

論文の内容の要旨

論文題目 **Thrombopoietin/MPL signaling enhances growth and survival capacity of acute myeloid leukemia cells with high Evi1 expression**
(トロンボポエチンシグナルは Evi1 高発現急性骨髄性白血病細胞の増殖および生存を促進する)

氏名 西川 慧

【背景】

急性骨髄性白血病 (AML) は、造血幹・前駆細胞 (HSPCs) に様々なゲノム異常が生じた結果、HSPCs の正常な増殖・分化制御が破綻することによって引き起こされる血液疾患である。AML を特徴づける染色体異常や遺伝子変異の種類だけでなく、AML と関連する遺伝子発現の有無が、AML の診断やリスク分類の指標として用いられている。その一例に、Ecotropic viral integration site 1 (Evi1) 高発現 AML が挙げられ、Evi1 高発現 AML は AML 症例全体の 5–10% を占めている。EVI1 遺伝子は 3 番染色体長腕 (3q26) に位置しており、この領域で生じる逆位や転座によって Evi1 の異常発現が誘導される。また、Evi1 高発現は monosomy 7 や 11q23 転座といった染色体異常ともしばしば関連することが報告されている。重要なことに、観察される染色体異常のタイプに関わらず、Evi1 高発現 AML の予後は極めて不良である。

Evi1 は正常造血幹細胞 (HSCs) の自己複製能維持に必須の転写因子である。これまでに、HSCs の機能維持に重要な Gata2 や Pbx1 といった転写因子の発現を Evi1 が直接的に制御したり、分化制御を担う Runx1 や PU.1 などの転写因子に Evi1 が機能阻害的に結合したりすることで、HSCs の恒常性が保たれていることが知られている。一方で、Evi1 のがん遺伝子としての側面もいくつか報告されている。例えば、TGF- β シグナルの阻害や c-Jun N 末端キナーゼの阻害、PTEN 発現抑制を介した AKT/mTOR シグナルの活性化などが Evi1 のがん遺伝子的機能として挙げられる。また、Evi1 は数多くのエピジェネティック因子と直接的に相互作用することで下流遺伝子の発現を調節している。従って、Evi1 の過剰発現によって引き起こされたグローバルなエピジェネティック異常もまた HSCs の機能を破綻させ、最終的に AML 発症へと導くと考えられる。

このように、AML 発症や維持における Evi1 の役割が解明されてきているが、Evi1 高発現 AML の分子病態のすべてが明らかになっているわけではない。本研究では、AML 検体マイクロアレイデータ解析と、Evi1 高発現 AML モデルマウス (以下、Evi1 マウス) 解析とを組み合わせることによって、Evi1 高発現 AML 発症に関与する新しい分子メカニズムを解明することを目指した。

【結果】

まず、460 症例からなるヒト AML 骨髄細胞のマイクロアレイデータ解析により、EVI1 低発現

症例（430 症例）と比較して、*EVII* 高発現症例（30 症例）では *CD41* (*ITGA2B*) や、トロンボポエチン (TPO) 受容体である *MPL* などの巨核球・血小板系表面マーカーの発現が有意に上昇していることを見出した。別コホートの AML マイクロアレイデータにおいても、これらの表面マーカーと *EVII* 発現とが相関することが確認された。さらに、5-フルオロウラシル (5-FU) 投与マウスより採取した幼若骨髄細胞に *Evi1* 遺伝子をレトロウイルスで導入し、半固形培地にて *in vitro* で不死化させた細胞を定量 PCR および FACS で解析したところ、*Evi1* 過剰発現によって *CD41* 陽性画分が出現することがわかった。以上より、ヒト AML 細胞およびマウス骨髄細胞において *Evi1* と *CD41* の発現が相関することが示された。

次に、*Evi1* マウスを用いて、*Evi1* と *CD41* の関係を調べた。*Evi1* マウスは、5-FU 投与マウスより採取した幼若骨髄細胞に *Evi1* 遺伝子を導入し、半致死量の放射線照射を施したレシピエントマウスに移植することで得られた。*Evi1* マウスの骨髄および脾臓細胞を FACS で解析したところ、*in vitro* での結果と同様に、*Evi1* 陽性細胞の 20–60% に *CD41* 発現が認められた。次に、*CD41* 陽性細胞と *CD41* 陰性細胞をそれぞれ FACS にてソーティングし、各種の性状比較を行った。その結果、*CD41* 陽性細胞は *CD41* 陰性細胞と比較してより高頻度に白血病芽球の形態を示しただけでなく、半固形培地での高いコロニー形成能と抗アポトーシス活性が認められた。さらに重要なことに、レシピエントマウスへの 2 次移植実験において、*CD41* 陽性細胞はより高い白血病発症能を示すことがわかった。以上より、*Evi1* マウスにて出現する *CD41* 陽性細胞は、白血病形成への寄与が少ない単なる分化細胞ではなく、より高い白血病発症能を伴った未分化な白血病細胞であることが示唆された。

引き続き、*CD41* 陽性細胞に強い白血病発症能を付与する分子メカニズムの同定を試みた。ヒト AML 検体において *EVII* 発現と *MPL* 発現とが相関していることに着目し、*Evi1* マウスでの *Mpl* 発現を定量 PCR および FACS にて解析した。その結果、*Mpl* は *CD41* 陽性画分にて有意に発現していることを見出した。TPO は巨核球・血小板の分化および成熟のみならず、HSCs の静止期維持にも重要な機能を果たすサイトカインとして知られている。そこで私は、TPO/*MPL* シグナルが細胞外因子として *Evi1* マウス細胞の増殖・生存に寄与するという仮説を立てた。まず、*Evi1* マウス細胞の機能を *in vitro* で解析するための実験系を構築した。すなわち、*Evi1* マウス骨髄もしくは脾臓細胞を、TPO の存在下で、ストローマ細胞である OP9 細胞と共培養することによって、*Evi1* マウス細胞が TPO 依存的に増殖することを見出した。さらに、OP9 共培養系において *CD41* 陽性細胞は、*CD41* 陰性細胞と比較して、TPO 存在下で高い増殖活性と抗アポトーシス活性を示した。また、shRNA を用いて *Mpl* 発現を部分的にノックダウンさせた *Evi1* マウス細胞をレシピエントマウスへ移植したところ、コントロール群と比較して有意に生存が延長することがわかった。以上より、TPO シグナルが *CD41* 陽性 *Evi1* マウス細胞に造腫瘍性を付与することが示された。

次に、TPO/*MPL* シグナルの下流で変動する分子として、抗アポトーシス分子である BCL-2 ファミリー分子に着目した。BCL-2 ファミリータンパク質の発現量を *CD41* 陽性および陰性画分とで比較したところ、BCL-xL が *CD41* 陽性画分にて有意に高い発現を示した。さらに、*in vitro* での TPO 刺激によって、BCL-xL の発現が上昇することを見出した。最後に、*CD41* 陽性細胞を BCL-xL 特異的阻害剤 (WEHI-539) で処理することによって、アポトーシスが亢進し、増殖活性が低下することを OP9 共培養系にて示した。以上より、TPO/*MPL*/BCL-xL シグナルが *Evi1* マウ

ス細胞の増殖および生存に重要なパスウェイであることが証明された。

【結論】

本研究では、TPO シグナルが Evi1 高発現 AML 細胞の増殖および生存を支持するという新たな分子メカニズムを提唱した。まず、ヒト AML 検体のマイクロアレイ解析で見出した *EVII* と *CD41*、*MPL* の相関関係を Evi1 マウス細胞においても同定した。さらに、CD41 陽性 Evi1 マウス細胞が *in vivo* にて高い白血病発症能を示す画分であることを証明したとともに、CD41 陽性 Evi1 マウス細胞の増殖および生存を促進する機構として、TPO/MPL/BCL-xL パスウェイを見出した。本研究で発見した Evi1 高発現 AML と TPO シグナルの関与は、これまでに報告されている Evi1 の多彩ながん遺伝子的機能に新たな側面を付与するものであり、極めて予後不良である Evi1 高発現 AML の分子病態の全体像解明に繋がることを期待したい。

一方で、本研究では *EVII* 高発現 AML 検体を用いた TPO シグナルの重要性については十分に裏付けられていない。本研究にて入手することのできた少数例の *EVII* 高発現 AML 検体において、CD41 陽性画分の存在を FACS 解析にて認めたが、今後は臨床検体のより詳細な解析を通して、TPO/MPL シグナルと Evi1 高発現 AML との関係を解明していく必要がある。また、Evi1 高発現下において、どのようにして CD41 や Mpl の発現が上方制御されているかに関しても明らかになっていない。転写因子としての Evi1 が直接的に CD41 や Mpl の発現を亢進させる可能性、もしくは、Evi1 高発現によって生じるエピゲノム恒常性の破綻が間接的にこれらの分子の発現異常を惹起する可能性が考えられる。Evi1/CD41/Mpl の発現制御ネットワークの同定は、Evi1 高発現 AML の分子病態をより詳細に理解する上での今後の課題である。