

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 井上 大地

本研究は骨髄異形成症候群（MDS）の発症・進展において重要な役割を果たしていると考えられる C 末端欠失型 ASXL1 遺伝子変異の意義を明らかにするため、マウス骨髄系細胞株である 32Dcl3 細胞を用いた系、ならびにマウス骨髄移植モデルを中心に解析を進め、下記の結果を得ている。

1. 臨床検体を用いたこれまでの解析で ASXL1 遺伝子変異のほぼ全例が heterozygous であり、変異部位は exon 12 前半に集中し C 末端側の欠失をきたすことが明らかとなっている。まず、これら患者由来の cDNA をクローニングし pMYs-IRES-GFP ベクターを用いて細胞株においてタンパク発現を確認した。ASXL1 野生型 (ASXL1-WT) はこれまでに抑制性のヒストンマークである H3K27me3 を修飾する EZH2 と結合する事が知られているが、ASXL1 変異体 (ASXL1-MT) も同様に EZH2 と結合し得ることを示した。また、ASXL1-WT・ASXL1-MT とともに核内に局在することを共焦点顕微鏡を用いて明らかにした。
2. ASXL1-MT をマウス白血病細胞株 32Dcl3 細胞に強制発現させ G-CSF 下で培養したところ、mock・ASXL1-WT に比べて形態・CD11b 発現強度の観点から分化を顕著に抑制した。HL60 などのヒト白血病由来の細胞株でも同様の結果であった。
3. ASXL1-MT を用いたマウス骨髄移植モデルでは、移植後 6 か月から血球減少、偽ペルゲル核異常・過分葉などの分葉異常、芽球の末梢血中への出現、骨髄の過形成などヒト MDS に類似した形質を呈し 1 年以上の経過（中央値 400.5 日）を経て死亡することを示した。
4. 増殖において有利に作用する N-Ras 活性型変異体と ASXL1-MT を共発現させた骨髄細胞を移植すると N-Ras 活性型変異体により惹起される MPN (骨髄増殖性腫瘍) に分化抑制が加わり、AML (急性骨髄性白血病) 様の病態を呈した。発症・死亡までの期間の短縮、芽球比率の顕著な上昇から ASXL1-MT は生体内においても分化抑制をきたすことが示された。
5. 分化抑制のメカニズムとして 32D 細胞ならびに発症マウスの骨髄細胞の発現解析の結果より、好中球への分化との関連が報告されている type II 細胞膜レセプターの Clec5a の発現が顕著に低下している事を見出した。shRNA

や add-back 実験を用いて、ASXL1-MT の分化抑制は Clec5a の発現低下に起因する事、Clec5a は骨髄球系への分化に必須であることを示した。さらに MDS 患者においても CLEC5A の発現が低下している事を臨床サンプルの解析から実証した。

6. ASXL1-MT を導入すると EZH2 をはじめとするポリコーム複合体の標的遺伝子の発現を生理的状态とは逆に上昇させることを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を用いて示した。このメカニズムとして、ASXL1-MT は ASXL1-WT と EZH2 の結合を阻害し EZH2 と優先的に結合してポリコームの作用を阻害する事を詳細なタンパク実験により示した。
7. ポリコームの標的遺伝子のうち、Hoxa9 をはじめとする Hoxa 遺伝子の発現亢進を認めたが、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて同部位での EZH2 による H3K27me3 の修飾が顕著に低下し発現レベルと逆相関していることを示した。また、臨床サンプルを用いた解析でも HOXA9 は ASXL1 変異を有する MDS 患者において有意に上昇している事も明らかにした。
8. Clec5a が低下する機構については、ポリコーム複合体が microRNA の発現制御に関わっていることから Clec5a をターゲットとする microRNA が脱抑制をきたすという仮説を立てた。実際に microRNA の発現解析と microRNA のデータベースを用いた検討を行い、miR-125a の発現上昇が Clec5a の発現抑制の主たる因子であることを過剰発現系・レイシフェラーゼアッセイなどをもとに明らかにした。

以上、本論文は ASXL1-MT が単独で MDS を発症することを生体モデルで示しただけでなく、ポリコーム複合体の機能抑制を介して Hoxa9 や腫瘍関連 microRNA の脱抑制をきたす新たなメカニズムを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、血球分化や悪性腫瘍への形質転換における ASXL1 遺伝子とポリコーム複合体の働きを解明する上で重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値すると考えられる。