分子の探索を行うため、cDNA ライブラリーによるスクリーニングを行うことを考えた。

スクリーニングを行うにあたって、レポーターとなるヒト細胞株を作成する必要があり、昨今発展したゲノム編集技術を応用した。任意の位置において染色体を切断する技術は、特に高次の哺乳細胞においてゲノム編集を行う上で重要である。染色体の切断によって遺伝子ノックアウトを導入できるほか、homology directed repair を誘発することで、外来配列を導入する事が可能である。染色体を切断する方法は、現在までに、zinc finger nuclease、Transcription activator-like effector nuclease、clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 といった系が広く用いられている<sup>24-28</sup>。*Xanthomonas* に由来する Transcription activator-like (TAL) effector と呼ばれる遺伝子群はアミノ酸の規則的な繰り返し構造から成り立っている。各繰り返しは DNA の塩基を認識することができる。遺伝子工学的に任意の順で繰り返し構造を構成した TAL effector に、DNA nuclease である FokI を融合させたタンパクを TAL effector nuclease (TALEN) とよぶ。TALEN は、DNA のプラス鎖とマイナス鎖の両側から FokI が切断点を挟むように設計することで、FokI が二量体を形成し、任意の DNA 配列を切断することができる<sup>26</sup>。

更に、*EVII* の転写調節は必ずしも転写因子によらない可能性を考慮した。エピゲノム修飾には DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、non-coding RNA などが含まれる。中でもヒストン修飾は、転写因子に直接依存せずに遺伝子発現を調整する機構である。ヒストンリジン残基のメチル化・アセチル化・リン酸化・ユビキチン化などによってクロマチン構造を変化させ、転写を詳細に制御していると考えられている<sup>29</sup>。この中でヒストンメチル化修飾に着目した。Histone H3 Lysine 4 tri-methylation (H3K4me3)は転写開始点と、H3K36me3 は転写伸長と関連している。また、H3K79me2 は転写伸長や DNA 修復、ヘテロクロマチンの維持に関与している。これらは転写を正に制御するヒストンマークである。また、H3K27me3 は Polycomb 複合体 2 (PRC2) により付加される転写抑制性のヒストン修飾として知られている

<sup>30,31</sup>。

本研究では、*EVII* がどのようにしてヒト細胞内において制御されているかを網羅的に検証することを目的とした。第一に、TALEN によりヒト細胞株をゲノム改変して *EVII*-eGFP レポーター細胞を樹立した。第二に、*EVII* 高発現白血球細胞株の mRNA から cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターに構

築した。この cDNA 発現ライブラリーを樹立した細胞株に感染させ、蛍光強度が上昇している細胞を単離・増殖させるというステップを繰り返すことで *EVII* の発現が十分に上昇している細胞を得、発現クローニングにより候補遺伝子の同定を行うことで、*EVII* を制御する新規分子を同定した。また、エピゲノミックな転写調節が *EVII*-high leukemia に関与している可能性を探索するために、*EVII* 転写開始点付近のヒストンメチル化を探索した。

## 実験方法

### 細胞株と培養

ヒト白血病細胞株 HEL, KU812, HL60、ヒト子宮体癌細胞株 HEC1B 及びヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293T は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。

浮遊細胞株である HEL, KU812 の培養は、10%ウシ胎児血清 (FCS、Biosera) 及び 100 unit/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich) と 100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) (1% PS) を添加調整した RPMI-1640 培地 (ナカライテスク) で行った。また、付着細胞株である HEK293T や HEC1B の培養は、同様に作成した 10%FCS・1%PS 添加 D-MEM 培地 (ナカライテスク) で行った。培養は、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で行った。

### ゲノム DNA 抽出

細胞株からのゲノム DNA の抽出は、2 種類の方法によった。

(1) TALEN ドナーベクターを作成する際及びゲノム改変細胞株の改変部位を特定するための PCR テンプレートを作成する際は、細胞に 50 mM NaOH 180 µl を加え、Vortex ミキサーで良く攪拌した後、95°C で 10 分間加熱した。そ

の後、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20  $\mu$ l で中和した後、反応液を 12000 rpm, 5 分間遠心して上清をテンプレートとして用いた。

(2) cDNA ライブラリースクリーニングを行った細胞の解析を行う際は、細胞を Proteinase K 入の溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS、200  $\mu$ g/ml Proteinase K) に溶解し、55°C で一晩処理した。その後、イソプロパノール・エタノール沈殿を行い、適宜 TE バッファーに溶解してテンプレートとして用いた。

#### TALEN 発現ベクター及びドナーベクターの作成

Joung Lab REAL Assembly TALEN kit (Addgene, Kit # 1000000017)<sup>32</sup> を入手し、添付のプロトコルに準じて行った。TALEN 構築は REAL 法を用いて行い、その設計は ZiFiT Targeter program (<http://zifit.partners.org/>) で行った。

EVI1-eGFP-2A-Puro ドナーベクターは、OCT4-eGFP-2A-Puro(Addgene, Plasmid #31939)<sup>26</sup> を改変することで作成した。ヒト線維芽細胞由来ゲノムをテンプレートとして、Table 1 のプライマーを用いて左右それぞれのアームをクローニングした。

**Table 1** ドナーベクターの左右アームをクローニングする際に用いたプライマ

ー

Name	Sequence
Sacl-LeftArm	GCCGAGCTCCTGTTGGGTCTTGTGTTTGG
Nhel-LeftArm	GCCGCTAGCTACGTGGCTTATGGACTGGA
Ascl-RightArm	GCCGGCGCGCCCGTTATCAAGGTTGACCAGAG
NotI-RightArm	GCCGCGGCCGCTGATACACGCAACACACACAA



エレクトロポレーションによる TALEN 発現ベクター及びドナーベクターの導入

浮遊細胞である HEL への遺伝子導入は、NEPA21 electroporator (ネッパジーン) によった。目的の細胞  $1 \times 10^6$  個及びプラスミド  $10 \mu\text{g}$  を OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific)  $100 \mu\text{L}$  にサスペンドし、 $2 \text{ mm}$  gap キュベットに入れて電気刺激を与えた。電気条件は予め同細胞で pCMV-eGFP (ネッパジーン株式会社) を用いた予備実験を行って生存率や遺伝子導入効率から至適条件を求めておき、その条件を用いた (Table 2)。TALEN 発現ベクター (Left-arm  $2 \mu\text{g}$ , Right-arm  $2 \mu\text{g}$ ) とドナーベクター  $6 \mu\text{g}$  を HEL に導入した後、一晩  $10\% \text{FCS} \cdot 1\% \text{PS}$  添加 RPMI 培地で培養し、翌日に Puromycin (Sigma-Aldrich)  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  でドナーベクターの挿入されているクローンを選抜した。また、ゲノム上の目的位置にドナーベクター配列が挿入されていることを確認するため、細胞からゲノムを抽出し、Table 3 のプライマーを用いて DNA 断片の増幅を確認した。

**Table 2 HEL に対する遺伝子導入条件 (NEPA21)**

Parameters	Poring pulse	Transfer pulse
電圧 V	200	20
パルス幅 ms	5	50
パルス間隔 ms	50	50
回数	2	5
減衰率 %	10	40
極性	+	+/-

**Table 3** EVI1-2A-eGFP-PGK-Puro の挿入確認用プライマー

Name	Sequence
5' integ.-F	TTGATTAGAACAACACTGTTGGGTCT
5' integ.-R	ACATCCCCTGCTTGTTTCAA
3' integ.-F	GAAGGATTGGAGCTACGGGG
3' integ.-R	CAAGCTTGCAGACAACCAGC

## 付着細胞に対するトランスフェクション

HEK293T、HEC1B といった付着細胞に対するトランスフェクションは全て polyethylenimine (PEI; Polysciences) を用いた。PEI の調整は既報によった<sup>33</sup>。

10 cm 培養皿でのトランスフェクションを行う際、Opti-MEM 500  $\mu$ l に目的の plasmid を加え、更に PEI を DNA 1  $\mu$ g に対して 8  $\mu$ l の割合で加えて Vortex ミキサーで攪拌した。この溶液を室温で 10-15 分間 incubate した後に目的の細胞に添加した。

## ウェスタンブロットによる EVI1 及び GFP の発現確認

ゲノム改変 HEL 細胞を  $10^6$  個回収し、lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% NP-40, 0.2% aprotinin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 12.5 mM  $\beta$  glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail) で細胞を溶解し回収した。4°C、30 分間攪拌溶解後、15000 rpm で遠心後の上清を溶液として回収し、一部を Bradford protein assay 液 (BioRad) で希釈しタンパク濃度を測定した。タンパク 100  $\mu$ g を含む溶液に等量の sample buffer (0.1 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenolblue, 10% 2-mercaptoethanol) を加え、100°C で 3 分間煮沸して変性させた。このサンプルを SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis で分析した。130 mA・2時間の通電でブロッキングを行い、タンパクをメンブレンに吸着させた。スキムミルク 10%を含む TNT buffer でブロッキングを行い、1000 倍希釈した一次抗体（anti EVI1, anti GFP, anti  $\beta$ -actin; いずれも Cell Signaling Technology）と 4°C overnight で反応させた。horse radish peroxidase (HRP) 結合抗ウサギ抗体（Amersham）と室温で 1 時間反応させた。TNT buffer で洗浄後、ImmunoStar LD (Wako)と反応させて CCD イメージャーで検出した。HEK293T 細胞に pCMV-eGFP を PEI 法でトランスフェクションしてタンパクを抽出し、GFP のポジティブコントロールとして用いた。EVI1 のポジティブコントロールとしてはゲノム改変前 HEL 細胞を用いた。バンド濃度の半定量は ImageJ を用いた<sup>34</sup>。バンド部分・background のピクセル平均濃度をそれぞれ算出し、background の値を減算したのち  $\beta$ -actin との比をとった。

#### フローサイトメトリー及びソーティング

フローサイトメトリーによる GFP シグナルの解析はすべて FACS LSRII（Becton Dickinson）を用いた。GFP シグナルを解析する際、FITC シグナルと相互に漏れ込みのない APC シグナルで展開することによって、自家蛍光を発

する細胞集団を除くように工夫した。セルソーティング、及びシングルセルソーティングは FACS Aria II (Becton Dickinson) を用いて実施した。

#### cDNA library の作成

$2 \times 10^7$  個の KU812 培養細胞を TRI REAGENT (Sigma) で処理し、total RNA を抽出し DNaseI 処理した。MicroPoly(A)Purist Kit (Ambion) を用い、製造者のプロトコルにしたがって poly-A RNA を抽出した。Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega) で cDNA ライブラリーの作成及び EcoRI アダプターの付与を行った。基本的には製造者のプロトコルに従ったが、DNA のクリーンアップは AMPure (Beckman) を用いるよう改変した。また、ゲルクロマトグラフィー (Sephacryl S-400) で短鎖除去を行うステップは 2 回行った。

pMXs-NEO ベクターを EcoRI で消化し、TSAP (Promega) 処理した。cDNA 断片とベクターの ligation は Ligation High ver. 2 (TOYOBO) を用い、4 °C overnight で反応させた。cDNA 断片の長さを Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA キット (Agilent) を用いて定量した。

Electrocompetent な大腸菌として E. coli HST08 Premium Electro-Cells

(TaKaRa) を用いた。形質転換は Gene Pulser (Bio-Rad) を用い、0.1 cm gap

のキューベットで 200  $\Omega$ 、25  $\mu\text{F}$ 、1.5 kV の電気条件で行った。SOC 培地で 1 時間振盪した後、ペニシリンを添加した 2xTY アガロースプレート上にプレーティングした。また、Primary Titer 計測のために一部を適宜希釈して plating した。翌日、プレート上に増殖した大腸菌を回収しプラスミドを抽出した。また、Table 4 のプライマーでコロニーPCR を施行し、ライブラリーの integrity 及び平均長を評価した。

**Table 4** コロニーPCR用プライマー

Name	Sequence
COLONY F	GACGGCATCGCAGCTTGGATACAC
COLONY R	ACCCTAACTGACACACATTCC



培養細胞からの RNA 抽出、cDNA 作成、*EVII*, *MDS1EVII* 発現量の定量

RNA 抽出は、細胞数に応じて NucleoSpin RNA あるいは NucleoSpin RNA XS (Machery-Nagel) を用いた。逆転写は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) で行った。いずれのステップも、製造者推奨のプロトコルに従って行った。

*EVII*、*MDS1EVII* 及び *18S rRNA* の発現量は、LightCycler 480 リアルタイム PCR システム (Roche) を用いて定量した。使用したプライマーは Table 5 に示した。*EVII*, *MDS1EVII* の発現量はハウスキーピング遺伝子である *18S* に対する相対値として評価した。

**Table 5** *EVII, MDS1EVII* の定量 PCR に用いたプライマー

Name	Sequence
EVI1 F	TATTGCTGAGTTGAGGCCATAG
EVI1 R	GTACTTGAGCCAGCTTCCAACA
MDS1EVI1 F	GAAAGACCCCAGTTATGGATGG
MDS1EVI1 R	GTACTTGAGCCAGCTTCCAACA
18S F	CGGCGACGACCCATTCTGAAC
18S R	GAATCGAACCCTGATTCCCCGTC

アンフォトロピックレトロウイルス粒子の作成及びレトロネクチン法による細胞株への感染

レトロウイルス産生細胞である Plat-A 細胞を、10% FCS・1% PS 及び 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromycin (Sigma-Aldrich)、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  blasticidin (Sigma-Aldrich)を添加調整したダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。径 10 cm の培養皿に同細胞を 2x10<sup>6</sup> 個撒き、PEI 法でプラスミド 20  $\mu\text{g}$  をトランスフェクションさせた。72 時間培養し、ウイルス粒子を産生させた後、遠心及び 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターによる細胞除去の上、ウイルスを含む培養液を回収した。

HEL に対しては、レトロネクチン (TaKaRa) を用いてウイルス粒子の感染を行った。プロトコルは製造者推奨のマニュアルで RetroNectin-bound virus 法として紹介されているものに依った。

HEC1B に対しては、ポリブレン 8 ng/mL 存在下で上記のウイルス液を overnight で反応させることで感染を成立させた。

cDNA ウイルスライブラリー感染細胞を 3 mg/mL G418 (Wako) で 1 週間培養することで感染成立細胞の選別を行った。

cDNA ウイルスライブラリーの感染効率を調べる目的では pMXs-eGFP-Neo ベクターより作成したウイルス液を感染させ、感染後 2 日に FACS による GFP 陽性分画を評価した（この際 G418 スクリーニングは行わなかった）。

#### ゲノム改変細胞株を用いたライブラリースクリーニング

ゲノム改変細胞株に cDNA ライブラリー発現ウイルスライブラリーライブラリーを感染させ、Single-cell sort した。細胞が増殖した段階でゲノムを採取し、PCR（Table 4）または nested-PCR（Table 6）で挿入断片を評価した。増幅断片を Exosap-IT（Affymetrix）で処理し、2<sup>nd</sup> round 用のプライマーでサンガーシーケンスした。シーケンス結果は Basic Local Alignment Search Tool（BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>）の Nucleotide Blast（blastn algorithm）を用いて分析した。得られた候補遺伝子を PANTHER Classification System (<http://pantherdb.org/>)<sup>35</sup> で分析した。

**Table 6** nested PCR に用いたプライマー

Name	Sequence
nest_1st F	ACTGGAAAGATGTCGAGCGG
nest_1st R	CCAAACCTACAGGTGGGGTC
nest_2nd F	CGCCGACACCAGACTAAGAA
nest_2nd R	GAACCTGCGTGCAATCCATC

## shRNA を用いたノックダウン実験

Table 7 に示した short hairpin RNA (shRNA) 配列を pRSI12-U6-sh-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro レンチウイルスベクターに挿入した。10% FCS・1% PS を添加調整した D-MEM で HEK293T 細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベータ内で培養した。径 10 cm の培養皿に同細胞を 2x10<sup>6</sup> 個撒き、PEI 法でプラスミド 8 µg をトランスフェクションさせた。この際、pMD2.G : psPAX2 : ウイルスベクター = 1:3:4 の重量比で混合した。72 時間培養し、ウイルス粒子を産生させた後、遠心及び 0.45 µm フィルターによる細胞除去の上、ウイルスを含む培養液を回収した。各種細胞には、ポリブレン 8 ng/mL 存在下で overnight で反応させることで感染を成立させた。1 µg/mL puromycin を添加し、ウイルス感染細胞を選抜した。

**Table 7 shRNA 配列**

Name	shRNA Sequence
shAHR#1	GGAATCAAGTCAAATCCTTCC
shAHR#2	GAACCAAACACAAACTAGACT
shTARDBP	GGTGTATGTTGTCAACTATCC

## クロマチン免疫沈降

細胞を  $1 \times 10^7$  個用意し、室温の 37%ホルマリンで 15 分間処理し、クロスリンクを行った。このゲノム DNA は NMase (New England Biolabs Japan) で 15 分間処理した後、Bioruptor UCD-300 (コスモ・バイオ) で 250W、30 秒オン-60 秒オフを 10 サイクルのプロトコルで断片化した。Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) と rabbit IgG (Cell Signaling Technology) , H3K4me3 (Upstate), H3K27me3 (Upstate), H3K36me3 (Abcam), H3K79me2 (Abcam) を 4°C で 3 時間以上反応させておき、これに断片化したゲノム DNA を加えて 4°C で一晩反応させた。反応後、6 回洗浄した後に溶出し、脱クロスリンク反応を行ってから QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した。後述のプライマー (Table 8) を用いて各 DNA 断片を LightCycler 480 リアルタイム PCR システムで定量し、Input サンプルに対する存在比を算出した。alpha-satellite, BDNF intron, GAPDH promoter はそれぞれ H3K36me3, H3K27me3, H3K4me3/H3K79me2 のポジティブコントロールとして置いた。



**Table 8 ChIP-qPCR に用いたプライマー**

Name		Sequence
EVI1(1)	F	TTTCCTTGTTCCCTCCTGCGAA
EVI1(1)	R	GGCAGAGAAACCCACCGAAG
EVI1(2)	F	TCGAAACGGAGGCTATTTCCC
EVI1(2)	R	GAGGTCACAAAAAGGTCGCC
EVI1(3)	F	CCTACCGACGTTTCCTCGTT
EVI1(3)	R	GGGGAACCGATTGCTTCAGA
EVI1(4)	F	AGTGCTGTTTGTCCACAGGA
EVI1(4)	R	GTCCAGCCAAAGCCAGATGA
EVI1(5)	F	CCAGACTGACCCAGCAAAT
EVI1(5)	R	GCTCGAGGATTCAGGCATGT
alpha-satellite	F	CTGCACTACCTGAAGAGGAC
alpha-satellite	R	GATGGTTCAACACTCTTACA
BDNF intron	F	ACCCCAACCTCTAACAGCATT
BDNF intron	R	TGTCTCTCAGCAGTCTTGCATT
GAPDH promoter	F	CCCAACTTTCCCGCCTCTC
GAPDH promoter	R	CAGCCGCCTGGTTCAACTG

## 結果

### TALEN によるゲノム改変

まず、ヒト白血病細胞株である HEL を用いて、*EVII* の最終コドン以降を 2A-eGFP に置換した *EVII*-2A-eGFP レポーター細胞株を作成する実験を行った。2A 配列は、手足口病ウイルスに由来する 18 アミノ酸長の配列である。翻訳された後に自然に切断し、2A 配列を挟む前後のタンパクを同モル数生成すると考えられている<sup>36</sup>。

TALEN の設計を行うため、ZiFiT を用いて *EVII* の終止コドン付近を検索クエリとし、TALEN のターゲット配列を求めた (Table 9)。また、同プログラムで REAL 法による TALEN クローニングのワークフローを作成した (Figure 1)。

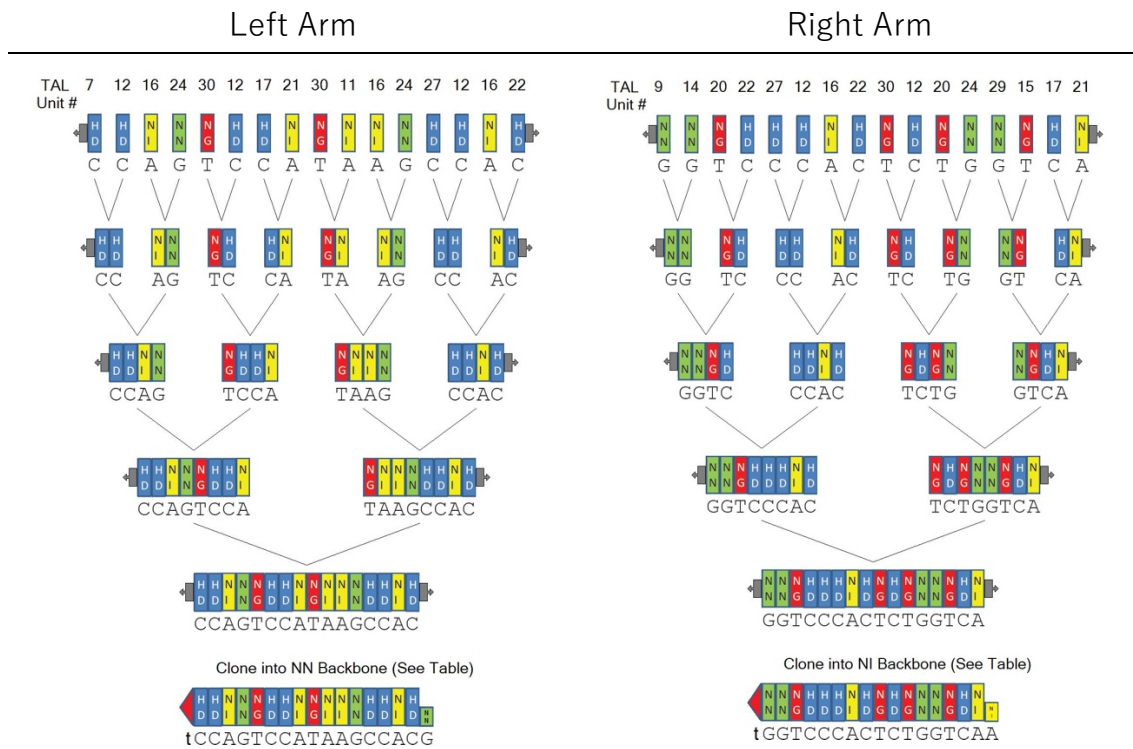
**Table 9** ZiFiT プログラムのクエリ (TALEN の設計)

```
TGAACATATGTAGTGGATGGATGACTGTATTTATAGTTGAACAGGAGAC
TGA CTCATTTTTCTCAATGGAAGCACTATTTGCATTTTAGGTAGGATAGTT
CTTTTTGGTTCTGTAGCGTGTGTCAC TTTGGGGCCCCTAGGCACTAAAGG
CCAGCAGTAATCCCATGTGGTTTCTACAAAAAATATGCCTTCTTTGCCAAA
CACACCCATGAAGGATGCCCCTACTCAGGGTCCCATCCCTTCCATTTACC
ACAATATTCTTTGAACTAAAAGTGATGTTTTTCAAATGCCATTTACTGAG
TCTCTCTCCTTTTTACCCAGGCATATGCTATGATGCTGTCAC TGTCTGAC
AAGGAGTCCCTCCATTCTACATCCCACAGTTCTTCCAACGTGTGGCACAGT
ATGGCCAGGGCTGCGGCGGAATCCAGTGCTATCCAGTCCATAAGCCACGT
A[T]GACGTTATCAAGGTTGACCAGAGTGGGACCAAGTCCAACAGTAGCAT
GGCTCTTTCATATAGGACTATTTACAAGACTGCTGAGCAGAATGCCTTATA
AACCTGCAGGGTCACTCATCTAAAGTCTAGTGACCTTAAACTGAATGATT
TAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAAAGAAACTATTTATTCTCGATATTTTGTT
TTGCACAGCAAAGGCAGCTGCTGACTTCTGGAAGATCAATCAATGCGACT
TAAAGTGATTCAGTGAAAACAAAAAACTTGGTGGGCTGAAGGCATCTTCC
AGTTTACCCACCTTAGGGTATGGGTGGGTGAGAAGGGCAGTTGAGATGG
CAGCATTGATATGAATGAACACTCCATAGAACTGAATTCTCTTTTGTACA
AGATCACCTGACATGATTGGGAACAGTTGCTTTTAATTACAGATTTAATTT
TTTTCTTCGTTAAAGTTTTATGTAATTTAA
```

Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p2 Primary Assembly

169084431 to 169085368, minus strand

※ [T]は *EVII* の終止コドン TGA の 1 つ目の塩基であり、プログラムに切断ターゲットとして認識させるためにブラケットで括弧してある。



Target sequence

TCCAGTCCATAAGCCACG

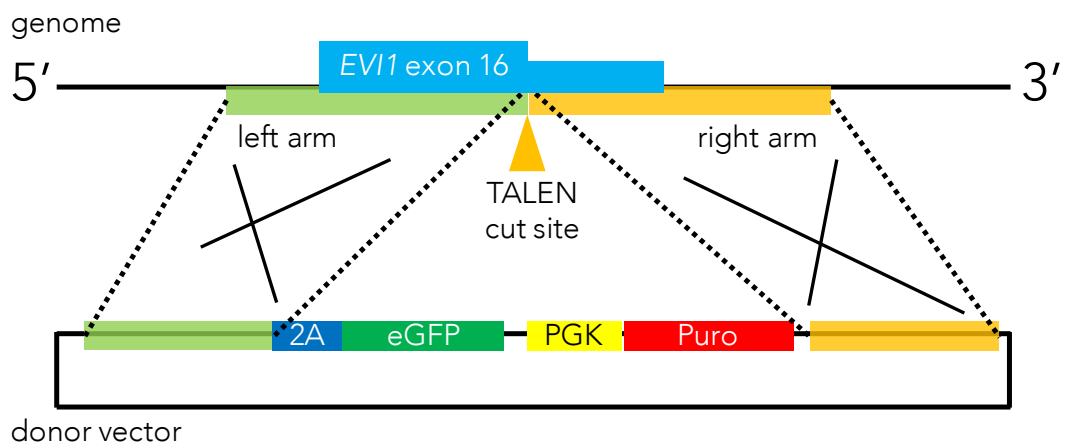
TTGACCAGAGTGGGACCA

**Figure 1** TALEN の設計 (モジュールの連結設計図)

上記設計図にしたがって TALEN の各モジュールを連結した。また、最終的に完成した TALEN (Left / Right arm) がターゲットとする配列を示した。

## ドナーベクターの構築

TALENによって編集したい領域に double strand break を導入すると同時に当該領域と相同な配列をもったドナーベクターを細胞内に導入することで、ゲノム修復機構である homologous recombination が誘導される。この機構により、高効率なゲノム編集が可能となる。OCT4-2A-eGFP-PGK-Puro ベクターを Figure 2 の如く *EVII* 領域にマッチするよう改変し、用いることにした。



**Figure 2** EVI1-2A-eGFP-PGK-Puro ベクターの構築 (模式図)

*EVI1* の exon 16 上にある終止コドン付近を TALEN が切断すると、同時に細胞へ導入されたドナーベクターと homologous recombination が誘発される。組換えの模式図を示した。

## ゲノム改変細胞株の選択

AMLにおける *EVII* の overexpression は、*inv(3)/t(3;3)*異常による場合とそれによらない場合が知られている。前者では、異常によって *GATA2* エンハンサーが *EVII* に近接することによって *EVII* が高発現となることがわかっているの<sup>20,21</sup>、後者のメカニズムを研究するために *inv(3)/t(3;3)*異常がなく、かつ *EVII* 発現を認める細胞株を用いることにした。また、*EVII* の発現がない白血病細胞株については、エピゲノミックな転写調節により *EVII* 発現がシャットダウンされている可能性が懸念された。その場合、外来遺伝子を導入しても、*EVII* の転写に対する影響が正確に評価できない可能性があると考えた。

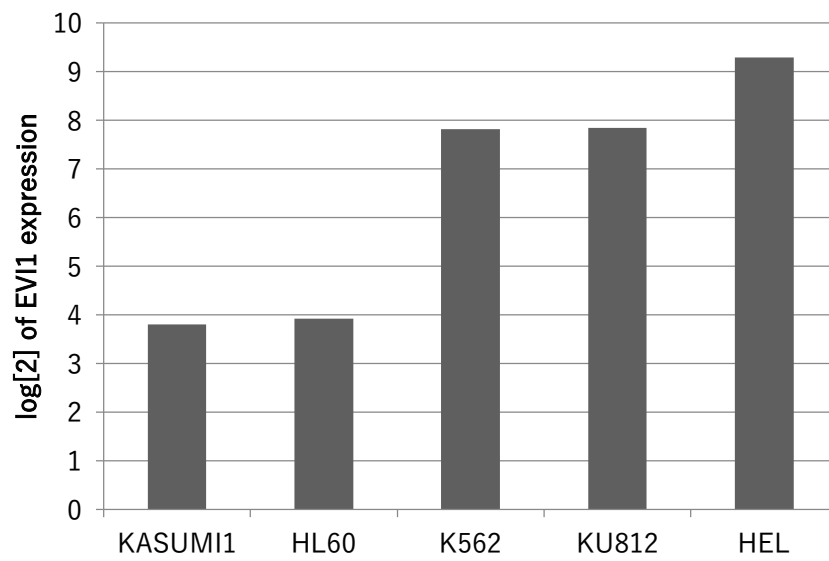
Vázquez らの検討<sup>37</sup>を参考に、3q26 異常のない細胞株として KU812 を候補とした。KU812 は増殖が遅く、またウイルス感染等の刺激に弱い細胞であったため、少なくとも *inv(3)/t(3;3)*異常はない細胞（ただし、*EVII* のプロモーター領域に非生理的な異常は存在する）として HEL も候補とした。

これらの細胞を含む白血病細胞株で、既存の *EVII* (*MECOM*) の発現量を Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, <http://www.broadinstitute.org/ccle>)<sup>38</sup> で評価した (Figure 3)。また、各種細胞から得た cDNA を RT-qPCR で解析すること

でも *EVII* の発現量を評価した (Figure 4)。これらの結果から、KU812 や HEL では *EVII* がそれぞれ中程度・中～高度に発現していることがわかった。

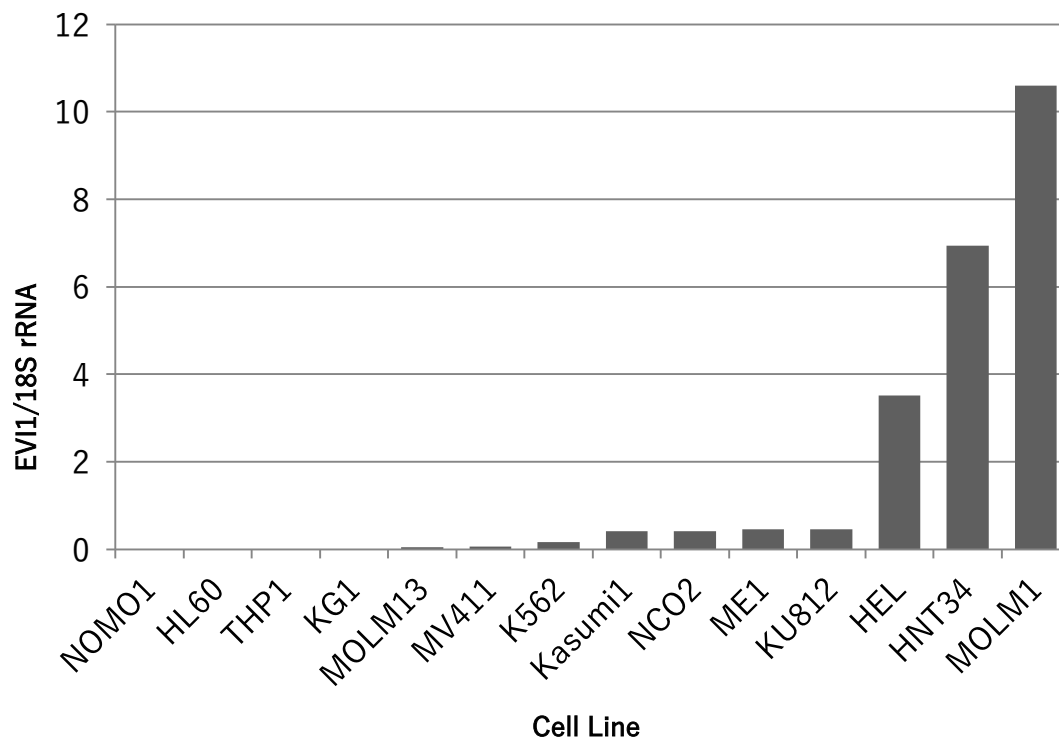
以上の検証から、KU812 や HEL は目的とするスクリーニングを可能にする細胞であると考えられた。以下の実験では、まず HEL のゲノム改変を行った。





**Figure 3** CCLE による *EVII (MECOM)* の発現量評価

CCLE に登録された各細胞株における *EVII (MECOM)* の発現状況を示した。*EVII* 発現量は Kasumi1, HL60 では少なく、K562, KU812, HEL では高いことがわかった。



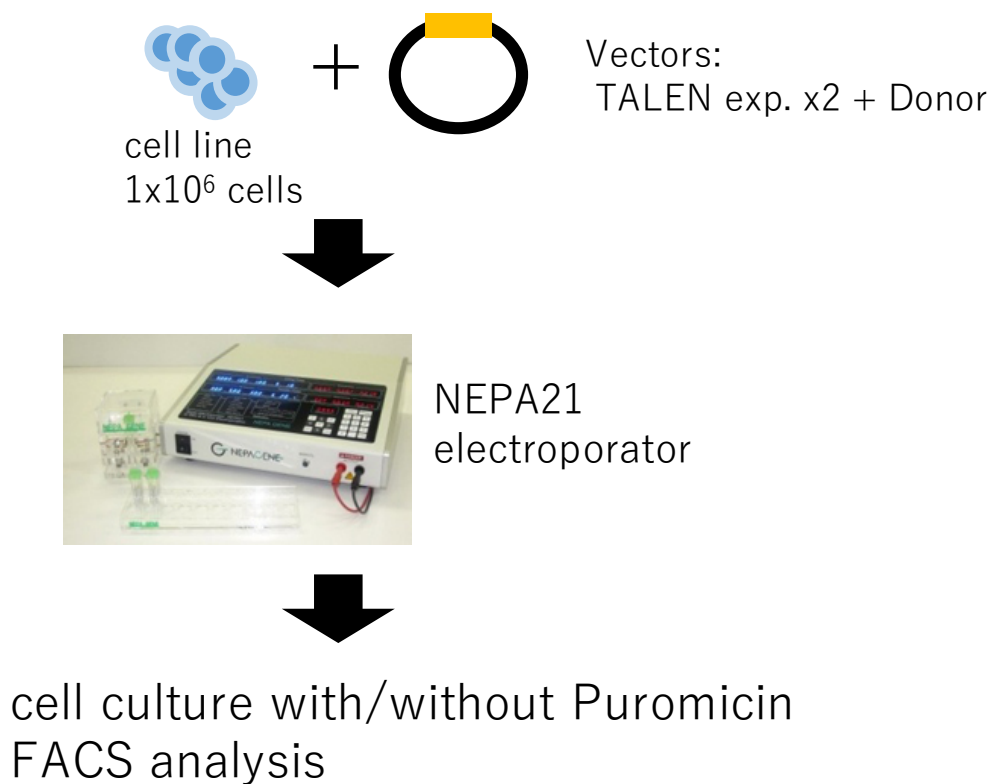
**Figure 4** 各種細胞株の *EVI1* 発現量評価

各細胞株から作成した cDNA における *EVI1* の発現量の平均値を qPCR 法で測定した (N=1)。約半数の細胞株では *EVI1* 発現を認めなかった。inv(3)/t(3;3) 異常のある HNT34, MOLM1 などでは *EVI1* 発現量が高度に亢進していた。HEL は inv(3)/t(3;3) を有さないが 3q26 に非生理的な異常を有しており、*EVI1* 発現は亢進していた。KU812 は inv(3)/t(3;3) を有さず、*EVI1* は中程度に発現していた。

細胞株への遺伝子導入、遺伝子導入後の GFP シグナル確認、Puromycin セレクション及び目的配列がゲノムに Integrate されていることの確認

一般に浮遊細胞株への遺伝子導入は、付着細胞系に比べて効率が劣ることが知られている。そのため HEL への遺伝子導入は Jurkat などの浮遊細胞系で高効率な遺伝子導入を達成している<sup>39</sup> NEPA21 エレクトロポレーターを用いることにした。

TALEN 発現ベクターをエレクトロポレーションした後、Puromycin で選択した。選択開始後 3 日における細胞をフローサイトメトリーで解析すると、GFP 陽性分画が出現することが分かった (Figure 6-A)。また、Puromycin による選択を継続することによって、GFP 陽性分画が濃縮される事がわかった (Figure 6-B)。限界希釈法でクローン化したゲノム改変後の HEL に対し Figure 7 に示すプライマー 2 セットを用いて genomic DNA を PCR で増幅し、目的の位置にドナーベクター配列が挿入されていることを確認した (Figure 8)。ゲノム改変 HEL において、GFP がタンパクとして存在していることをウェスタンブロットで確認した (Figure 9)。以上より、TALEN によるゲノム改変技術を用いて、*EVII* レポーター細胞であるゲノム改変 HEL 細胞を樹立することができた。



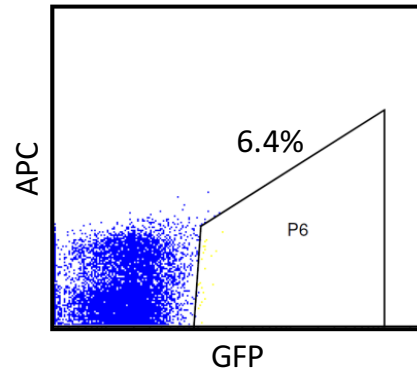
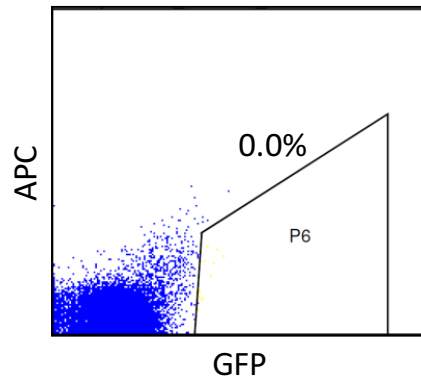
**Figure 5** 浮遊細胞への遺伝子導入ワークフロー

細胞株  $1 \times 10^6$  個に対してベクター  $10 \mu\text{g}$  を NEPA21 エレクトロポレーターで導入した。写真はネッパジーン株式会社 Web サイトより引用した。

A. Electroporation 3 日後

control (EP なし)

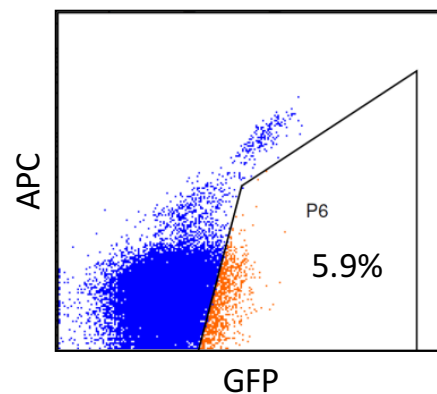
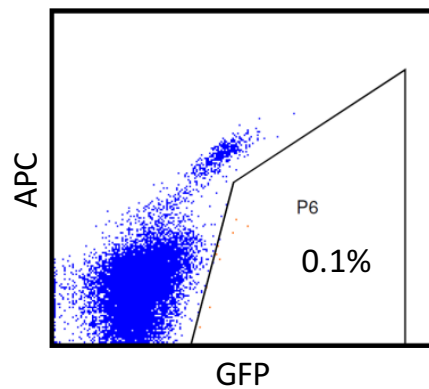
TALEN・ドナー導入 (EP あり)



B. Electroporation 後、Puromycin セレクション後

Control (EP なし、Puro なし)

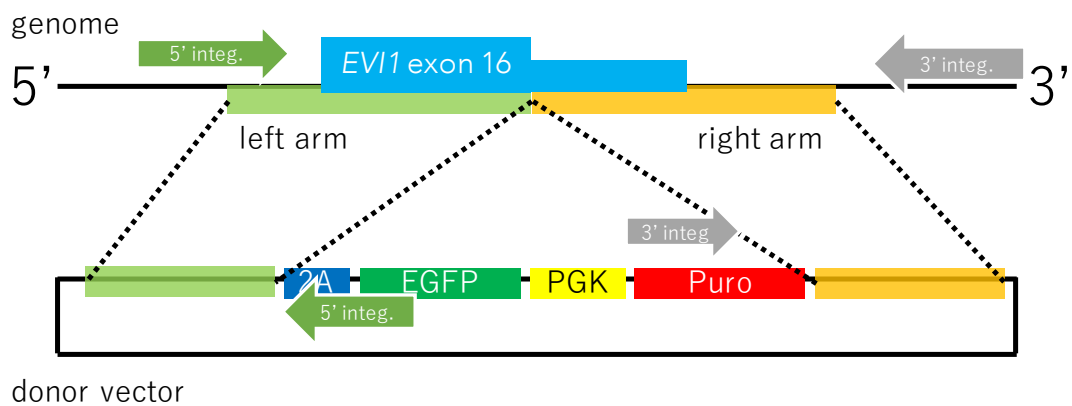
TALEN・ドナー導入後、Puro あり



**Figure 6 HEL に対する遺伝子導入後、GFP シグナルが確認された**

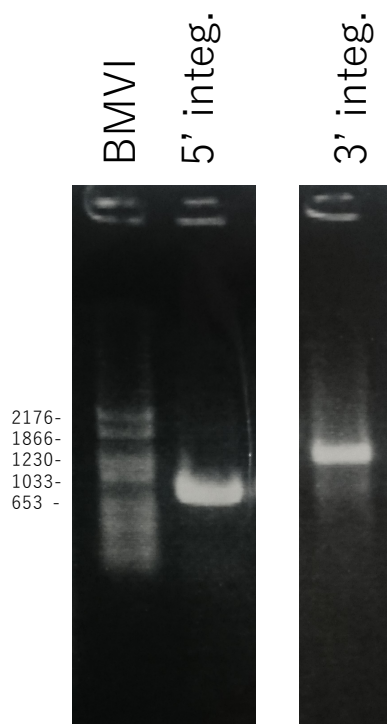
遺伝子導入後しばらくすると、一部の細胞でゲノム改変に成功し、フローサイトメトリーで GFP シグナルを検出することができた。GFP シグナル陽性分画は puromycin セレクションを施行することでさらに濃縮することができた。

EP: electroporation, Puro: puromycin



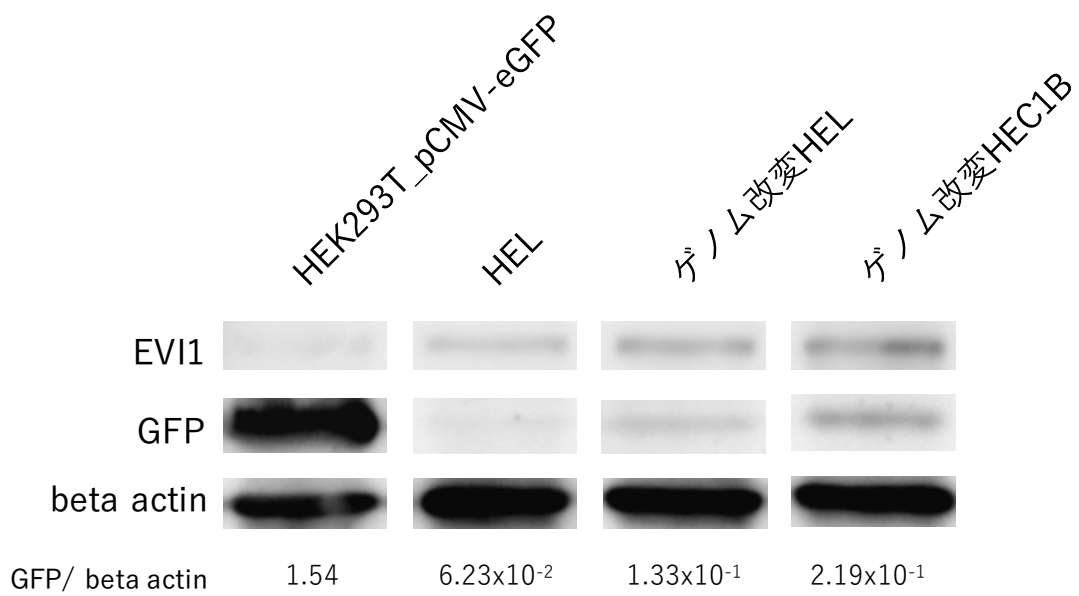
**Figure 7 EVI1-2A-eGFP-PGK-Puro** ドナーベクター配列がゲノム上の正しい位置に挿入されていることを確認するための PCR プライマー位置

図の 5', 3' それぞれのプライマーペアはゲノム及びドナーベクター上の特異的配列に対して設計されているため、ゲノム上の正しい位置に配列が挿入されている時のみ PCR 産物が生じる。5'側、3'側の PCR 産物はそれぞれ 846 bp, 1563 bp となるように設計した。



**Figure 8** ゲノム改変 HEL で目的位置にドナーベクターがインテグレーションされていることを確認する PCR 結果

5', 3' のインテグレーションを確認するプライマーに対して目的のバンドが確認された。BMVI: molecular marker。



**Figure 9** ゲノム改変細胞における GFP 発現

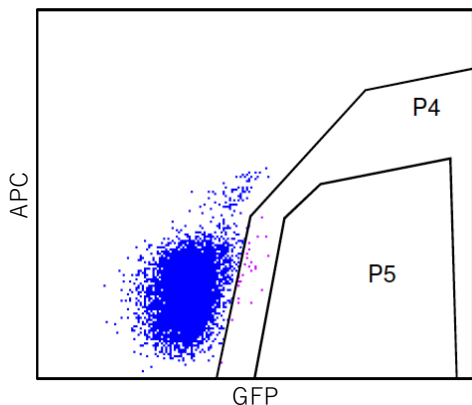
ゲノム改変細胞からタンパクを抽出し、EVI1, GFP,  $\beta$ -actin の発現をウェスタンブロットで確認した。



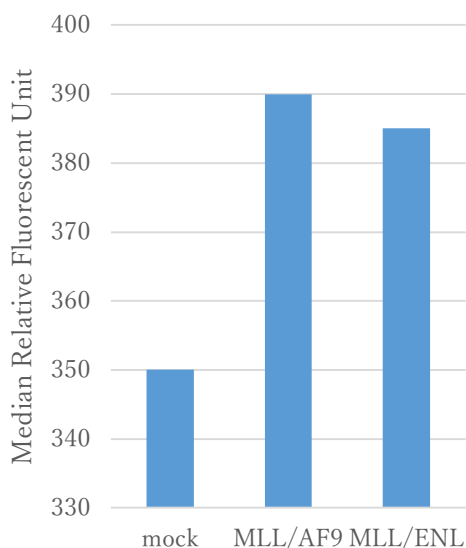
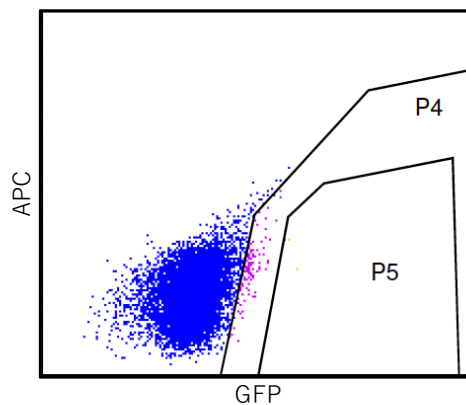
*MLL* 融合遺伝子はゲノム改変 HEL 細胞の GFP シグナルを増強する

*MLL/AF9* や *MLL/ENL* といった *MLL* 融合遺伝子は、*EVII* 制御領域に直接結合し、*EVII* を正に制御することがわかっている<sup>22</sup>。pMXs-*MLL/AF9*-Neo ベクターや pMXs-*MLL/ENL*-Neo ベクターを用いてアンフォトロピックレトロウイルスを作成し、ゲノム改変 HEL 細胞に感染させた。感染成立細胞を G418 でスクリーニングし、GFP シグナルを解析したところ、*MLL* 融合遺伝子導入細胞では GFP シグナルが増強することが分かった (Figure 10)。これは既報とも一致する結果であり<sup>22</sup>、この細胞株をスクリーニングに用いることは妥当と考えられた。

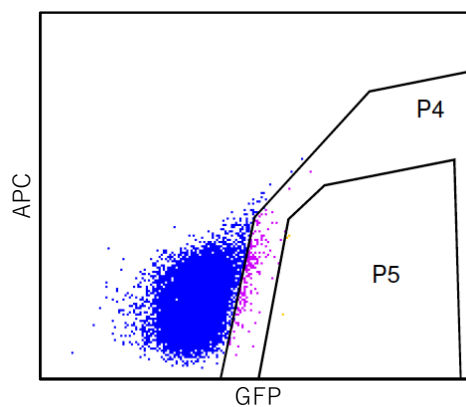
Non-infection Control



MLL/AF9



MLL/ENL



**Figure 10** *MLL* 融合遺伝子を導入したゲノム改変 HEL 細胞の GFP シグナル

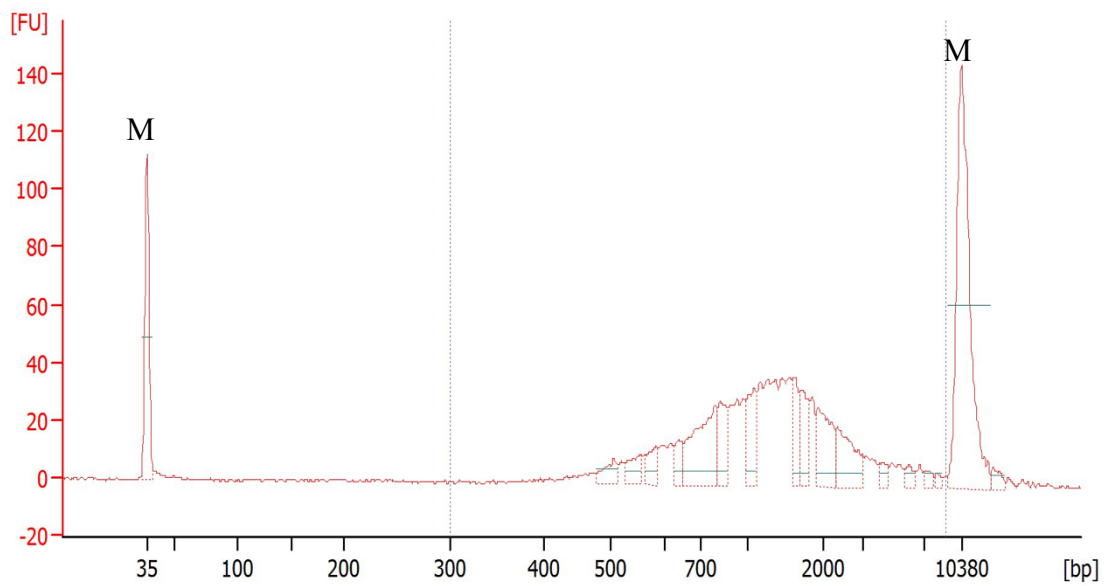
*MLL* 融合遺伝子をウイルスで導入し、感染細胞を G418 でセレクションしてから GFP シグナルをフローサイトメトリーにより評価した (N=1)。P4, P5 領域は GFP シグナル強度の比較のため、non-infection control の分布を参考に設定しており、各プロットに共通している。棒グラフは各集団の GFP シグナルの中央値を示している。*MLL* 融合遺伝子導入により、GFP シグナルが増強した。

## cDNA ウイルスライブラリーの作成

*EVII* の up-regulator をライブラリースクリーニングするため、*EVII* 高発現細胞株より 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<sup>40</sup>。細胞株の選択においては、生理的なプロモーター領域を有して *EVII* が高発現している細胞株が、*EVII* up-regulator を多量に発現している可能性が高いと考え、3q26 異常を有さず比較的 *EVII* を高発現している細胞株である KU812 を用いることにした。

RNA を抽出した後に、キットを用いて cDNA ライブラリーを作成した。

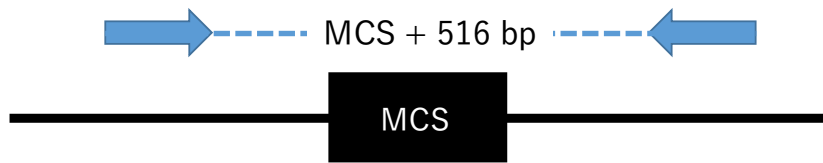
EcoRI リンカーをライゲーションした cDNA 断片をゲルクロマトグラフィーによって短い断片を除いた段階での断片長の分布は、Figure 11 に示すとおりであり、cDNA 断片の平均長は 1.6 kb であった。この断片を pMXs-NEO ベクターにライゲーションし、エレクトロコンピテントな大腸菌で増幅した。この際の Primary Titer は  $2.1 \times 10^6$  CFU だった。また、コロニーPCR の結果から、クローニングされた cDNA ライブラリーの長さは様々であり、Integrity は保たれていると考えられた (Figure 12)。cDNA の平均長を電気泳動の結果から算出すると、 $0.7 \times 10^3$  bp だった (Figure 12)。



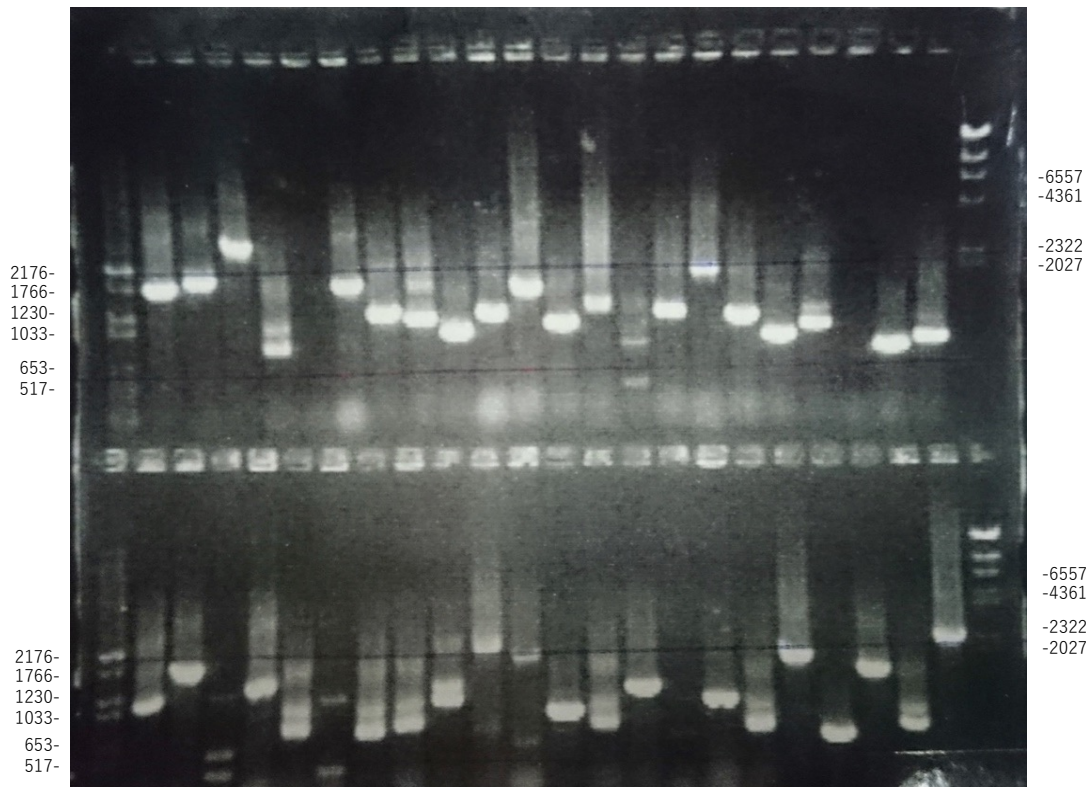
**Figure 11** ゲルクロマトグラフィーを2回行った cDNA の長さの分布

Bioanalyzer を用いて KU812 より得た cDNA の長さの分布をアッセイした。縦軸は相対蛍光であり、DNA 質量に比例する。cDNA の平均長は 1.6 kb であった。M: marker。

A.



B.



**Figure 12** コロニーPCRの結果

A. コロニーPCRを行うために模式図で示す位置にプライマーを設計した。

PCR産物の長さはクローニング産物の長さ+516 bp。B. Titer確認に用いた大腸菌コロニーをピックしコロニーPCRで integrity を評価した。insertの平均長は  $0.7 \times 10^3$  bpであった。Marker: BMVI (左),  $\lambda$ /HindIII (右)。左右の数値は泳動したマーカースバンドの長さを示している。

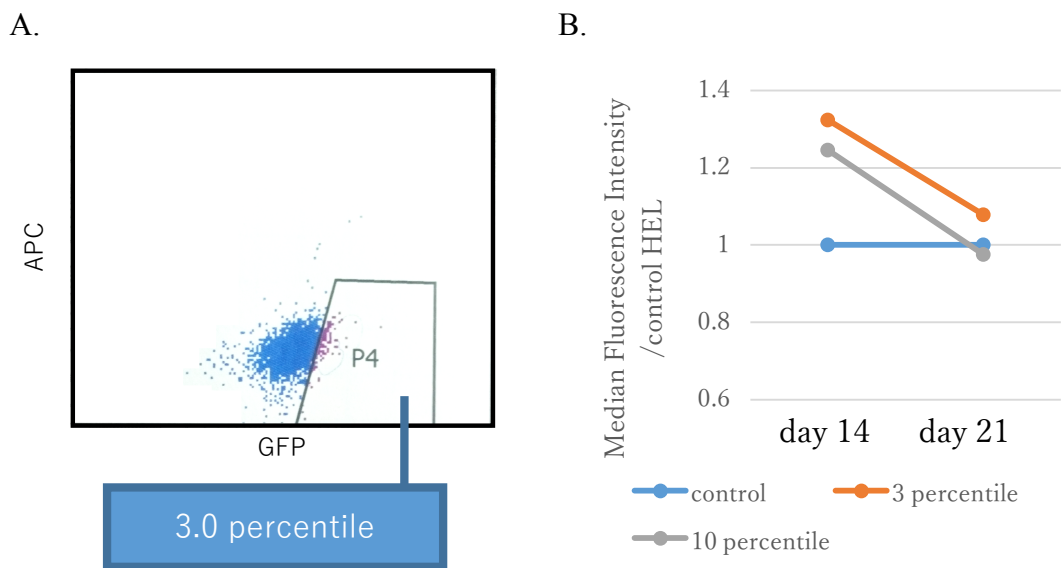
MCS: multiple cloning site。

GFP 陽性細胞分画は濃縮できなかった

pMXs-eGFP-Neo ベクターを用いた検討により、pMXs-Neo ベクターと Plat-A パッケージング細胞を用いた際のウイルス感染効率は、HEL 細胞では 20%程度であることが分かった。完成した cDNA ウイルスライブラリーをゲノム改変 HEL 細胞に感染させた。

まず、GFP 陽性細胞分画をソーティングすることで、*EVII* 高発現分画を濃縮できるのではないかと考えた。Figure 13-A のように上位 3 パーセントイル・10 パーセントイルの GFP 陽性集団をソーティングし、細胞を適宜継代した後に 2・3 週間の時点で再び解析すると、時間経過とともに GFP シグナルが減弱することが分かった (Figure 13-B)。

したがって、*EVII* up-regulator を効率よく探索するためには、ウイルス感染成立後、すみやかに細胞を単離することが重要であると考えた。



**Figure 13** cDNA ライブラリー感染細胞の GFP シグナル上位集団をソートしても、しばらくすると GFP シグナルの減弱をきたす

A. GFP シグナル上位 3 パーセントイルのゲーティング。同様の方法で 10 パーセントイルのソーティングも試行した。

B. ソーティング施行後 2 週間・3 週間時点での GFP シグナル中央値の推移 (N=1)。各アッセイ施行日間のデータを標準化するために、各測定日のゲノム改変 HEL (感染なし) の GFP シグナル中央値を 1 として、相対値で示した。

## Single cell sorting を併用したスクリーニング

EVI1-GFP 高発現細胞は長期間の培養によりシグナルが減弱することが分かっていたため、Figure 14 のワークフローを考案した。感染・G418 selection が成立し次第速やかに single cell sort を行うことで、GFP シグナルの減弱の問題や細胞増殖速度の差による誤差を回避できると考えた。

GFP 陽性集団の上位 3 パーセントイルをゲーティングして Single cell sort を行い解析することにした。細胞増殖・ゲノム抽出の後、Table 4 のコロニーPCR用のプライマーで cDNA ライブラリー由来の配列を増幅した。すると、Figure 15 に示す通り、大半の細胞に組み込まれた配列は数 bp~十数 bp 程度の小断片であった。増幅された断片をサンガーシーケンスし、BLAST で解析すると、あるクローン (Figure 15 の▽で示したクローン) においては、*EEF1A1*

(*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) 遺伝子が導入されていると分かった。しかしこれはアミノアシル tRNA をリボソームに輸送するタンパクで ubiquitous に発現しており、また転写因子ではないことから、目的とする遺伝子ではないと考えられた。

スクリーニングの効率が悪かった原因としては、クローニングされた断片が短い程より高効率にウイルス感染してしまい、目的の up-regulator の感染細胞



が得られなかったことが考えられた。そこで、細胞株を変更してスクリーニングの効率を高めることが必要と考えた。

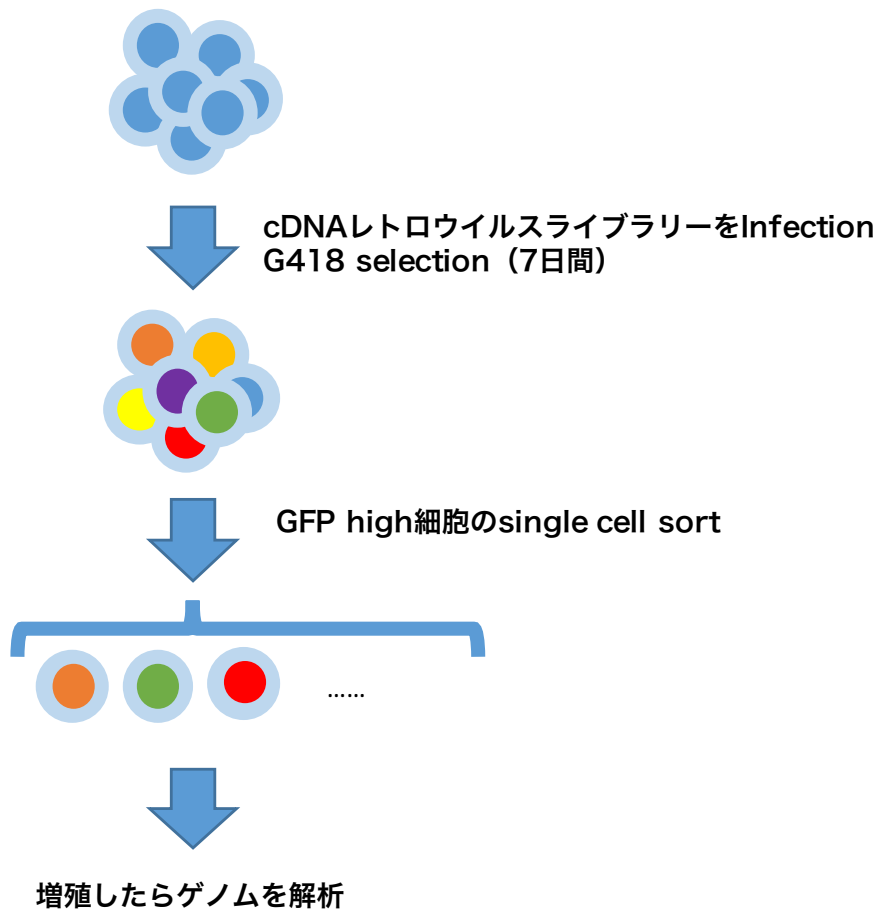
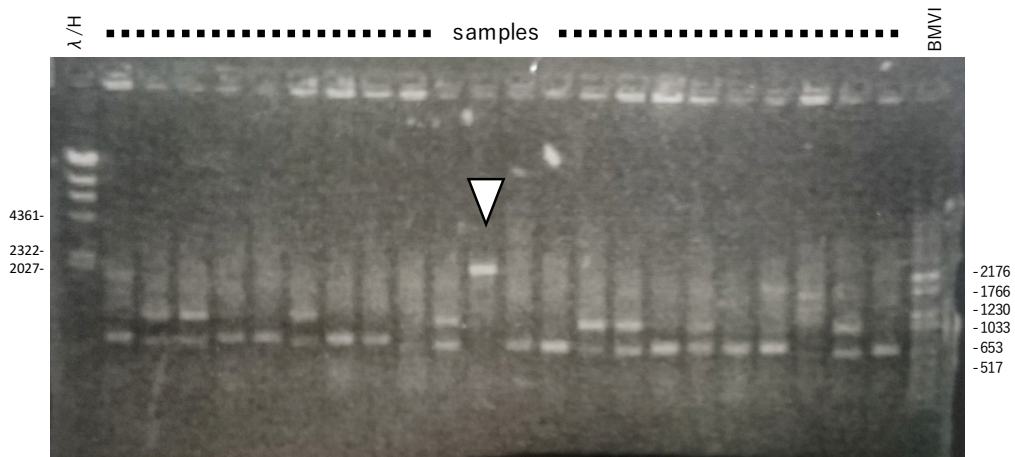


Figure 14 ウイルスライブラリー解析の workflow



**Figure 15** single cell sort した細胞のゲノムに組み込まれた cDNA 断片の検索

Single cell sort した細胞のゲノムからウイルス特異的プライマー (Table 4) を用い、PCR 法で挿入 cDNA 配列を増幅した。両脇の数値は泳動したマーカークバンドの長さを示している。Arrowhead: EEF1A1 sample. λ/H: λ/HindIII molecular marker, BMVI: molecular marker.

## HEC1B の改変

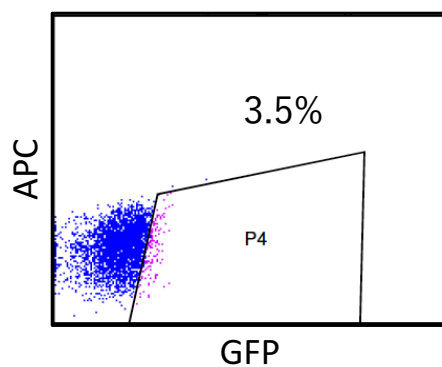
スクリーニングのスループットを向上させるため、より扱いやすい HEC1B 細胞（子宮体癌（腺癌）由来）を、ゲノム改変細胞として用いることにした。

HEC1B は付着細胞であり、*EVII* 高発現であることが知られている。また、

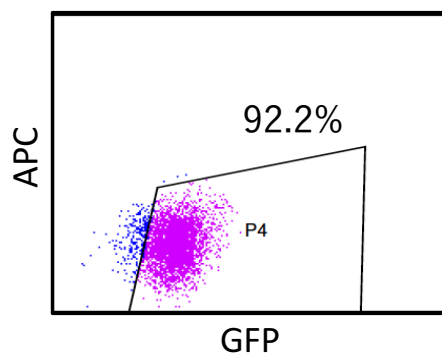
HEC1B は karyotyping 及びサザンブロットで 3q26 領域の異常を伴わないことが証明されている<sup>41</sup>。

HEC1B 細胞に PEI 法で TALEN の発現ベクター及びドナーベクターを導入し、HEL に用いた手法と同様の手順でゲノム改変 HEC1B 細胞を作成した。限界希釈法で単離したクローンは、Figure 16 に示す通り、初期状態の HEC1B 細胞と比べて GFP シグナルが亢進していた。また、Figure 17 に示す PCR でゲノムの正しい位置にドナーベクター配列が挿入されていることを確認した。また、ウェスタンブロットで GFP が発現していることを確認した (Figure 9)。

A.

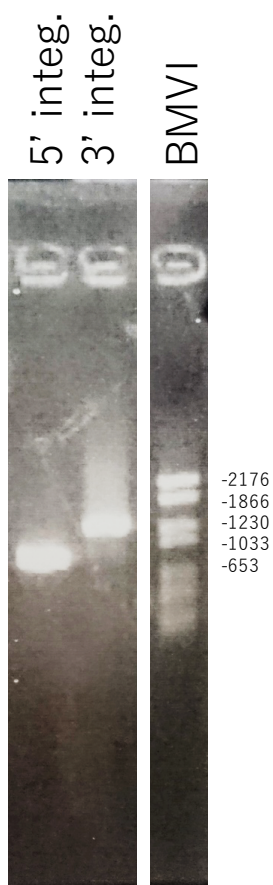


B.



**Figure 16** ゲノム改変 HEC1B をクローン化し、GFP シグナルを計測した

TALEN・ドナーベクターの導入および Puromycin セレクションを行った後にクローン化した HEC1B を FACS で観察した。P4 領域はゲノム改変前の HEC1B の GFP シグナルを参考に設定し、A, B で共通である。A: GFP の低いクローン、B: GFP シグナルが亢進しているクローンが観察された。B のクローンではゲノム改変が成功しているものと考えられたため、以下の実験に用いた。

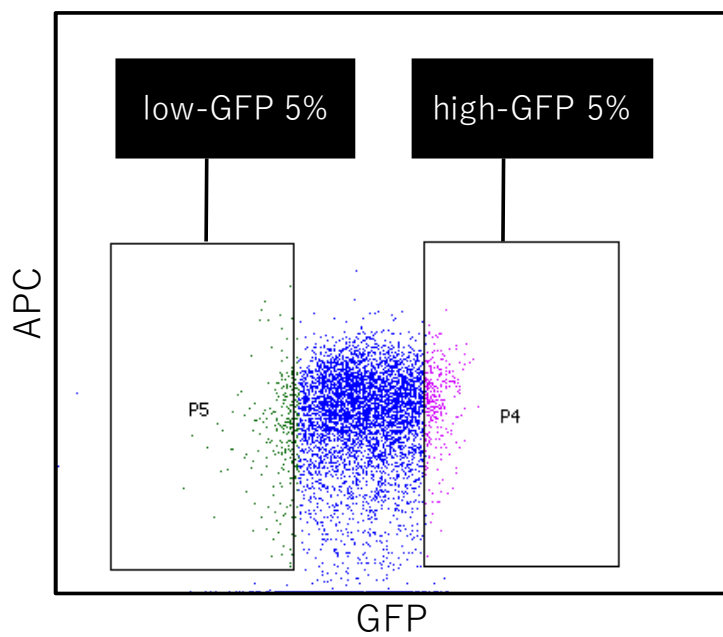


**Figure 17** ゲノム改変 HEC1B 細胞のゲノム改変を検出する PCR の結果

Figure 7 に示すプライマーを用い、Figure 8 と同様の手順で目的配列を検出した。ゲノムが予想通り改変されていることを示した。BMVI: molecular marker。

改変 HEC1B 細胞において、*EVII* 発現と GFP シグナルは相関する

ゲノム改変 HEC1B 細胞において、*EVII* の mRNA 量がフローサイトメトリーの GFP シグナルと相関するか確認した。ゲノム改変 HEC1B の GFP シグナルの上位・下位 5 パーセントイル集団をソートし、RT-qPCR で *EVII* 及び *MDS1/EVII* をアッセイした (Figure 18)。その結果、GFP シグナルが高い集団では *EVII*、*MDS1/EVII* の発現量も高い傾向が分かった (Figure 19)。したがって、ゲノム改変 HEC1B 細胞においても GFP シグナルを指標として *EVII* 発現量を推察することは妥当と考えられた。

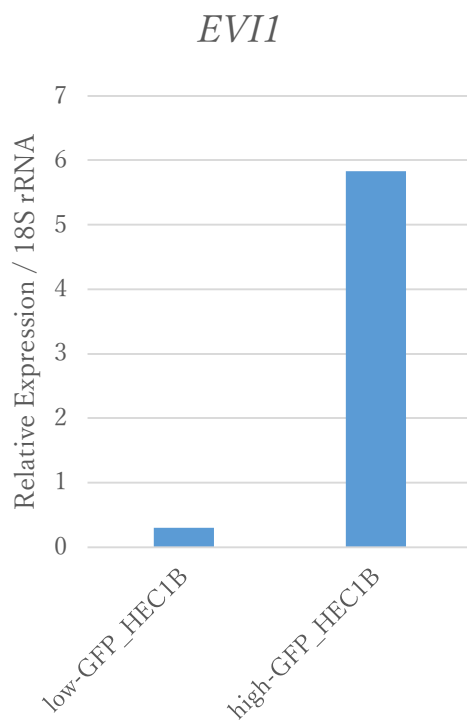


**Figure 18** HEC1B 細胞の GFP シグナル上位・下位 5 パーセントのソーティング

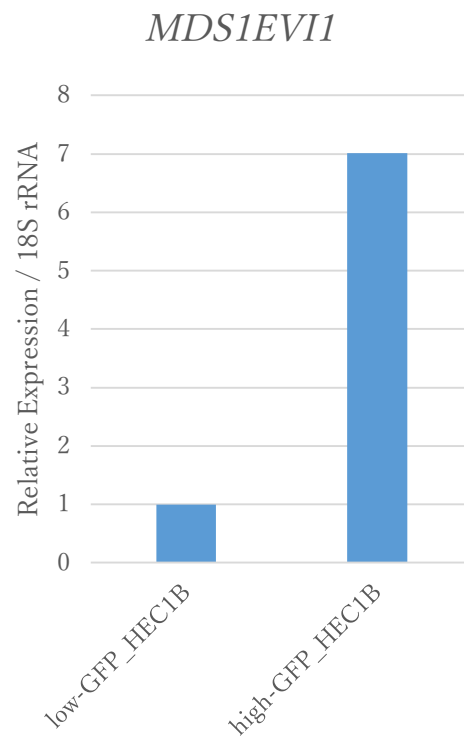
ゲノム改変 HEC1B をフローサイトメトリーで観察し、GFP シグナルの上位・下位 5 パーセント集団をそれぞれソーティングした。



A.



B.



**Figure 19** *EVI1*, *MDS1EVI1* は GFP シグナルと相関する

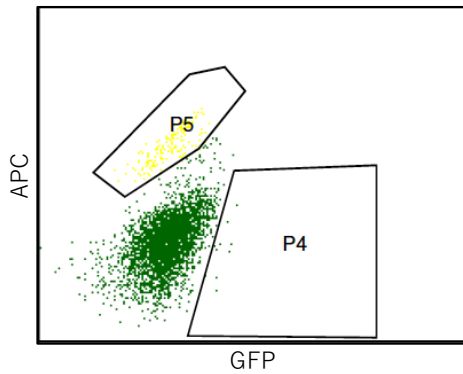
Figure 18 で示した各分画における A. *EVI1* と B. *MDS1EVI1* の発現を RT-qPCR で評価した。High-GFP 分画においては low-GFP 分画と比較し、両遺伝子の発現が高かった (N=1)。

ゲノム改変 HEC1B 細胞の GFP シグナルは *MLL* 融合遺伝子によって上昇する

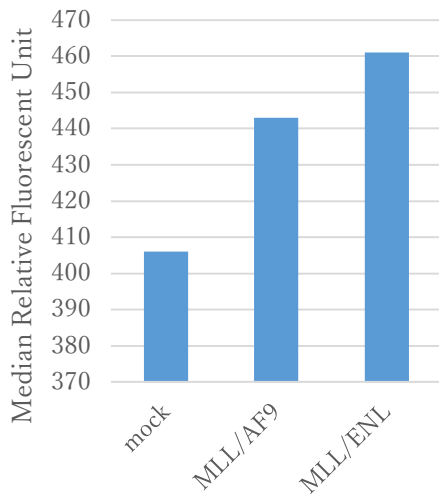
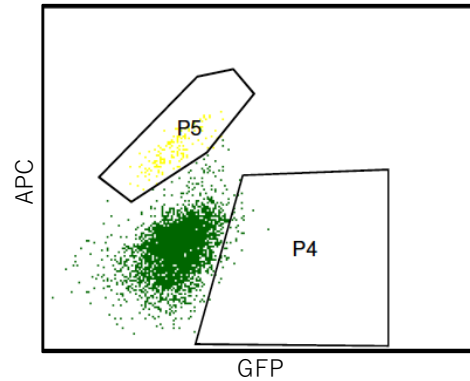
ゲノム改変 HEL に対して *MLL* 融合遺伝子をウイルス感染により導入した際は FACS 上で GFP シグナルの増強が観察された。*EVII* の up-regulator として確立した遺伝子は少ないため、HEC1B は非血液腫瘍であるが *MLL* 融合遺伝子を同様に導入して GFP シグナルの変動を観察した。

Figure 20 に示した通り、ゲノム改変 HEL で観察されたのと同様に、*MLL* 融合遺伝子を導入することで GFP シグナル中央値が上昇することが分かった。

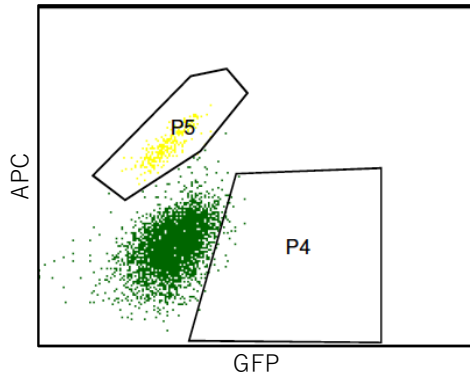
Mock Control



MLL/AF9



MLL/ENL



**Figure 20** *MLL* 融合遺伝子を導入したゲノム改変 HEC1B 細胞の GFP シグナル

ゲノム改変 HEC1B においても Figure 10 と同様に *MLL* 融合遺伝子をウイルスで導入し、G418 でセレクションした後、感染細胞の GFP シグナルをフローサイトメトリーにより評価した (N=1)。P4 領域は GFP シグナル強度の比較のため、mock control の分布を参考に設定しており、各プロットに共通している。P5 領域の細胞は死細胞と考えられたため、GFP シグナルの解析から除外した。棒グラフは各集団の GFP シグナルの中央値を示している。*MLL* 融合遺伝子導入により、GFP シグナルが増強した。

## ゲノム改変 HEC1B を用いたライブラリースクリーニング

pMXs-Neo ベクターと Plat-A 細胞でウイルスを作成した場合、HEC1B に対する遺伝子導入効率は 2 割程度であった。Figure 14 のワークフローを用いて、ゲノム改変 HEC1B にウイルスライブラリーを感染させ、*EVII* の up-regulator を検索する実験を行った。

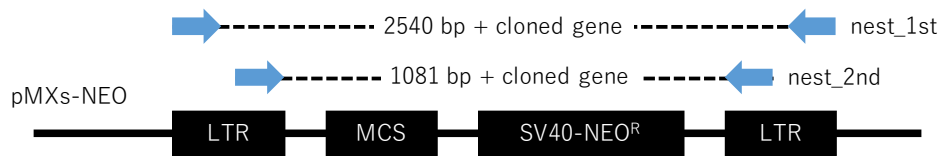
Single-cell sort により、96 穴プレート 16 枚分 (1536 個) のクローンを単離・培養した後、細胞が生存したウェルは 124 ウェル (8%) であった。これらのウェルの細胞からゲノムを回収した。ウイルス由来配列である LTR を利用して導入配列を検出したところ、Figure 21 に示すように、HEL で行った実験と同様に短い断片が大半を占めていた。比較的長い断片が検出されたクローンを恣意的に選別したところ、26 サンプル得られたため、これらの挿入配列をサンガーシーケンスし、BLAST 検索した。

Table 10 に示す通り、この 26 サンプルから 2 回以上検出された遺伝子は *TARDBP* のみだった。検出されたすべての遺伝子の機能を PANTHER Classification System (<http://pantherdb.org/>)<sup>35</sup> によって調べたところ、転写因子活性があると考えられたのは *TARDBP* と *AHR* のみであった。また、genomic

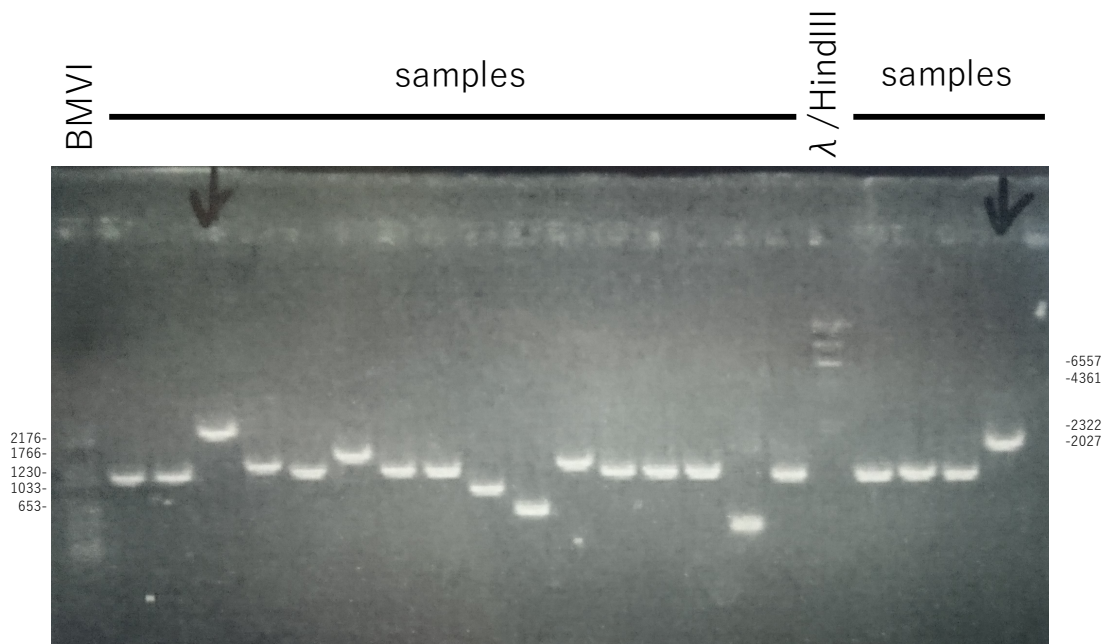
DNA や mitochondrial DNA が多く検出されたことから、ライブラリー作成時にこれらの DNA が混入してしまっていたことが示唆された。

BioGPS (<http://biogps.org/>) を用いて GSE1133 データセットを解析し、*TARDBP* と *AHR* の mRNA 発現が高いヒト組織を調べた (Figure 22)。*TARDBP* は神経系及びリンパ球を中心とした血液細胞で発現が高かった。また、*AHR* は CML 細胞株である K562 と正常血球系、特に CD33 陽性の myeloid 系細胞と CD14 陽性の単球系細胞において高い発現が認められた。

A.



B.



**Figure 21** GFP 陽性の各 HEC1B クローンに導入された遺伝子の解析 (一部)

HEC1B 細胞を用いて cDNA ライブラリースクリーニングを施行し、GFP 高発現分画を single cell sort した後、LTR を利用して Nested-PCR を施行した。A. Nested-PCR のプライマー図。B. Nested-PCR 産物を電気泳動した写真 (一部) である。比較的長い断片が挿入されていたサンプル (黒矢印) を選別し、解析に用いた。BMVI,  $\lambda$ /HindIII: molecular markers.

**Table 10** ゲノム改変 **HEC1B** を用いたスクリーニングで、**EVII-GFP** シグナル上位集団に導入されていた遺伝子のリスト

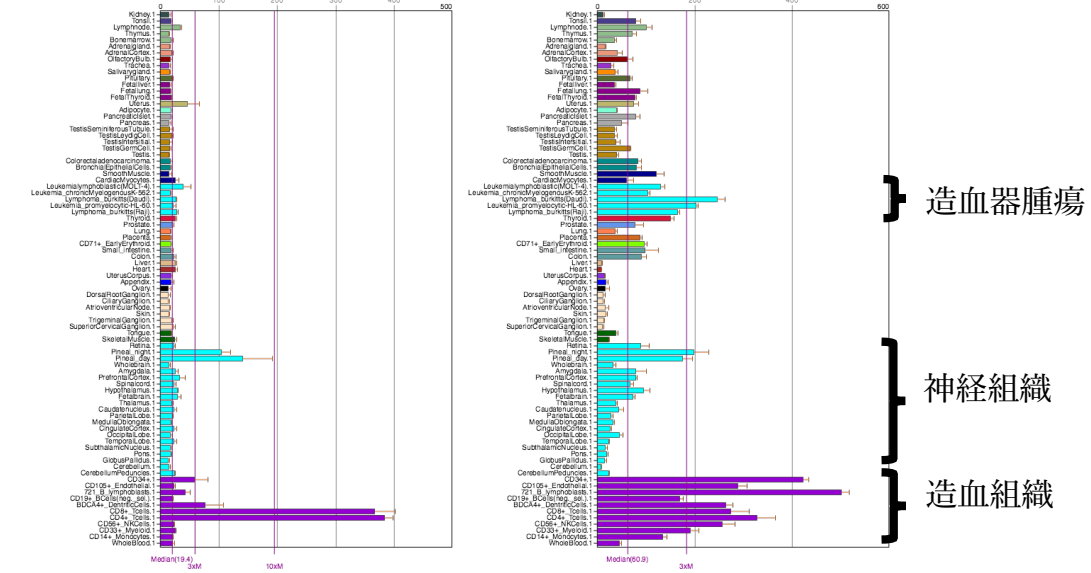
Genes	N
TARDBP	2
IFRD1	1
AHR	1
CSDE1	1
EMG1	1
FTL	1
RQCD1	1
STOM	1
VPS13C	1
(lincRNA)	1
(ncRNA)	1
(genomic DNA)	4
(mitochondrial DNA)	3
(sequence 不能)	7
	26

ncRNA: non-coding RNA, linc RNA: large intergenic ncRNA

TARDBP

221264\_s\_at

200020\_at



AHR

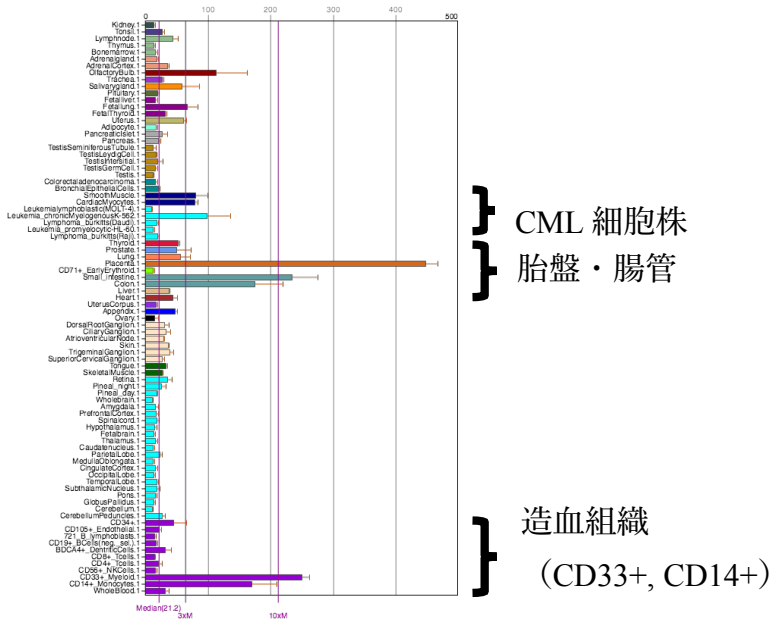


Figure 22 ヒトの各組織における TARDBP および AHR の発現分布

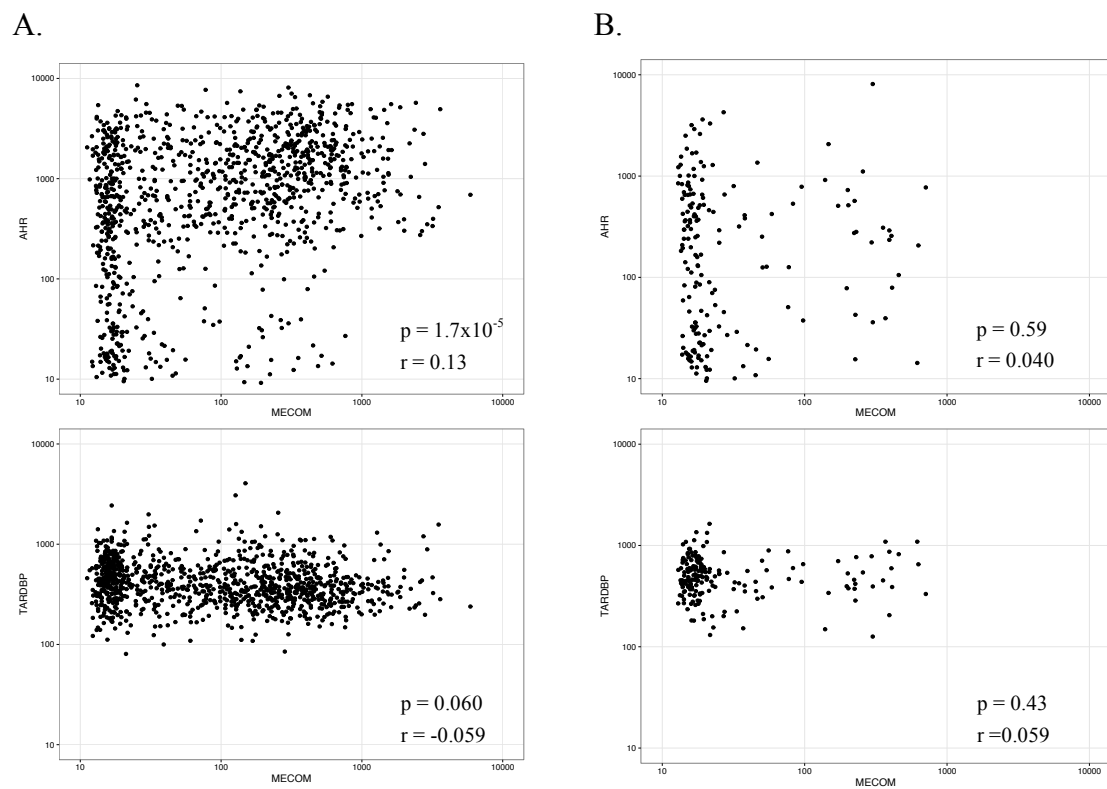


**Figure 22** ヒトの各組織における *TARDBP* および *AHR* の発現分布

ヒト組織における遺伝子発現データベースである BioGPS を用いて、*TARDBP* および *AHR* の発現分布を調査した。*TARDBP* は主に造血器腫瘍細胞株（水色、上方）や神経組織（水色、下方）及び造血組織（紫色）において特徴的な発現分布を認めた。一方、*AHR* は胎盤・腸管の他に CML 細胞株や造血組織の一部（CD33 陽性 myeloid 系細胞、CD14 陽性単球系細胞）に特徴的な発現を認めた。

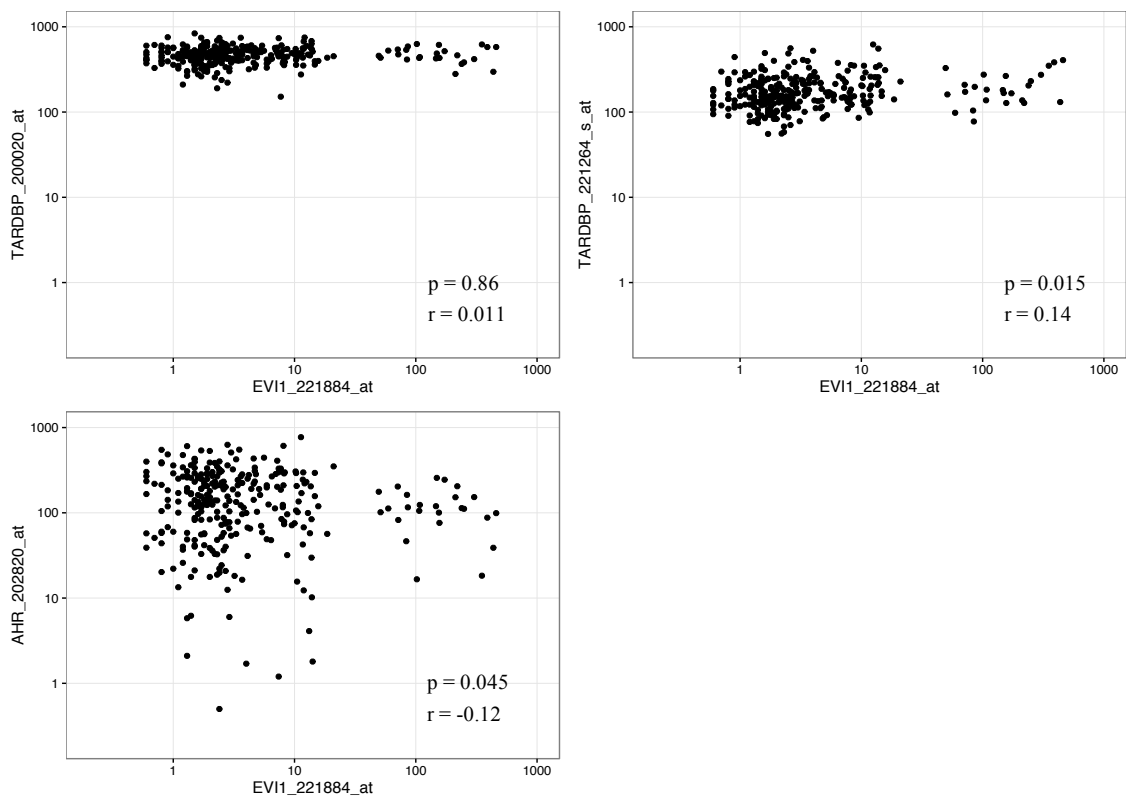
次に、腫瘍細胞株の遺伝子発現データベース CCLE を用いて、これらの候補遺伝子の発現量と *EVII (MECOM)* の発現量との相関を調べた (Figure 23)。

*AHR*, *TARDBP* ともに *EVII* 発現量との相関は小さかった。これは、解析対象として全細胞株・造血系細胞株のどちらを選んだ際も同様な結果となった。また、ヒト急性骨髄性白血病のデータを用いて同様の解析を行ったところ、腫瘍細胞株で得た結果とほぼ同様のパターンが得られた (Figure 24)。更に、白血病細胞株の cDNA を用いて RT-qPCR で遺伝子発現を評価し、同様に相関を検討した (Figure 25) ところ、*TARDBP* 発現量が *EVII* と相関していた。これらの結果を確認するために、shRNA を用いた遺伝子ノックダウンの実験を行った (Figure 26)。sh*TARDBP*、sh*AHR* を導入した HEC1B 細胞では *EVII* 発現量が減少していた。この結果からは、HEC1B 細胞においては *TARDBP* や *AHR* は *EVII* を正に regulate している可能性が示唆された。



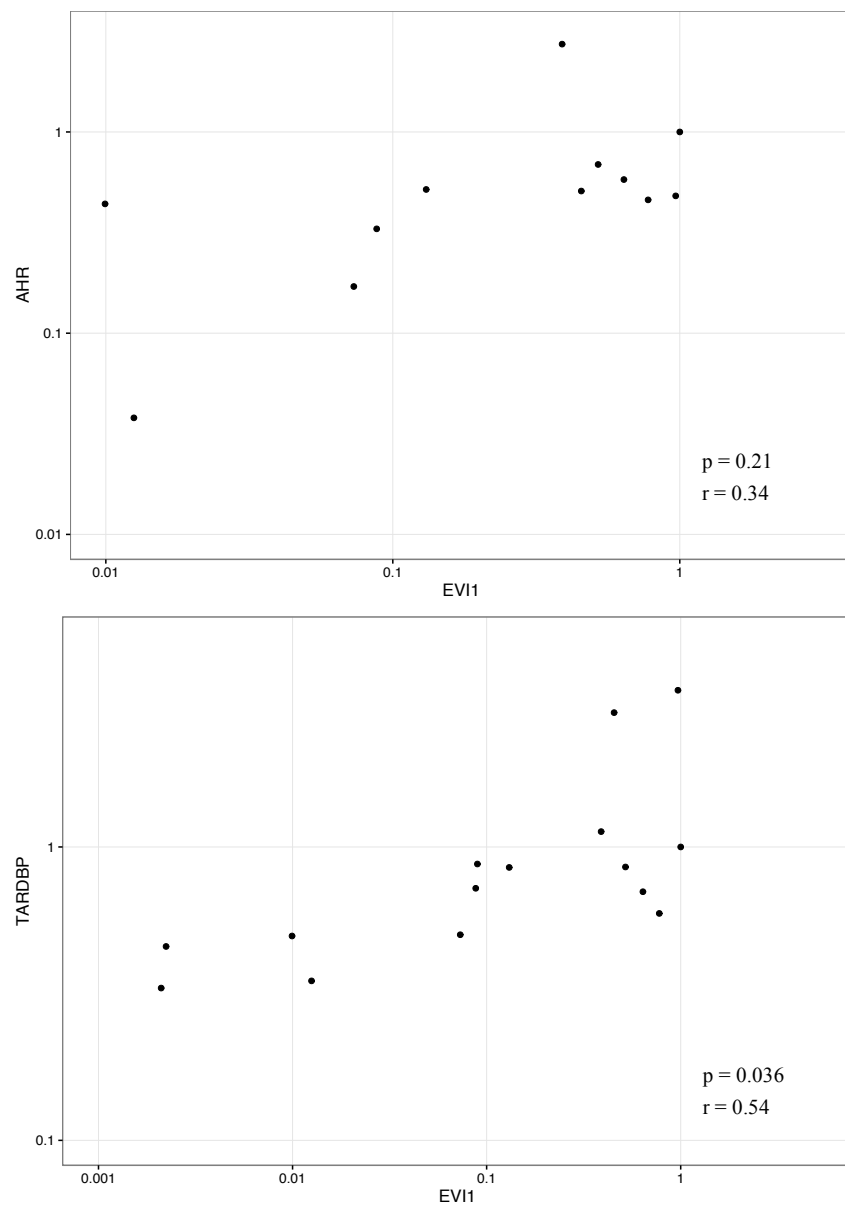
**Figure 23** CCLE データベースにおける *MECOM* と *AHR*, *TARDBP* の発現量の比較

CCLE に登録されている細胞株の発現量データに基づいて散布図を作成した。各軸は相対定量値を示す。ピアソンの相関係数  $r$  及び  $r=0$  を帰無仮説とした検定結果を各図に付した。A. 全細胞株。B. 血液系・リンパ系細胞株 (A の一部)。



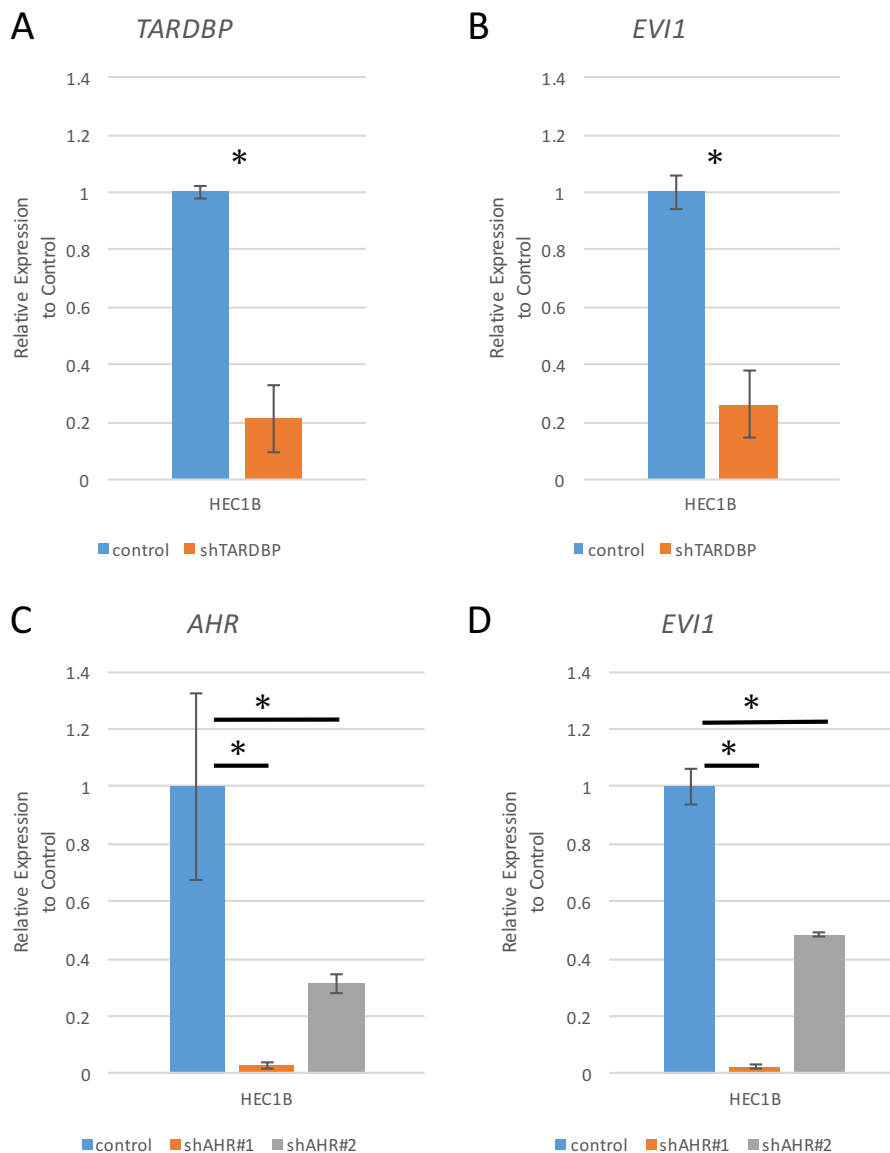
**Figure 24** 急性骨髄性白血病患者検体における *EVII*, *TARDBP*, *AHR* の発現量

既報のデータ (GSE1159)<sup>13</sup> を用いて解析を行った。Affymetrix U133A チップ上には *EVII* のプローブは 3 つあったが、*EVII*-high cluster をはっきり弁別している 221884\_at を採用した。*TARDBP* は 2 種類、*AHR* は 1 種類のプローブがあったため、それぞれと *EVII* の発現量を散布図にまとめた。ピアソンの相関係数  $r$  及び  $r=0$  を帰無仮説とした検定結果を各図に付した。



**Figure 25** 細胞株における *EVI1*, *AHR*, *TARDBP* 発現量の RT-qPCR 解析

以下の細胞株の各遺伝子発現量を RT-qPCR で解析し、散布図を作成した。一つの点が一つの細胞株と対応する。各軸（両対数グラフ）は *18S rRNA* に対する相対定量値に基づく。ピアソンの相関係数  $r$  及び  $r=0$  を帰無仮説とした時の検定結果を各図に付した。使用した細胞株は以下の通り。NOMO1, THP1, KG1, MOLM13, MV4-11, K562, Kasumi1, NCO1, ME1, HNT34, MOLM1, HEL, KU812, HL60, HEC1B。



**Figure 26** *AHR, TARDBP* に対する shRNA による *EVI1* 発現量の変化

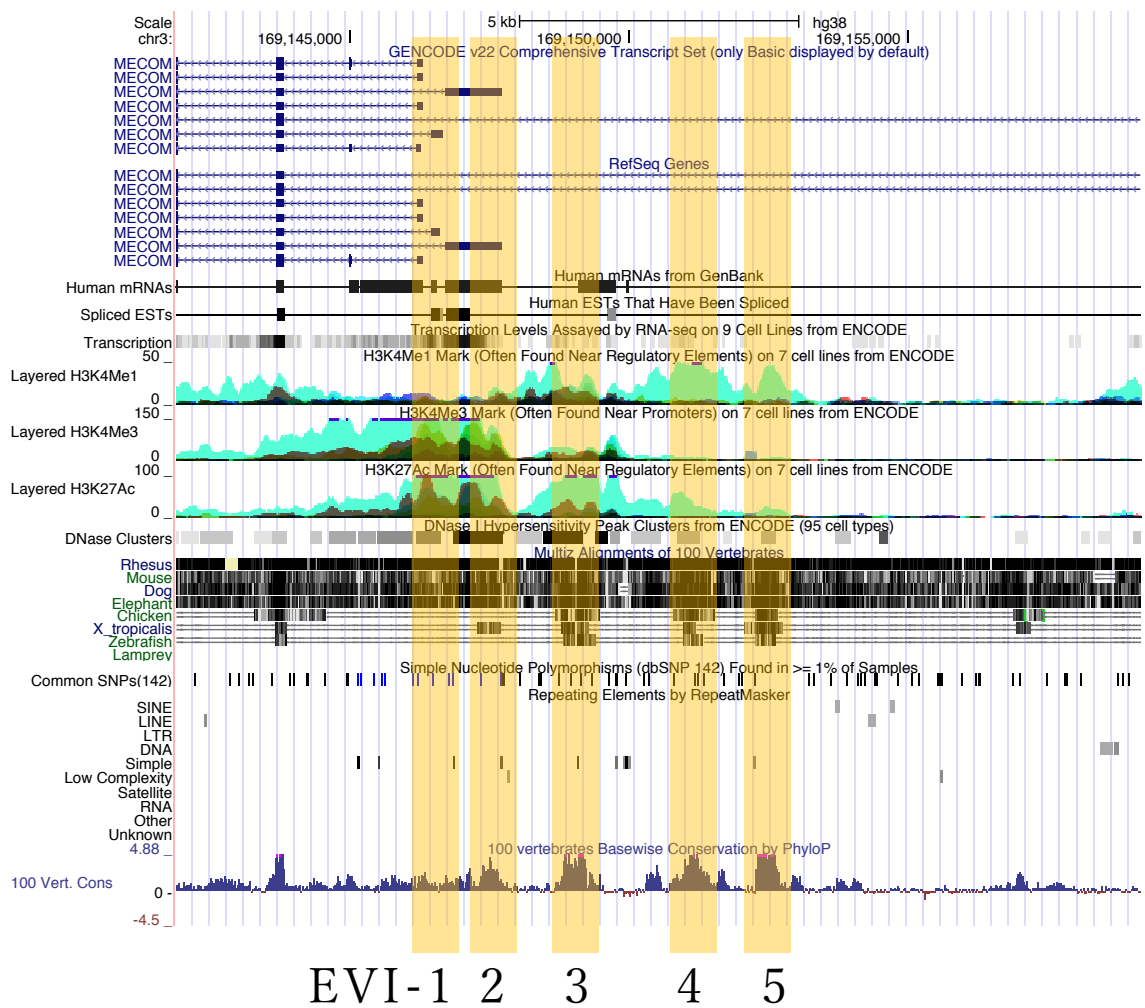
shTARDBP, shAHR レンチウイルスを HEC1B 細胞株に感染させ、遺伝子のノックダウン実験を行った (N=3)。各遺伝子の発現を RT-qPCR で評価し、control の発現量を 1 とした相対発現量で示した (平均±標準偏差)。A. shTARDBP 導入, *TARDBP* 発現量、B. shTARDBP 導入, *EVI1* 発現量、C. shAHR 導入, *AHR* 発現量、D. shAHR 導入, *EVI1* 発現量。

\*:  $p < 0.05$  (t-test)。

## ヒストン修飾による *EVII* 転写調節の検討

ここまで *EVII* の転写調節に関わる転写因子を同定するための実験を行ったが、遺伝子調節は転写因子のみならず、様々なエピゲノム修飾とも協調して行われていることは広く知られている。そこで *EVII* 発現に関するヒストン修飾の影響を調べるために、ChIP-qPCR を施行した。細胞株は *EVII* 発現株として KU812、HEL 及び *EVII* 低発現株として HL60 を選択した。ヒストン修飾因子は H3K27me<sub>3</sub>、H3K4me<sub>3</sub>、H3K36me<sub>3</sub>、H3K79me<sub>2</sub> を選択してそれぞれの細胞株・抗体の組み合わせで ChIP を施行し、Figure 27 に示す 1~5 の位置のヒストン修飾を qPCR で測定した。

3q26 異常を伴わない *EVII* 高発現株である KU812 では、*EVII* の転写調節領域において H3K4me<sub>3</sub> や H3K27me<sub>3</sub>、H3K79me<sub>2</sub> が特徴的に亢進していた (Figure 28)。



**Figure 27** *EVI1* 転写開始点付近の ChIP-qPCR プライマー位置

UCSC genome browser を使い、Conserved domain や既報の ChIP データを参考にしながら、*EVI1* 転写開始点の約 5 kb 以内に存在する 5 つの領域内にプライマーを設計した。



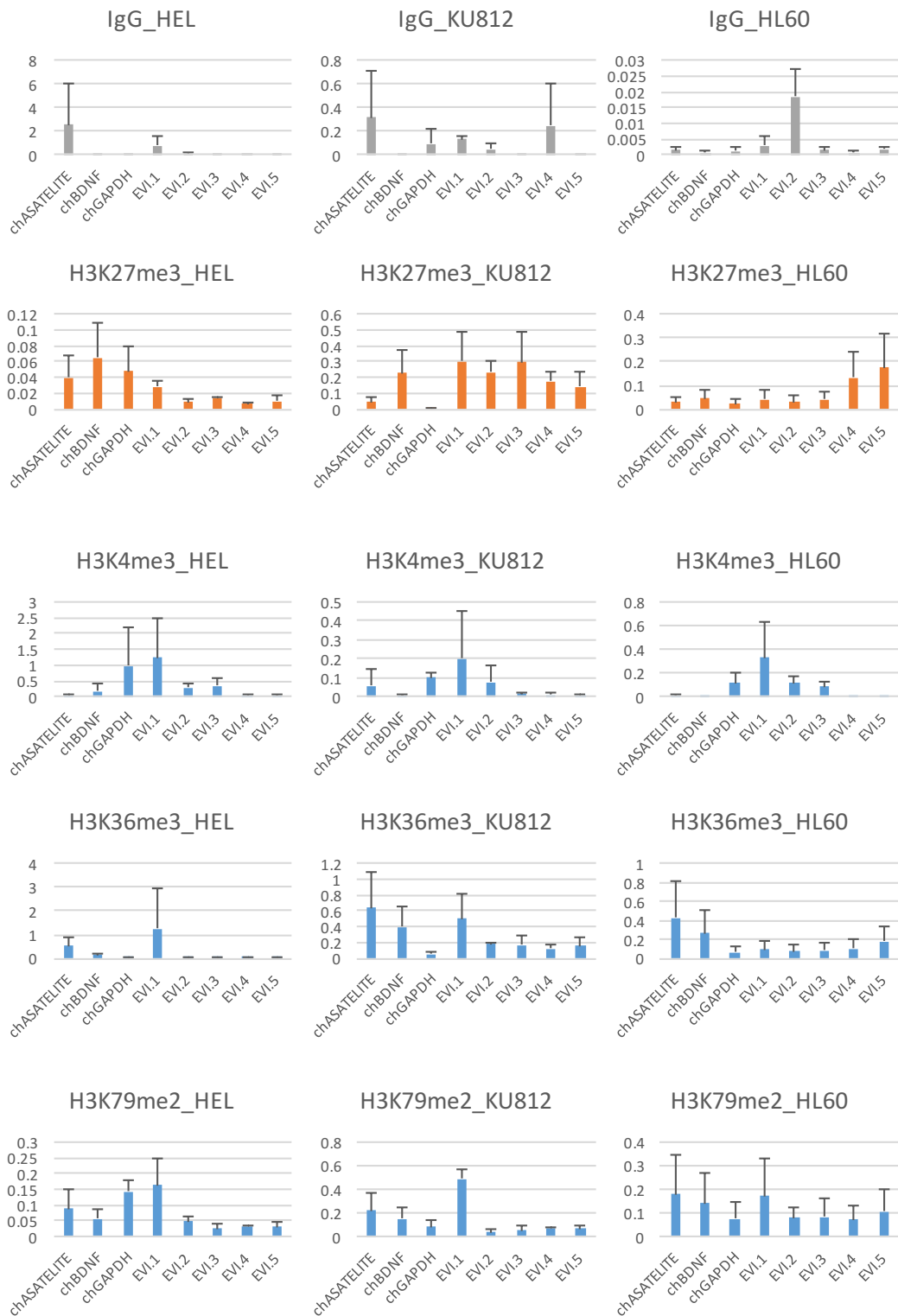


Figure 28 *EVI1* 転写調節領域におけるヒストン修飾

**Figure 28** *EVII* 転写調節領域におけるヒストン修飾

HEL, KU812, HL60 の 3 つの細胞株のそれぞれに対して、IgG, H3K27me3, H3K4me3, H3K36me3, H3K79me2 で ChIP し、Figure 27 に示した位置のプライマー及びポジティブコントロール位置のプライマーで DNA 量を計測した。各棒グラフは Input Sample に対する Signal の比を、エラーバーは標準偏差を示している (N=3)。KU812 では、H3K4me3 シグナルが亢進しているほか、*EVII* 発現を認めているにも関わらず H3K27me3 が亢進していることや、H3K79me2 の発現が亢進しており、これらのヒストン修飾が *EVII* の転写制御に関与している可能性が考えられた。

## 考察

造血器悪性腫瘍の治療成績は化学療法・造血幹細胞移植術の進歩により格段に向上したが、*EVII* の発現が亢進している AML は現在でも極めて予後不良である。3q26 領域の染色体転座や *MLL* 融合遺伝子といった既知の機構によらない *EVII* 高発現のメカニズムを明らかにすべく実験を行った。

本研究においては、*EVII* 発現に相関して GFP シグナルを有する白血病細胞株を作成する目的で、TALEN によるゲノム改変技術を用いた。*EVII* の終止コドン を抹消し、*EVII*-2A-eGFP-PGK-Puro 配列に置換することで、*EVII* 発現白血病細胞株である HEL や、*EVII* 発現子宮体癌細胞株である HEC1B において GFP を発現させることに成功した。また、そのシグナルをフローサイトメトリーで検出することができた。ゲノム改変 HEL の作成においては、およそ 6% の細胞が GFP 陽性として検出されたが、Hockemeier らの実験結果で、ゲノム編集が成功する確率が概ね数%程度であることから<sup>26</sup>、ほぼ妥当な結果と考えられた。また、HEC1B 細胞を用いた分析からは、実際に GFP シグナルと *EVII* ・そのスプライスアイソフォームである *MDSI**EVII* の発現が RT-qPCR を用いて相関していることが示された。更に、*MLL* 融合タンパクの強制発現によって GFP シグナルの上昇を観察することができた。これらの結果は、TALEN

によってゲノム改変が正しく行われ、*EVII* のレポーター系を確立することができたことを示している。

次に、KU812 細胞を用いて cDNA 発現ウイルスライブラリーの作成に取り組んだ。これまでに報告されたウイルスライブラリーを用いたスクリーニングとしては、Kitamura らのものがある<sup>40</sup>。この研究と比べると、本研究で用いたライブラリーの integrity は十分確保されていたと考えられるが、平均長が約 0.7kbp と既報 (1.5kbp) の半分程度しか確保できなかった。また、最終的な結果から、genomic DNA や mitochondrial DNA が候補分子としてあがってしまった。これは KU812 細胞の調整時に RNA の DNase 処理が不十分だった可能性がある。cDNA library の品質向上により、スクリーニングがより精密に行える可能性はあるため、今後の課題である。

HEL においては効率的なスクリーニングが行えなかったため、スループットを向上させるために新たなレポーター細胞として HEC1B を採用した。HEC1B 細胞では *EVII* 高発現であるが 3q26 異常を持たないため、KU812 細胞の代替としても有用と考えられ、handling も容易であった。ゲノム改変 HEC1B にウイ

ルスライブラリーを感染させ、single cell sorting を行ったが、細胞の生存率が低く、また有意義な遺伝子が発現しているクローンは少なかった。この結果からも、single cell sorting の品質や cDNA library の品質に問題を生じていたと言わざるをえない結果だった。

このスクリーニングでは、*TARDBP* と *AHR* が候補転写因子として抽出された。*TARDBP* は HIV-1 感染に重要な役割を果たす配列である RNA regulatory element (TAR) DNA に結合し HIV-1 の転写を抑制する<sup>42</sup>。また、*TARDBP* の mRNA 発現が高いヒト組織を調べたところ、血液細胞で比較的特異性のある発現が認められた。*TARDBP* は *CDK6* を制御しており、間接的に Rb、p130 を抑制している<sup>43</sup>。遺伝子ノックアウトによって細胞周期の亢進や細胞膜変性、アポトーシスを引き起こす重要な転写因子である<sup>43</sup>。本遺伝子と白血病の関係を明らかにした報告はまだないが、他の癌腫においては、*TARDBP* の 25 kb 上流の SNP が Ewing sarcoma のリスクファクターになることが知られている<sup>44</sup>。また、*TARDBP* は肝細胞癌で解糖系を正にコントロールし、治療標的となりうることも知られている<sup>45</sup>。したがって、*TARDBP* の dysregulation がユニバーサルな発がん機構の一端を担う形で白血病と関与している可能性も十分に考えられた。

*AHR* は外因有害物質の解毒に関与している遺伝子である。マウスモデルで幹細胞の維持や MDS の発生に関与することが示唆され<sup>46</sup>、ヒト iPS 細胞を用いた研究では *AHR* の活性化が造血前駆細胞を増殖させることが示されている<sup>47</sup>。一方、成人 T 細胞白血病では内因性の *AHR* の upregulation が起こっていることが知られており<sup>48</sup>、*AHR* は造血器腫瘍形成と何らかの関与があるものと考えられた。

これらの遺伝子と *EVII* 発現量の相関について、細胞株のマイクロアレイデータ、ヒト AML サンプルのマイクロアレイデータで検討したが、有意な相関は見いだせなかった。入手可能な細胞株 cDNA サンプルでの RT-qPCR を用いて検討したところ、サンプル数が少ないものの *TARDBP* と *EVII* は有意な正の相関を認めた。そこでこれらの遺伝子の shRNA によるノックダウン実験を行った。HEC1B 細胞では *TARDBP*、*AHR* のノックダウンで *EVII* 発現量が減少する結果が得られ、スクリーニング結果が支持された。今後は他の造血器腫瘍細胞株を含めて強制発現による検討等を行い、両遺伝子が白血病において *EVII* の発現調節にどのように関与しているか評価をしていく必要がある。

HEC1B を用いたスクリーニングでは、上記の遺伝子のほかに *EVII* up-regulator の候補として non-coding RNA (ncRNA) が検出された。今回のスクリーニングで検出された ncRNA はまだ生物学的な役割が同定されていないものであり、また、転写因子のスクリーニングという目的からは離れるため、追加の解析は行わなかった。ncRNA は micro RNA のような 20bp 程度のものから、large intergenic non-coding RNA のような 200bp を超えるのものまで知られている<sup>49,50</sup>。更に、ncRNA の腫瘍における役割も次第に明らかになってきている<sup>51</sup>。例えば、T-ALL において large non-coding RNA の *LUNARI* は *NOTCH1* により制御されており、*LUNARI* は *IGF1* signaling を通じて T-ALL の増殖を制御していると報告されている<sup>52</sup>。今回用いたライブラリーにおいては平均長が短かったため、かえって ncRNA が混入していた可能性が考えられる。今後、ライブラリー平均長の調整を行うことで、ncRNA を網羅的に含むライブラリーを作成しスクリーニングすることも可能と考える。

今回用いた系において、GFP シグナルが極めて高い（例えば、10 倍以上）分画が認められなかったことや、時間経過に応じて attenuate していくことは、cDNA ライブラリーの性能が十分でなかったために *EVII* high になる分画がそ

もそも存在しなかった可能性の他、今回用いた細胞株では *EVII* 高発現により細胞が死滅するか、少なくとも増殖が停止してしまう可能性はあると考えられた。そのため、今回用いた系より更に短期間で GFP を評価する系や、あるいは細胞株に細胞死を抑制する遺伝子を導入する系などを用いることでスクリーニングが改善される可能性はあり、今後の課題である。

最後に、*EVII* の発現制御に関係していると思われるエピゲノミックな修飾について検討した。KU812・HEL・HL60 の 3 細胞株で *EVII* プロモーター領域の ChIP-qPCR を行ったところ、それぞれの細胞でヒストンメチル化プロファイルが異なっていることが明らかになった。特に、KU812 では転写を正に制御していると考えられている H3K4me4 の他に H3K27me3 と H3K79me2 が亢進していることが特徴的で、生理的なプロモーターによる *EVII* の転写活性化においてはこれらのヒストン修飾が重要な役割を担っている可能性が示唆された。一方、APL 由来の細胞株である HL60 はマイクロアレイや RT-qPCR の結果からは *EVII* 低発現と考えられていたものの、H3K4me3 マークはポジティブコントロールと同程度の上昇を認め、予想とは合わなかった。



一般に H3K27me3 修飾は転写を抑制することが知られており、白血病細胞株においても *EVII* の転写抑制は H3K27me3 と関連している<sup>37</sup>。一方で、PRC2 の構成員である Ezh2 を欠損したマウスにおいて、DNA methylation が相補的に亢進し、*EVII* の転写量が減少するとする報告<sup>53</sup>も存在する。このように、H3K27 のメチル化が *EVII* の調節に及ぼす効果は一義的に説明できず、*EVII* は転写因子のみならず複数のエピゲノム修飾により制御されていると考えられた。

KU812 では HEL に比べて *EVII* プロモーター領域の H3K4me3 と H3K27me3 が同時に亢進していた。一般に胚性幹細胞や造血幹細胞ではこれら活性と抑制のヒストンマークを同時に有する領域が存在し、bivalent domain として知られている<sup>54-56</sup>。幹細胞においては bivalent domain を有する遺伝子の発現は一定のレベル以下にコントロールされているが、分化段階の適切な時期になると bivalency を失ってその遺伝子ははっきりと on/off の状態になると考えられている。KU812 細胞においてはこのような *EVII* プロモーター領域の bivalent な修飾を保持しつつも *EVII* 発現が亢進している可能性が示唆された。KU812 細胞は CML 患者由来である<sup>57</sup>。CML は CML 幹細胞分画と呼ばれる比較的未分化な細胞集団を含むと考えられているが<sup>58</sup>、KU812 細胞がこの幹細胞分画に由来

するならば *EVII* プロモーター領域の bivalency を有することが説明されうであろう。

H3K79me2 は活性化ヒストンマークの一種と考えられているが<sup>59,60</sup>、*EVII* 発現に関する既報はなく、これらのヒストン修飾因子と *EVII* の関係は今後明らかにしていく必要がある。

今回の実験では考慮しなかったエピゲノミックな遺伝子制御の一つに、non-coding region における *cis* エレメント、特に super-enhancer によるものが挙げられる。一般に oncogene には super-enhancer が集積しやすい<sup>61</sup> と言われている。白血病領域では、T 細胞性白血病で重要な転写因子である *TALI* の上流の intragenic 領域に somatic mutation が生じ、MYB の結合モチーフが出現することで、スーパーエンハンサーを生じることが腫瘍化において重要な役割を担っていることがあると報告されている<sup>62</sup>。Myeloid 系において重要な転写因子である *EVII* が super-enhancer の変化によって制御されている可能性は研究課題である。

本研究では、*EVII* 高発現機構を解明する為に *EVII*-2A-eGFP を組み込んだレポーター細胞を樹立することに成功した。また、cDNA ウイルスライブラリー

を用いたスクリーニングを施行し、*TARDBP* や *AHR* といった *EVII* の regulator の候補を抽出し、遺伝子ノックダウン実験で確認した。また、*EVII* のヒストン修飾を検討し、特に H3K4me3 と H3K27me3 の bivalency や H3K79me2 が *EVII* の発現に関与している可能性を明らかにした。

## 参考文献

1. Mucenski, M. L., Taylor, B. A., Ihle, J. N., Hartley, J. W., Morse, H. C., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 301–308 (1988).
2. Glass, C., Wilson, M., Gonzalez, R., Zhang, Y. & Perkins, A. S. The role of EVI1 in myeloid malignancies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **53**, 67–76 (2014).
3. Fears, S., Mathieu, C., Zeleznik-Le, N., Huang, S., Rowley, J. D. & Nucifora, G. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *PNAS* **93**, 1642–1647 (1996).
4. Wieser, R. The oncogene and developmental regulator EVI1: Expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene* **396**, 346–357 (2007).
5. Yuasa, H., Oike, Y., Iwama, A., Nishikata, I., Sugiyama, D., Perkins, A., Mucenski, M. L., Suda, T. & Morishita, K. Oncogenic transcription factor Evi1

regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression.

*EMBO J.* **24**, 1976–1987 (2005).

6. Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S. & Kurokawa, M. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* **3**, 207–220 (2008).
7. Chitteti, B. R., Liu, Y. & Srour, E. F. Genomic and proteomic analysis of the impact of mitotic quiescence on the engraftment of human CD34+ cells. *PLOS ONE* **6**, e17498 (2011).
8. Forsberg, E. C., Passegué, E., Prohaska, S. S., Wagers, A. J., Koeva, M., Stuart, J. M. & Weissman, I. L. Molecular Signatures of Quiescent, Mobilized and Leukemia-Initiating Hematopoietic Stem Cells. *PLOS ONE* **5**, e8785 (2010).
9. Daghistani, M., Marin, D., Khorashad, J. S., Wang, L., May, P. C., Paliompeis, C., Milojkovic, D., De Melo, V. A., Gerrard, G., Goldman, J. M., Apperley, J. F., Clark, R. E., Foroni, L. & Reid, A. G. EVI-1 oncogene expression predicts survival in chronic-phase CML patients resistant to imatinib treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **116**, 6014–6017 (2010).

10. Gröschel, S., Lugthart, S., Schlenk, R. F., Valk, P. J. M., Eiwen, K., Goudswaard, C., van Putten, W. J. L., Kayser, S., Verdonck, L. F., Lübbert, M., Ossenkoppele, G.-J., Germing, U., Schmidt-Wolf, I., Schlegelberger, B., Krauter, J., Ganser, A., Döhner, H., Löwenberg, B., Döhner, K. & Delwel, R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2101–2107 (2010).
11. Ogawa, S., Kurokawa, M., Tanaka, T., Tanaka, K., Hangaishi, A., Mitani, K., Kamada, N., Yazaki, Y. & Hirai, H. Increased Evi-1 expression is frequently observed in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* **10**, 788–794 (1996).
12. Russell, M., Thompson, F., Spier, C. & Taetle, R. Expression of the EVI1 gene in chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Leukemia* **7**, 1654–1657 (1993).
13. Valk, P. J. M., Verhaak, R. G. W., Beijnen, M. A., Erpelinck, C. A. J., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Boer, J. M., Beverloo, H. B., Moorhouse, M. J., van der Spek, P. J., Löwenberg, B. & Delwel, R.

- Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **350**, 1617–1628 (2004).
14. Bindels, E. M. J., Havermans, M., Lugthart, S., Erpelinck, C., Wocjtowicz, E., Krivtsov, A. V., Rombouts, E., Armstrong, S. A., Taskesen, E., Haanstra, J. R., Beverloo, H. B., Döhner, H., Hudson, W. A., Kersey, J. H., Delwel, R. & Kumar, A. R. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9–rearranged AMLs. *Blood* **119**, 5838–5849 (2012).
  15. Glass, C., Wilson, M., Gonzalez, R., Zhang, Y. & Perkins, A. S. The role of EVI1 in myeloid malignancies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **53**, 67–76 (2014).
  16. Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K. H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., Canty, A. J., Danska, J. S., Bohlander, S. K., Buske, C., Minden, M. D., Golub, T. R., Jurisica, I., Ebert, B. L. & Dick, J. E. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* **17**, 1086–1093 (2011).

17. Shimabe, M., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshimi, A., Ichikawa, M., Imai, Y. & Kurokawa, M. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene* **28**, 4364–4374 (2009).
18. Yoshimi, A., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshiki, Y., Nannya, Y., Nitta, E., Arai, S., Sato, T., Shimabe, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Kitamura, T. & Kurokawa, M. Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. *Blood* **117**, 3617–3628 (2011).
19. Glass, C., Wuertzer, C., Cui, X., Bi, Y., Davuluri, R., Xiao, Y.-Y., Wilson, M., Owens, K., Zhang, Y. & Perkins, A. Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE* **8**, e67134 (2013).
20. Gröschel, S., Sanders, M. A., Hoogenboezem, R., de Wit, E., Bouwman, B. A. M., Erpelinck, C., van der Velden, V. H. J., Havermans, M., Avellino, R., van Lom, K., Rombouts, E. J., van Duin, M., Döhner, K., Beverloo, H. B., Bradner, J. E., Döhner, H., Löwenberg, B., Valk, P. J. M., Bindels, E. M. J., de Laat, W. & Delwel, R. A Single Oncogenic Enhancer Rearrangement Causes Concomitant EVI1 and GATA2 Deregulation in Leukemia. *Cell* **157**, 369–381 (2014).



21. Yamazaki, H., Suzuki, M., Otsuki, A., Shimizu, R., Bresnick, E. H., Engel, J. D. & Yamamoto, M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell* **25**, 415–427 (2014).
22. Arai, S., Yoshimi, A., Shimabe, M., Ichikawa, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Goyama, S. & Kurokawa, M. Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood* **117**, 6304–6314 (2011).
23. Maicas, M., Vázquez, I., Vicente, C., García-Sánchez, M. A., Marcotegui, N., Urquiza, L., Calasanz, M. J. & Odero, M. D. Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription. *Oncogene* **32**, 2069–2078 (2013).
24. Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D. & Holmes, M. C. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**, 646–651 (2005).

25. Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D. & Rebar, E. J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**, 143–148 (2011).
26. Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., Cost, G. J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J. C., Zeitler, B., Cherone, J. M., Meng, X., Hinkley, S. J., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. & Jaenisch, R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* **29**, 731–734 (2011).
27. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**, 80–84 (2014).
28. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. & Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281–2308 (2013).
29. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).

30. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. & Zhao, K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007).
31. Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T. S., Shores, N., Ward, L. D., Epstein, C. B., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M., Ku, M., Durham, T., Kellis, M. & Bernstein, B. E. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**, 43–49 (2011).
32. Sander, J. D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R. T., Joung, J. K. & Yeh, J.-R. J. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 697–698 (2011).
33. Reed, S. E., Staley, E. M., Mayginnes, J. P., Pintel, D. J. & Tullis, G. E. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol. Methods* **138**, 85–98 (2006).
34. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

35. Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A. & Narechania, A. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **13**, 2129–2141 (2003).
36. Donnelly, M. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D. & Ryan, M. D. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J. Gen. Virol.* **82**, 1013–1025 (2001).
37. Vazquez, I., Maicas, M., Cervera, J., Agirre, X., Marin-Bejar, O., Marcotegui, N., Vicente, C., Lahortiga, I., Gomez-Benito, M., Carranza, C., Valencia, A., Brunet, S., Lumbreras, E., Prosper, F., Gomez-Casares, M. T., Hernandez-Rivas, J. M., Calasanz, M. J., Sanz, M. A., Sierra, J. & Odero, M. D. Down-regulation of EVI1 is associated with epigenetic alterations and good prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* **96**, 1448–1456 (2011).
38. Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A.,

- Jané-Valbuena, J., Mapa, F. A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P.,  
Shipway, A., Engels, I. H., Cheng, J., Yu, G. K., Yu, J., Aspesi, P., de Silva, M.,  
Jagtap, K., Jones, M. D., Wang, L., Hatton, C., Palescandolo, E., Gupta, S.,  
Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R. C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler,  
W., Reich, M., Li, N., Mesirov, J. P., Gabriel, S. B., Getz, G., Ardlie, K., Chan,  
V., Myer, V. E., Weber, B. L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J. L.,  
Meyerson, M., Golub, T. R., Morrissey, M. P., Sellers, W. R., Schlegel, R. &  
Garraway, L. A. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive  
modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
39. Matsubara, Y., Chiba, T., Kashimada, K., Morio, T., Takada, S., Mizutani, S. &  
Asahara, H. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction  
of exogenous gene into IL2RG locus. *Sci Rep* **4**, 5043 (2014).
40. Kitamura, T., Onishi, M., Kinoshita, S., Shibuya, A., Miyajima, A. & Nolan, G.  
P. Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *PNAS* **92**, 9146–  
9150 (1995).

41. Morishita, K., Parganas, E., Douglass, E. C. & Ihle, J. N. Unique expression of the human Evi-1 gene in an endometrial carcinoma cell line: sequence of cDNAs and structure of alternatively spliced transcripts. *Oncogene* **5**, 963–971 (1990).
42. Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L. F. & Gaynor, R. B. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* **69**, 3584–3596 (1995).
43. Ayala, Y. M., Misteli, T. & Baralle, F. E. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3785–3789 (2008).
44. Postel-Vinay, S., Véron, A. S., Tirode, F., Pierron, G., Reynaud, S., Kovar, H., Oberlin, O., Lapouble, E., Ballet, S., Lucchesi, C., Kontny, U., González-Neira, A., Picci, P., Alonso, J., Patino-Garcia, A., de Paillerets, B. B., Laud, K., Dina, C., Froguel, P., Clavel-Chapelon, F., Doz, F., Michon, J., Chanock, S. J., Thomas, G., Cox, D. G. & Delattre, O. Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nature Genetics* **44**, 323–327 (2012).

45. Park, Y.-Y., Kim, S.-B., Han, H. D., Sohn, B. H., Kim, J. H., Liang, J., Lu, Y., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Mills, G. B., Sood, A. K. & Lee, J.-S. Tat-activating regulatory DNA-binding protein regulates glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the platelet isoform of phosphofructokinase through microRNA 520. *Hepatology* **58**, 182–191 (2013).
46. Singh, K. P., Bennett, J. A., Casado, F. L., Walrath, J. L., Welle, S. L. & Gasiewicz, T. A. Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice. *Stem Cells Dev.* **23**, 95–106 (2014).
47. Smith, B. W., Rozelle, S. S., Leung, A., Ubellacker, J., Parks, A., Nah, S. K., French, D., Gadue, P., Monti, S., Chui, D. H. K., Steinberg, M. H., Frelinger, A. L., Michelson, A. D., Theberge, R., McComb, M. E., Costello, C. E., Kotton, D. N., Mostoslavsky, G., Sherr, D. H. & Murphy, G. J. The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood* **122**, 376–385 (2013).

48. Hayashibara, T., Yamada, Y., Mori, N., Harasawa, H., Sugahara, K., Miyanishi, T., Kamihira, S. & Tomonaga, M. Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 128–134 (2003).
49. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No 1**, R17–29 (2006).
50. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**, 861–874 (2011).
51. Morlando, M., Ballarino, M. & Fatica, A. Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia. *Front Med (Lausanne)* **2**, 23 (2015).
52. Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsiganos, A. & Aifantis, I. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell* **158**, 593–606 (2014).
53. Sashida, G., Harada, H., Matsui, H., Oshima, M., Yui, M., Harada, Y., Tanaka, S., Mochizuki-Kashio, M., Wang, C., Saraya, A., Muto, T., Hayashi, Y., Suzuki, K., Nakajima, H., Inaba, T., Koseki, H., Huang, G., Kitamura, T. & Iwama, A.



- Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nature Communications* **5**, (2014).
54. Voigt, P., Tee, W.-W. & Reinberg, D. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* **27**, 1318–1338 (2013).
55. Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S. & Meissner, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49–55 (2008).
56. Cui, K., Zang, C., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W. & Zhao, K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* **4**, 80–93 (2009).
57. Kishi, K. A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leukemia Research* **9**, 381–390 (1985).
58. Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C. & Eaves, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* **94**, 2056–2064 (1999).
59. Schübeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J.,

- Bell, S. P. & Groudine, M. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271 (2004).
60. Kuntimaddi, A., Achille, N. J., Thorpe, J., Lokken, A. A., Singh, R., Hemenway, C. S., Adli, M., Zeleznik-Le, N. J. & Bushweller, J. H. Degree of recruitment of DOT1L to MLL-AF9 defines level of H3K79 Di- and tri-methylation on target genes and transformation potential. *Cell Rep* **11**, 808–820 (2015).
61. Pott, S. & Lieb, J. D. What are super-enhancers? *Nature Genetics* **47**, 8–12 (2015).
62. Mansour, M. R., Abraham, B. J., Anders, L., Berezovskaya, A., Gutierrez, A., Durbin, A. D., Etchin, J., Lawton, L., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Loh, M. L., Hunger, S. P., Sanda, T., Young, R. A. & Look, A. T. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science* **346**, 1373–1377 (2014).

## 謝辞

本研究全般ならびに論文作成を進めるにあたり丁寧なご指導を頂きました、  
東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学講座 黒川峰夫教授に深く感  
謝申し上げます。

また実験全般に関してご指導・ご協力頂きました、東京大学医学部附属病院  
血液・腫瘍内科講師 荒井俊也先生、同輸血部助教 正本庸介先生に感謝申し  
上げます。