

博士論文

論文題目 RUNX1関連キメラ蛋白質とポリコーム複合体による
協調的転写調節機構

氏名 藤岡 洋成

RUNX1関連キメラ蛋白質とポリコム複合体による 協調的転写調節機構

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程内科学専攻 血液・腫瘍病態学

指導教員 黒川 峰夫 教授

氏名 藤岡 洋成

目次

要旨	2
序文	3
実験方法	10
結果	19
考察	36
謝辞	39
参考文献	40

要旨

近年、造血器腫瘍においてエピジェネティック制御因子の変異が数多く報告され、その発症にはエピジェネティクスの異常が深く関与していることが明らかになってきた。私が所属する研究室ではこれまでに代表的なエピジェネティック制御因子の一つであるポリコーム群（PcG）複合体と白血病関連遺伝子異常に注目して研究を進めてきたが、なかでもAML1関連染色体転座とPcG複合体の関係については、キメラ遺伝子AML1/ETOとPcG複合体の結合を確認されたがその意義については不明のままであった。そこで今回、AML1関連染色体転座AML1/ETOおよびAML1/Evi1とPcG複合体が協調して転写制御を行う標的遺伝子の探索を通じて、これらのキメラ遺伝子を有する白血病における新規治療標的の同定を試みることにした。マウスの骨髄細胞にAML1/ETOあるいはAML1/Evi1を発現させたのちにRNA干渉の手法を用いてEZH2の発現をノックダウンした際の遺伝子発現変化を調べたところ、AML1/ETO導入細胞においてはPU.1、Mpo、IEX1の発現が、AML1/Evi1導入細胞においてはCD41、IEX1の発現がAML1/ETOあるいはAML1/Evi1により低下し、かつEZH2の抑制により脱抑制されることがわかった。そこで、PU.1、Mpo、IEX1、CD41のプロモーター領域の配列を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、IEX1の転写活性がAML1/ETOおよびAML1/Evi1により低下し、EZH2のdominant negativeフォームの導入により転写抑制が解除されることがわかった。以上より、AML1/ETOおよびAML1/Evi1はPcG複合体と協調してIEX1の転写をエピジェネティックに抑制している可能性が示唆された。

序文

エピジェネティクスは、DNA塩基配列の変化を伴うことなく、後天的なクロマチン修飾により遺伝子発現の多様性が生じる仕組みを指す。エピジェネティクスは、ゲノム上の多数の遺伝子のON/OFFを制御することで、発生から再生、老化、がん化、遺伝にいたる様々な生命現象を制御する高次元のシステムと言える。特に近年、がんとエピゲノム異常をめぐる研究成果は確実に積み上げられ、造血器腫瘍の病態にエピジェネティクス異常が深く関与することが明らかになってきた(1-4)。

エピジェネティック制御因子はヒストン修飾、DNAメチル化、miRNAなどを介して遺伝子発現を時間的・空間的に制御し、細胞分裂後も遺伝子発現を正確に継承する働きをもつ。この中でヒストンはメチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化など多様な修飾を受けてクロマチンの高次構造を決定し、転写制御を行う。特異的なヒストン修飾を担う様々な因子がこれまでに同定されているが、中でもポリコーム群(PcG)複合体はその代表例である。PcG複合体は、前後軸形成が異常なショウジョウバエの原因遺伝子として同定され、HOXクラスターにコードされるホメオドメインタンパク質の発現を調節することが明らかにされた。その後、PcG複合体は、前後軸形成の制御にとどまらず、細胞の増殖・分化、X染色体の不活化、がん化、幹細胞制御など多様な生命現象に関与することがわかった。PcG複合体は数十ものタンパク質から成り、生化学的にはさらに2つの複合体に大別される[Polycomb repressive complex (PRC) 1およびPRC2]。PRC2はヒストンテールのメチル化(ヒストン3リジン27; H3K27)を、PRC1はヒストンテールのユビキチン化(ヒストン2Aリジン119; H2AK119)を介してクロマチン高次構造を変換し、数百を越える標的

遺伝子の発現を抑制し、あるいはいくつかの主要なシグナルの制御に関与することが知られている。EZH2は、SUZ12、EED、RBBP4 (RbAp48) などとともにPRC2に属し、H3K27のメチル化活性を有するとともに、DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferase; DNMT) をリクルートしてDNAメチル化も誘導する分子である (5)。一方、RING2はBMI1などとともにPRC1に分類され、E3 ligaseとしてH2AK119のユビキチン化を担当する。

近年、造血器腫瘍においてエピジェネティック制御因子の変異が数多く報告され、その発症にはエピジェネティクスの異常が深く関与していることが明らかになってきた。7番染色体およびその長腕の欠失 (-7、7q-) は急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) で見られ、予後不良と関連することが以前から報告されていたが (6)、その特異的標的遺伝子については知られていなかった。2008年から2009年にかけて、7番染色体長腕のacquired uniparental disomy (aUPD) がMDSや骨髄増殖性疾患 (MPN) に認められることが報告され (7-9)、2010年になり、その標的遺伝子の一つとして7番染色体長腕7q36.1に位置するEZH2の変異が複数のグループにより同定された (10-12)。これらの報告はいずれも高解像度SNPアレイにより7q36を含む領域のaUPDやmicrodeletionを解析した結果、EZH2に注目し、DNA resequenceによってEZH2のフレームシフトやナンセンス変異、ミスセンス変異の同定に至っている。Ernstらによれば (10)、このようなEZH2の変異はMDSの6% (9例/154例)、MDS/MPNの12% (27例/219例)、MPNの6% (5例/90例) に認められた。また、慢性好酸球性白血病にも少数の変異が認められたが、一方で-7/7q-を伴うAML (54例) や慢性骨髄性白血病 (CML) (40例) にはEZH2の変異が認められなかった。Nikoloskiらも同様にMDSの6% (8例/126例) にEZH2の変異を同定した

(12)。続いてMakishimaらもUPD7qや7q36.1のmicrodeletionを伴うMDS、MDS/MPN、まれにAMLにEZH2の変異が見られることを報告している(11)。上記の報告で認められたEZH2変異はヒストン修飾に必要なCXC-SETドメインや、SUZ12など他のポリコームタンパク質との結合に必要なドメインIIに多く認められる傾向があった。実際にin vitroでの機能アッセイにより、いくつかのEZH2変異体はH3K27のメチル化能が低下することが示されており(10-11)、骨髄球系腫瘍にみられるEZH2の変異は機能欠失型変異と考えられている。

一方で、EZH2 ががん遺伝子として働く例もいくつか報告されている。Morin らによれば、EZH2 の機能亢進型変異が、胚中心 B 細胞型のびまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) の 22%に、濾胞性リンパ腫 (FL) の 7%にそれぞれ見いだされた(13)。EZH2 は胚中心 B 細胞の免疫グロブリン H 鎖遺伝子再構成を伴う早期発達に必須の遺伝子であることが知られており、EZH2 の機能異常がリンパ球系腫瘍の病態形成にも関与する可能性が示唆される。DLBCL および FL にみられる EZH2 変異は骨髄球系腫瘍と異なり、Tyr641 の点突然変異に限局する。さらに、PcG 複合体が正常の発現・機能を保っているにもかかわらず、染色体転座などによりがんの病態の鍵となるような異常産物、転写因子が生じ、それらが PcG 複合体をリクルートすることで、がん抑制遺伝子などの発現を異常に抑制する例がある。例として、融合遺伝子 PML/RAR α (14)、PLZF/RAR α (15) や白血病がん遺伝子 Evi1 の過剰発現(16)などが挙げられる。また、上皮性がんでは EZH2 の過剰発現ががんの進行性と相関し、予後不良因子となるとの報告が多い(17)。前立腺がんにおいて、EZH2 の発現を抑制する miR101 が高頻度に欠失しているという報告があり(18)、miRNA が EZH2 の過剰

発現、さらにがんを促進する役割を担う可能性がある。また、前立腺がんで頻繁にみられる **TMPRSS2/ERG** 融合タンパクは **EZH2** の発現を誘導する (19)。これらの文脈では **EZH2** はがん遺伝子としての機能をもつと考えられ、上述の骨髄球系腫瘍における **EZH2** の働きとは相反する。

上記のことから、正常細胞やがん細胞において、**EZH2** をはじめとするエピジェネティック制御因子は時間的・空間的に多様な、ときに相反するような機能を発揮していることを示唆し、エピジェネティクスによる精緻な制御バランスの崩壊ががん化につながりうることを表している。

私が所属する研究室でも、**PcG**が **Evi1** と結合してその標的遺伝子 **PTEN** の発現をエピジェネティックに制御すること (16)、染色体転座 **t(8;21)** により生じるキメラ蛋白質 **AML1/ETO** が **PcG** に結合すること (未発表) をこれまでに見出したが、特に後者の意義については研究が進んでいない。また、慢性骨髄性白血病の急性転化症例や **MDS** にみられる染色体転座 **t(3;21)** によって生じる **AML1/Evi1** も (20-22)、同様にして **PcG** と結合することが予想される。これらのことから、私は **AML1** 関連白血病と **PcG** 複合体との関係について研究を進めることとした。**AML1** 遺伝子は正常造血に必須な遺伝子であり、正常造血において造血幹細胞から骨髄球系細胞への分化へ関与することが知られており (23)、当研究室においても **AML1** 遺伝子の欠失したマウスにおいて **MLL/ENL** 白血病細胞の移植を行ったところ、白血病の発症が有意に促進したという結果を得ており、さらに **AML1** 欠失マウスではアポトーシスに関連する **p53** や **p19Arf** や細胞周期に関連する **CDK** インヒビター遺伝子の発現が低下していることが判明した (24)。これらのことから **AML1** はアポトーシスや細胞周期に関連する

遺伝子を制御して正常造血を司っていることが示唆されている。その一方で、AML1遺伝子は急性骨髄性白血病にて高頻度に染色体転座の標的になりやすい。AML1遺伝子の構造として、DNA結合部位であるRuntドメインに結合するPST regionには正常造血に関与する転写活性化ドメインがついており、これによって正常造血に必要な遺伝子の発現が上昇し、正常血球が産生される一方で、AML1/ETOは、染色体転座t(8;21)によって起こり、AMLの中でも40%と高頻度かつ特異的にみられる染色体異常であり、AML1遺伝子のDNA結合部位であるRuntドメインを含むN末端部分以降の活性化部位の代わりに、ETO (MTG8) 蛋白質が融合したキメラ蛋白質が形成されている。同様にAML1/Evi1はAML1のRuntドメインにEvi1の全長が融合したキメラ蛋白質である(Figure 1)。

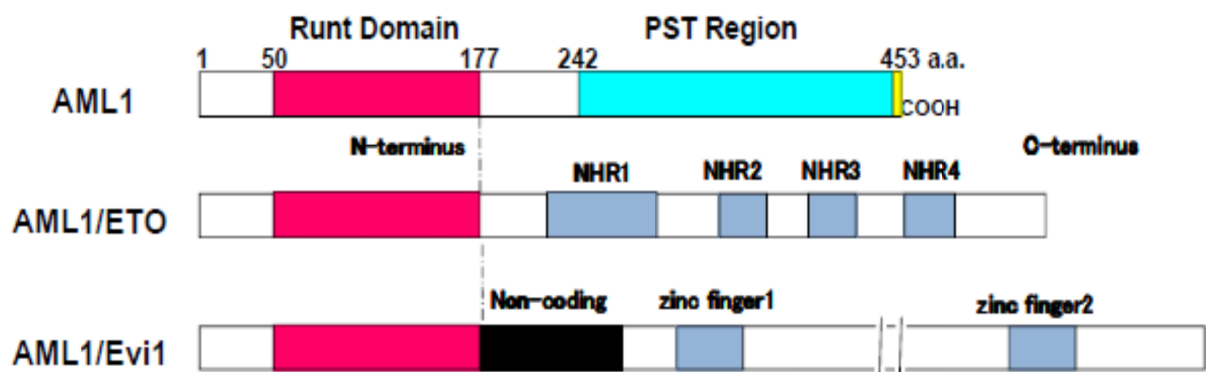


Figure 1 AML1 遺伝子および AML1 関連キメラ遺伝子 (AML1/ETO・AML1/Evi1 遺伝子)

の構造

AML1 遺伝子には、Runt domain の後に AML1 の転写活性化を ERK のリン酸化によって受ける PST region という活性化ドメインが結合している一方、AML1/ETO および AML1/Evi1 は Runt domain にこのドメインが脱落する代わりにそれぞれ ETO および Evi1 遺伝子が結合する構造をとっている。

そこで本研究では、PcG複合体（PRC1およびPRC2）とAML1/ETOおよびAML1/Evi1が結合することをまず免疫沈降法により確認した。その後、これらキメラ蛋白質に結合しているPcG複合体が正常遺伝子をdominant negativeに抑制させることにより、AML1/ETOやAML1/Evi1の白血化に関与していると考えた (Figure 2A)。そこで、既知のAML1標的遺伝子のうち、PcG複合体がAML1/ETOおよびAML1/Evi1と協調して制御する標的遺伝子を探索すべく、前述のヒストンメチル化能を有するPcG複合体PRC2の構成要素であるEZH2をノックダウンすることにより、発現が上昇する遺伝子を探索した (Figure 2B)。

これらAML1関連キメラ遺伝子が抑制していると考えられる標的遺伝子が白血病発症に関われば、治療標的化の可能性があるため、大変有意義であると考えられる。ところが、実際にはそのような標的遺伝子は同定されていないことから、本研究ではPcG複合体とAML1関連キメラ蛋白質が協調して制御する標的遺伝子の同定を目指した。

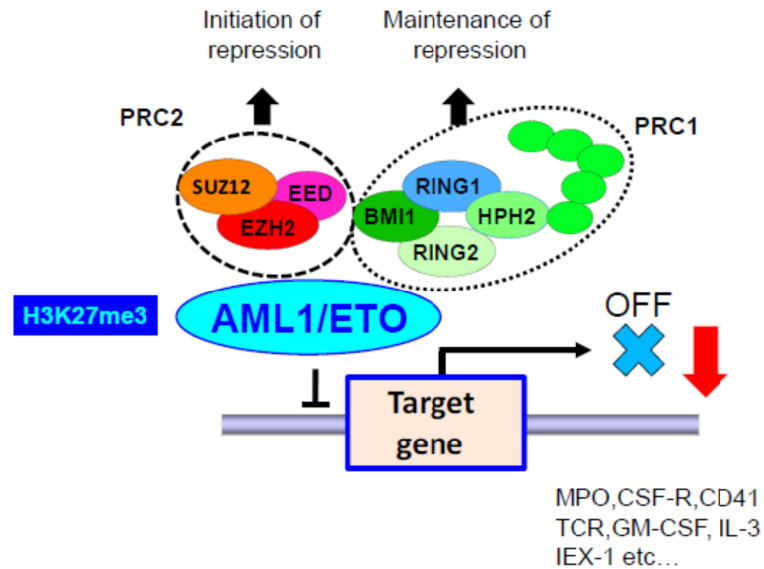
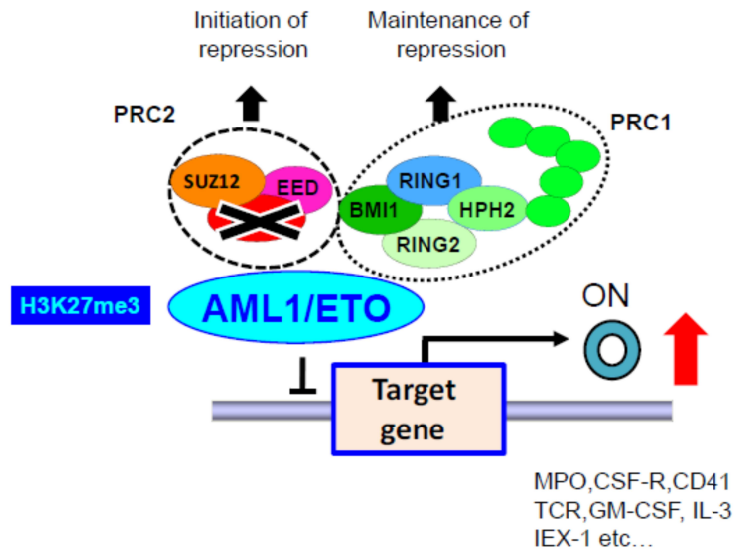
A**B**

Figure 2 PcG 複合体の dominant negative な標的遺伝子の制御

AML1/ETO に結合する PcG 複合体に発現が制御されていると考えられる既知の AML1 標的遺伝子のうち、PRC2 の構成要素である EZH2 をノックダウンさせることにより、発現が上昇する遺伝子を PcG 複合体によりサイレンシングを受ける遺伝子として同定することを目指した。

実験方法

細胞培養

ヒト腎臓由来細胞 HEK293T 細胞は 10 % の Fetal calf serum (FCS) および 1 % penicillin と streptomycin (PS) を添加した Dulbecco modified Eagle medium (D-MEM) 培地で 37°C・二酸化炭素濃度 5% の条件で培養した。レトロウイルスパッケージング細胞である Plat-E 細胞(東京大学医科学研究所北村俊雄先生より供与)は 10 % の FCS および 1 % の PS、1.0 µg/ml の puromycin と 10 mg/ml の Blastocidine 添加の D-MEM 培地で同様の条件下に培養した。

マウス

実験に使用した全てのマウスは、C57BL/6J マウス (8-10 週齢の雌) を三協ラボサービス (東京) より購入した。動物実験は本大学施設のガイドラインに従って施行した。

プラスミド

HA tag 付き AML1/ETO 蛋白質をコードするプラスミドは、以前報告されたものを使用した (22)。白血病キメラ遺伝子を発現するレトロウイルスを作成するため、以下のプラスミドを使用した。pMSCVneo-AML1/ETO (22)、pMSCVneo-AML1/Evi1 (25)。また、免疫沈降法におけるトランスフェクションでは以下のプラスミドを使用した。pcDNA3-Flag -EZH2、pCMV-Myc -SUZ12、pCMV-Flag -EED、pcDNA3-Flag -BMI1、pcDNA3-Flag -RING1、pcDNA3-Flag -RING2、pcDNA3-Flag -HPH2(これらのプラスミドは M. Bollen、A. Eynde、K. Yamamoto、H. Wang、G. Maertens により提供)。なお pCMV-FLAG-SUZ12 は、九州大学山本健先生より供与を受けた pCMV-MYC-SUZ12 の MYC-tag を PCR にて FLAG-tag に変更した。pCMV-Flag-EED は M. Bollen、A. Eynde より供与を受けた EED cDNA に、PCR によって

FLAG-tagを付加し、EcoRI -BamHIサイトでpCMVベクターに挿入して作成した。

pMSCV-IRES-GFP-MLL/AF9は、JL Hess (University of Pennsylvania School of Medicine)より供与を受けたpMSCV-neo-MLL/AF9上のMLL/AF9のcDNAを、EcoRIで切り出し、pMSCV-IRES-GFPベクターに、Ligation high ver.2 (Toyobo、大阪)を用いて挿入して作成した。

レトロウイルス作成とマウス骨髄細胞への感染

レトロウイルスを産生する目的にて、10%FCSおよび1%PSを添加したDulbecco modified Eagle Medium high glucose培地 (Wako、大阪)に溶解した 1×10^6 のPlat-E細胞を60 mm培養皿で一晩培養後、ウイルスベクタープラスミド3 μg およびFuGENE6 (Roche, Indianapolis, IN, USA) 9 μl をDMEM 91 μl と混合した溶液を添加してトランスフェクションを行った。24時間後にメディアウムを交換し、更に24時間培養後の上清をウイルス液として回収し、RetroNectin (Takara Bio, 大津) コートプレート上で2000G・32°C・2時間の遠心を行ったのち、ウイルス液を除去した。感染させる細胞を加え、500G・32°C・5分間遠心後、37°C・二酸化炭素濃度5%の培養器で2日間培養した。

正常マウス骨髄細胞に対するウイルス感染を行う場合、5日前に5-fluorouracil (5-FU ; 150 mg/匹) の投与を行ったマウスの骨髄を回収し、Histopaque 1083 (Sigma Aldrich Japan, 東京) を使用して単核球分離を行った。細胞は、prestimulation medium (20%FCS・1%PS 添加 alpha-Minimum Essential Medium (Wako、大阪) , 50 ng/ml の stem cell factor (SCF ; Wako、大阪) , Flt3-ligand (Flt3L ; R&D, Minneapolis, MN, USA) , Thrombopoietin (TPO ; Kyowa Kirin、東京) , IL-6 (Kyowa Kirin、東京) で一晩培養を行った後、ウイルス感染を行った。マ

ウス一次白血病細胞および不死化細胞に対してウイルス感染を行う場合、20%FCS・1%PS 添加 RPMI1640 に 10 ng/ml の IL3 (Kyowa Kirin、東京) を添加した培地で一晩培養したのち、感染を行った。

Short hairpin RNA (shRNA)

マウス EZH2 に対する標的配列を含むオリゴヌクレオチドを、pSIREN RetroQ (puromycin 耐性) および pSIREN ZsGreen (Takara Bio、大津) にメーカーのマニュアルに従って挿入して作成した。前述の方法で Plat-E 細胞を用いてウイルスを作成後、白血病細胞または不死化細胞に感染させて、ネガティブコントロールの shRNA と比較して標的遺伝子の発現低下が確認できたものを実験に使用した。ネガティブコントロールはメーカーから供給されているランダム配列が挿入されたベクターを用いた。

pSIREN RetroQ に組み込んだ shRNA を細胞に感染させた場合は、3 日後より 7-14 日間 puromycin 2.5 µg/ml を含む培地で培養することで細胞を選択した。

マウス EZH2 の標的配列を以下に示す。

EZH2; GGTGGAAGACGAAACTGTT

ルシフェラーゼアッセイ用レポーターベクター作成

下記の qRT-PCR の結果に基づいて、候補遺伝子を CD41、PU.1、Mpo、IEX1 の 4 つに絞りこみ、これらの遺伝子において、マウスとヒトとの共通度の高い領域をコードする配列をオンライン作成ツール r.Vista 2.0 (<http://rvista.dcode.org/>) にて確認し、プロモーター領域を挟むようにしてプライマーの設計を行い、末端に目的とする制限酵素の切断サイトを付与した。32D 細胞の genome DNA をテンプレートとして各プライマーで PCR thermal cycler

で PCR 反応を行った後、各プライマーの該当制限酵素で切断したルシフェラーゼアッセイ用ベクター pGL4.10 (Promega、東京) と PCR 産物を DNA Ligation high (Takara Bio、大津) で挿入した。また、後述の KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO、大阪) にて、RUNX1 に結合する配列に対して変異を挿入した後に、同様にルシフェラーゼアッセイに用いた。

レポーターベクター作成に用いたプライマーは以下の通り。

PU.1; F (BglII); GCCGCTAGCTCTCTCACCTGTTCCTGCT

; R (HindIII); GCCCCAGATCTCTCCGAGTCGTCCAGAGAAC

CD41; F (NheI); GGCTAGCGGACCACCTTTCCTCAGAGA

; R (HindIII); GGGCGAAGCTTCTTAGGCCAAGACCCATTCA

Mpo; F (NheI); GGCTAGCCAAAATCTGCAAGCAAGCGTCAAA

; R (HindIII); GGGCGAAGCTTCACTGCTCTTCCAAAGGTC

IEX1; F (BglII); GCCCCAGATCTCCCTTCCACTCTGGTTCCT

;R (NheI); GCCGCTAGCTCCCTTGATCTTGCTGGACT

EZH2 および dominant negative EZH2

ルシフェラーゼアッセイに供する細胞として、HEK293T 細胞に AML1/ETO、AML1/Evi1 を強制発現させた後、EZH2 を co-transfection させ、EZH2 の影響を調査した。EZH2 はその構造として、メチル基転移活性をもつ SET domain を有している(Figure 3A)。そこで EZH2 のこのメチル化転移能を失活させることが既報により明らかになっている、SET domain の 689 番目の塩基に point mutation を挿入し作成された pcDNA3-dominant negative EZH2 (A. Eynde より供与)を用い(Figure 3B) (26)、EZH2 のメチル化能を失ったコントロールとして使

用した。

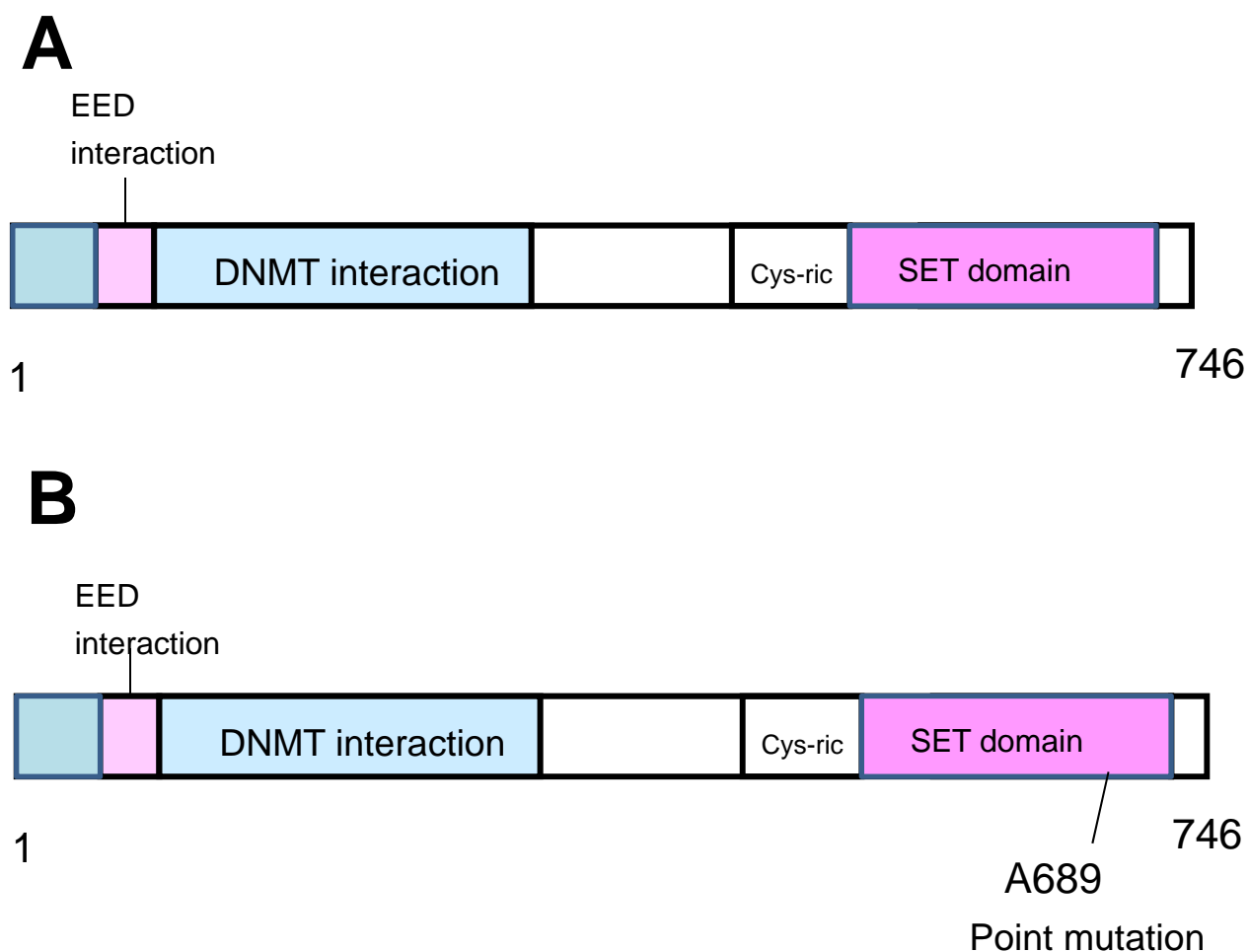


Figure 3 EZH2 および dominant negative EZH2 の構造

EZH2 はメチル基転移活性を有する SET domain を有している(Figure 2 A)。dominant negative EZH2 はこの SET domain の 689 番目の塩基に point mutation を挿入し、このメチル化能を阻害することができる。

Mutagenesis

プラスミド DNA を template として変異を挿入したプライマーを設計し、Inverse PCR を行った。次に KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて、PCR 産物に制限酵素 DpnI を加え、

template のプラスミドを消化した。その後、直鎖状の PCR 産物を self-ligation させることにより、環状化させた後、大腸菌による形質転換を行い実験に用いた。

ルシフェラーゼアッセイ

24 well plate の各 well に 1.0×10^5 個ずつ HEK293T 細胞を播種し、mock、AML1/ETO、AML1/Evi1 発現ベクター $0.1 \mu\text{g}$ 、各コンストラクトレポータープラスミド $0.1 \mu\text{g}$ と pGL-Dual TK vector $0.01 \mu\text{g}$ 、さらにそれぞれに対して、pcDNA3-EZH2、pcDNA3-dominant negative EZH2 を各 $0.1 \mu\text{g}$ をトランスフェクションにて導入した。その後、 37°C で 24 時間培養後、 $300 \mu\text{l}$ の細胞溶解剤（ピッカジーン デュアルシーパンジー用培養細胞溶解剤、東洋インキ）で細胞を溶解した。細胞抽出液 $50 \mu\text{l}$ に発光基質液 $50 \mu\text{l}$ （ピッカジーン発光試薬 II）を加え、ルミノメーターで 20 秒間発光を測定した。得られたデータは control のルシフェラーゼ活性を 1 として、各群の活性値を比較し相対ルシフェラーゼ活性値として算出した。

すべての解析は duplicate で行い、3 回ずつ施行した。

定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

細胞を回収後、RNeasy Mini (QIAGEN、東京) をメーカーのマニュアルに従って用いて RNA を抽出した。その後、QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN、東京) をメーカーのマニュアルに従って用い、cDNA への逆転写を行った。qRT-PCR は、SYBR GreenII (Takara、大津) および LightCycler480 system (Roche Diagnostics Japan、東京) を用いた。Cp 値から計算された発現量を内部標準遺伝子である GAPDH の発現量で除した値を発現量として比較した。得られたデータは control の mRNA 発現量を 1 として、各群の発現量を比較し相対発現量として算出した。すべての解析は triplicate で行い、3 回ずつ施行した。

qRT-PCR に使用したプライマーは以下に示す。

GAPDH; F; TGTCCGTCGTGGATCTGAC

; R; CCTGCTTCACCACCTTCTTG

EZH2; F; GAAAAAGGACGGCTCCTCTAA

; R; CATGGACACTGTTTGGTGTTG

PU.1; F; GGAGAAGCTGATGGCTTGG

; R; CAGGCGAATCTTTTTCTTGC

CD41; F; TGCTGCTGACCCTGCTAGT

; R; GTCGATTCCGCTTGAAGAAG

p19Arf; F; TGAGGCTAGAGAGGATCTTGAGA

; R; GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA

Mpo; F; TCGATGGAATGGGGAGAAA

; R; TCCCGGTATGTGATGATCTG

ELANE; F; TGGAGGTCATTTCTGTGGTG

; R; CTGCACTGACCGGAAATTTAG

LAT2; F; GTGTGGGATTATTGCTGCT

; R; TTTTCTCATTCTCTTCACTCCT

A1467606; F; TCCCCTGTGGACCTTGTATT

; R; TGAAGAAGGCTGTGAGAGAGG

IL-3; F; TACATCTGCGAATGACTTGC

; R; GGCTGAGGTGGTCTAGAGGTT

IEX1; F; CAGCCGAAGGGTGCTCTAC

; R; AAATCTGGCAGAAGATGATGG

OGG1; F; TTATCATGGCTTCCCAAACC

; R; GTACCCCAGGCCCAACTT

POLE; F; TCAAGACTTTGATATTCGGACAAT

; R; CACTCCCCAGCCTCTCTATG

Western Blot

Total cell からの蛋白質抽出は、 $1-5 \times 10^6$ 個の細胞を用いて行った。Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% Aprotinin, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM β -glycerophosphate, 2.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1 \times cOmplete (Roche Diagnostics Japan、東京) 100 μ l で細胞ペレットを溶解し、4°Cで 30 分振盪したのち、12,000g で 10 分遠心分離後の上清を採取し、Bradford 法にて濃度測定を行った。Sample Buffer (0.1% Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycerol, 7.5% ブロムフェノールブルー) 95°Cで 5 分間加熱した検体 50 μ g を 10%アクリルアミドゲルで電気泳動した。PVDF (Polyvinylidene difluoride)メンブレンに転写後、抗 AML1/ETO 抗体、抗 AML1/Evi1 抗体 (両者共に Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA)を一次抗体として結合させ、HRP conjugated-抗ウサギ IgG 抗体 (Millipore, Billerica, MA) を二次抗体として、LAS3000 を使用して撮影した。

免疫沈降法

HEK293T を 10 cm 張り付き培養皿に 1×10^6 個散布して一晩培養し、FuGene6 を用いてプラスミドをトランスフェクションさせ、2 日後に上記のマウス骨髄細胞からの蛋白質抽出と同様の方法で蛋白質を回収した。それぞれ 2 mg の蛋白質を、200 μ l に調整し、AML1/ETO では 2 μ g の抗 HA 抗体 (MBL 医学生物研究所, 愛知) と AML1/Evi1 では 2 μ g の抗 T7 抗体 (Cell Signaling Technology Japan, 東京) と一晩反応させた。翌日 ProteinG (GE ヘルスケアジャパン, 東京) と 4°C で 1 時間攪拌しながら反応させた後、Lysis Buffer で 5 回洗浄し、沈殿を 30 μ l の Sample Buffer で溶解、100°C で 5 分加熱したものをサンプルとして使用した。上記の Western Blot と同じ方法で、6%アクリルアミドゲルで泳動し、PVDF メンブレンに転写後、HRP-conjugate 抗 Flag 抗体 (Sigma Aldrich Japan, 東京) で Blotting を行い、上記と同様の方法で撮影した。

統計解析

In Vitroの実験に関しては、3回独立した実験を行った。qRT-PCRの結果について、統計学的有意差はunpaired t testを用いて評価した。

結果

AML1/ETO は PcG 複合体 (PRC1 および PRC2) と結合する

まず、HEK293T 細胞に HA-AML1/ETO および Flag-EZH2 の両者を強制発現し、免疫沈降法で蛋白質間結合について確認した。Figure 4 の一番左のレーンに示すように、抗 HA 抗体で免疫沈降した産物には Flag で標識した EZH2 が検出された。これより、EZH2 と AML1/ETO は結合することが示された。同様にして、AML1/ETO と SUZ12 が結合することが示された一方で EED は結合しなかった。しかしながら、EED は EZH2 と SUZ12 とともに PRC2 の構成要素であることから、直接的な結合ではなく PcG 複合体として間接的に結合している可能性が示唆される。

以上より PRC2 の主要な構成因子のうち、EZH2 と SUZ12 と AML1/ETO の結合が示唆された。さらに、PRC1 の構成因子である BMI1、RING1、RING2、HPH2 に関しても、同様の免疫沈降を行い、AML1/ETO との結合がそれぞれ示された。したがって、AML1/ETO は PRC2 および PRC1 の両方と結合すると考えられた。

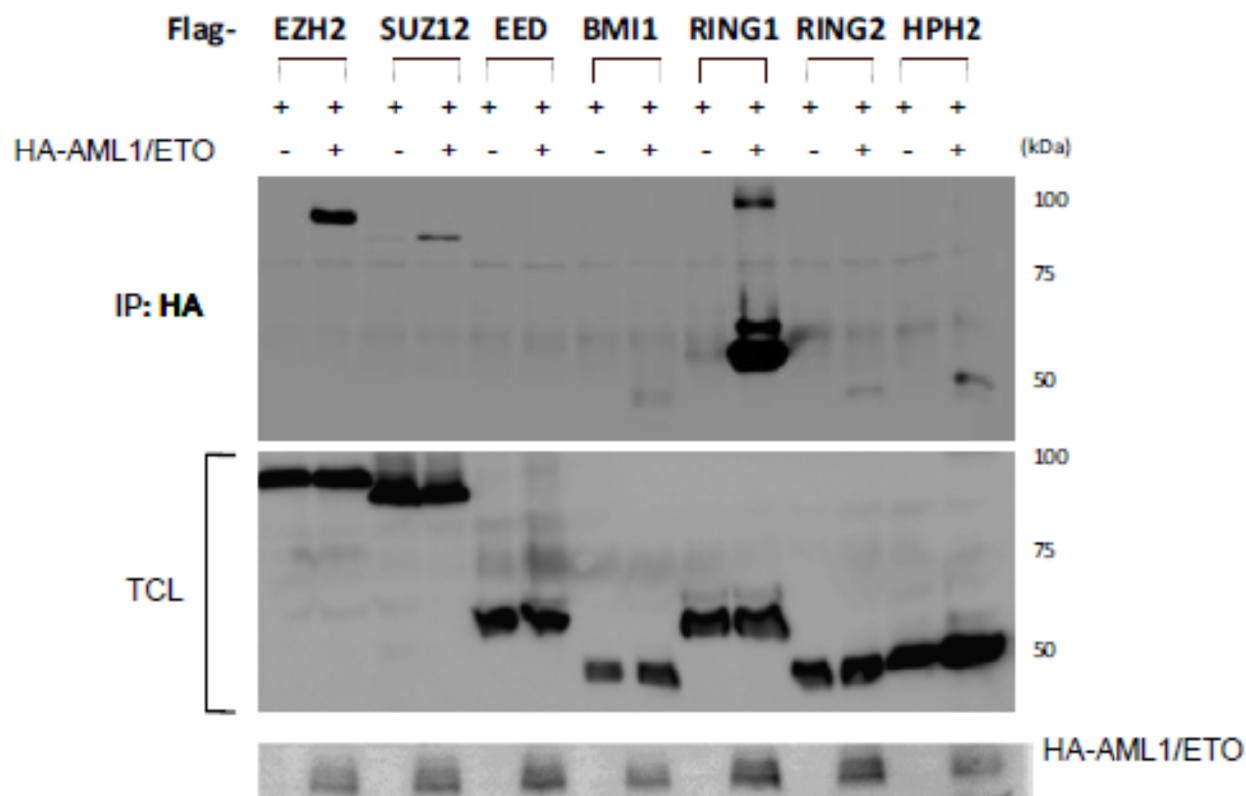


Figure 4 AML1/ETO と PRC 構成蛋白質との免疫沈降

HA-AML1/ETO と Flag tag を付加した PRC1 および PRC2 各構成要素を用いた免疫沈降法により、HEK293T 細胞において強制発現させた AML1/ETO は PRC2・PRC1 の各構成要素のうち、EED 以外の要素に結合することが示された。

AML1/Evi1 は PcG 複合体 (PRC1 および PRC2) と結合する

同様に、HEK293T 細胞に HA-AML1/Evi1 および Flag-EZH2 の両者を強制発現し、免疫沈降法で蛋白質間結合について検討した。Figure 5 に示すように、抗 T7 抗体で免疫沈降した産物には Flag で標識した EZH2 が検出された。これより、EZH2 と AML1/Evi1 は結合することが示唆された。以下、上述 AML1/ETO と同様に免疫沈降を行ったところ、AML1/Evi1 と SUZ12、EED が結合することが示された。以上より PRC 2 の主要な構成因子と AML1/Evi1 の結合することが示唆された。さらに、PRC1 の構成因子である BMI1、RING1、RING2、HPH2 に関しても、同様の免疫沈降を行い、AML1/Evi1 との結合がそれぞれ示唆された。したがって、AML1/Evi1 は PRC1 および PRC2 の両方と結合することが同定され、すなわち AML1/ETO および AML1/Evi1 はそれぞれ、PRC1 と PRC2 の両方に共に結合することが示された。

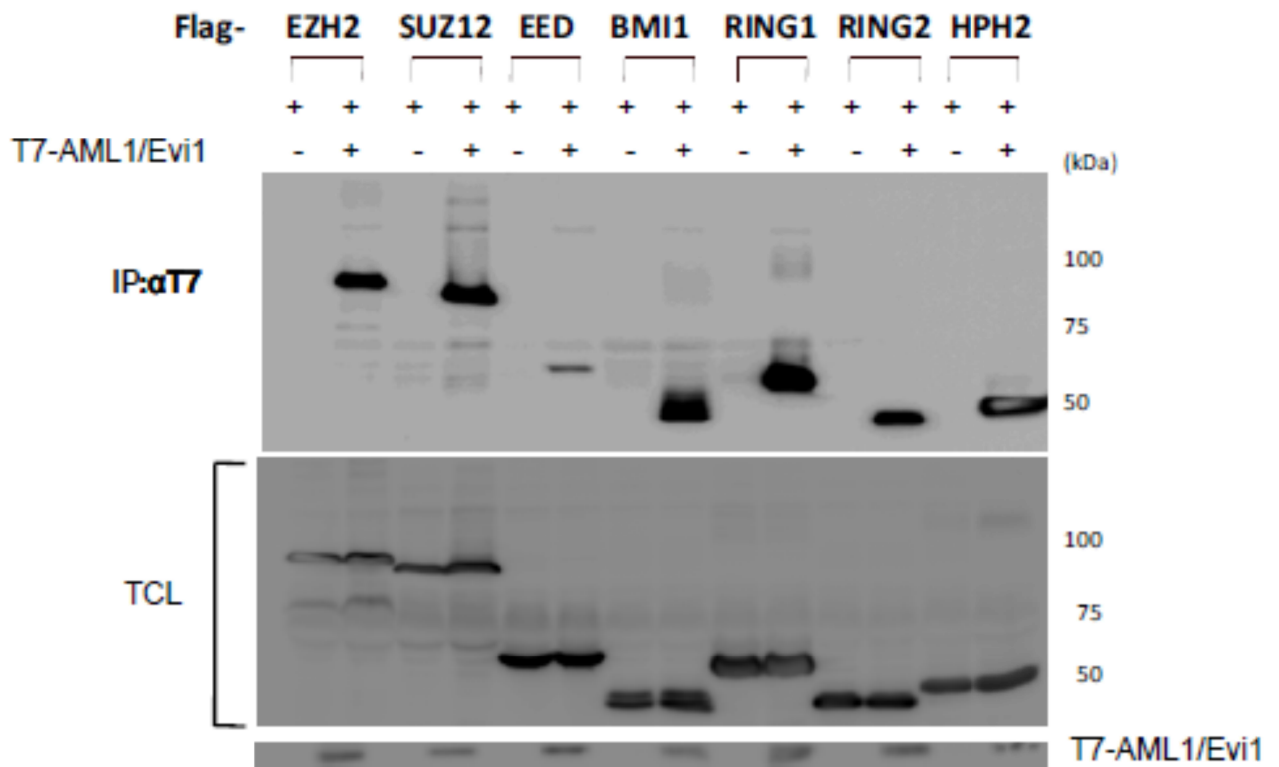


Figure 5 AML1/Evi1 と PRC 構成蛋白質との Western blotting

T7-AML1/Evi1 と T7 tag を付加した PRC1 および PRC2 各構成要素を用いた免疫沈降法により、HEK293T 細胞において強制発現させた AML1/Evi1 は PRC2 および PRC1 に結合することが示された。

不死化細胞 AML1/ETO において、EZH2 をノックダウンすることによって、PU.1、Mpo、 IEX1 の mRNA 発現が上昇する

マウス c-kit 陽性骨髄細胞にウイルス AML1/ETO を導入して半恒久的に継代できるようになった不死化細胞において EZH2 の発現をノックダウンすることにより、EZH2 によって抑制されていると考えられる標的遺伝子を探索した。EZH2 に対する short hairpin RNA を用いて EZH2 をノックダウンしたところ、コントロールと比較して、有意にその発現が低下することを確認した (Figure 6)。この条件下で各候補遺伝子群での mRNA の発現を調べた。候補となる標的遺伝子は、先行研究によって AML1 の標的として報告されている PU.1 (27)、CD41 (28)、p19Arf (29)、Mpo (30)、ELANE (31)、LAT2 (32)、AI1467606 (33)、IL-3 (34)、IEx1 (35)、OGG1 (36)、POLE (37)の合計 11 個の遺伝子を選択した。まず、AML1/ETO 不死化細胞において、使用した shEZH2 を transduction させることによって、EZH2 の mRNA 発現が有意差をもって低下していることを確認した(Figure 3 左レーン)。

その後、候補となる標的遺伝子の発現を確認したところ、AML1/ETO 不死化細胞では、PU.1、Mpo、IEX1 の 3 つの遺伝子において、shEZH2 を導入した群はコントロールと比較して、有意にその発現上昇が認められた。この結果から AML1/ETO に結合する EZH2、ひいては PRC2 が PU.1、Mpo、IEX1 の 3 つの遺伝子の発現を抑制していることを示唆すると考える。

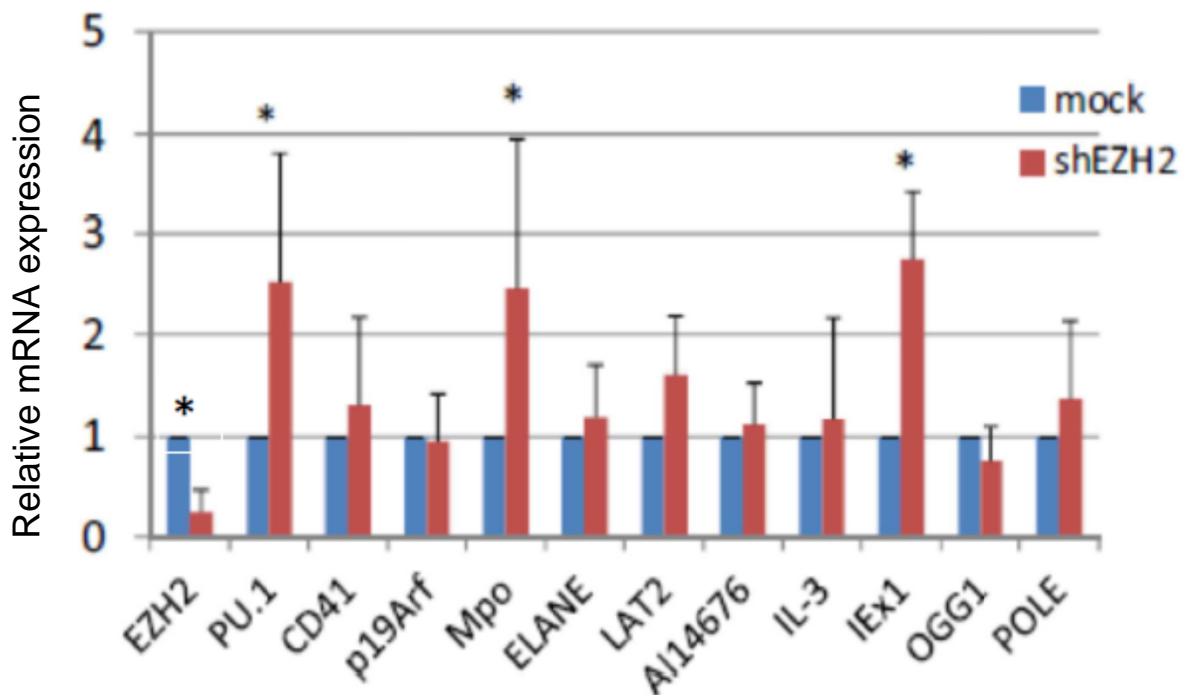


Figure 6 AML1/ETO を導入したマウス不死化細胞において EZH2 をノックダウンした際の各候補遺伝子での mRNA の発現変化 (n=3、*p < 0.05)

AML1/ETO を発現した不死化細胞において、shRNA による EZH2 ノックダウンを行い、qRT-PCR による mRNA 発現を調べたところ、既知の AML1 標的遺伝子のうち、PU.1、Mpo、IEX1 の有意な発現の上昇を認めた。

不死化細胞 AML1/Evi1 において、EZH2 をノックダウンすることによって、IEX1 の mRNA 発現が上昇する

本研究室にて樹立され、継代された不死化細胞 AML1/Evi1 (22) に対しても同様に AML1 標的遺伝子の発現変化を検討した。まず、AML1/Evi1 不死化細胞において、使用した shEZH2 を transduction させることによって、EZH2 の mRNA 発現が有意差をもって低下しているこ

とを確認した(Figure 7 左レーン)。

その後、候補となる標的遺伝子の発現を確認したところ、CD41、Mpo、IEX1 の3つの遺伝子において、shEZH2 を感染させた群はコントロールと比較して、有意差をもって発現の上昇が認められた。

この結果から AML1/Evi1 に結合する EZH2、ひいては PRC2 が造血に必要な正常遺伝子である CD41、Mpo、IEX1 の3つの遺伝子の発現を抑制していることを示唆している。

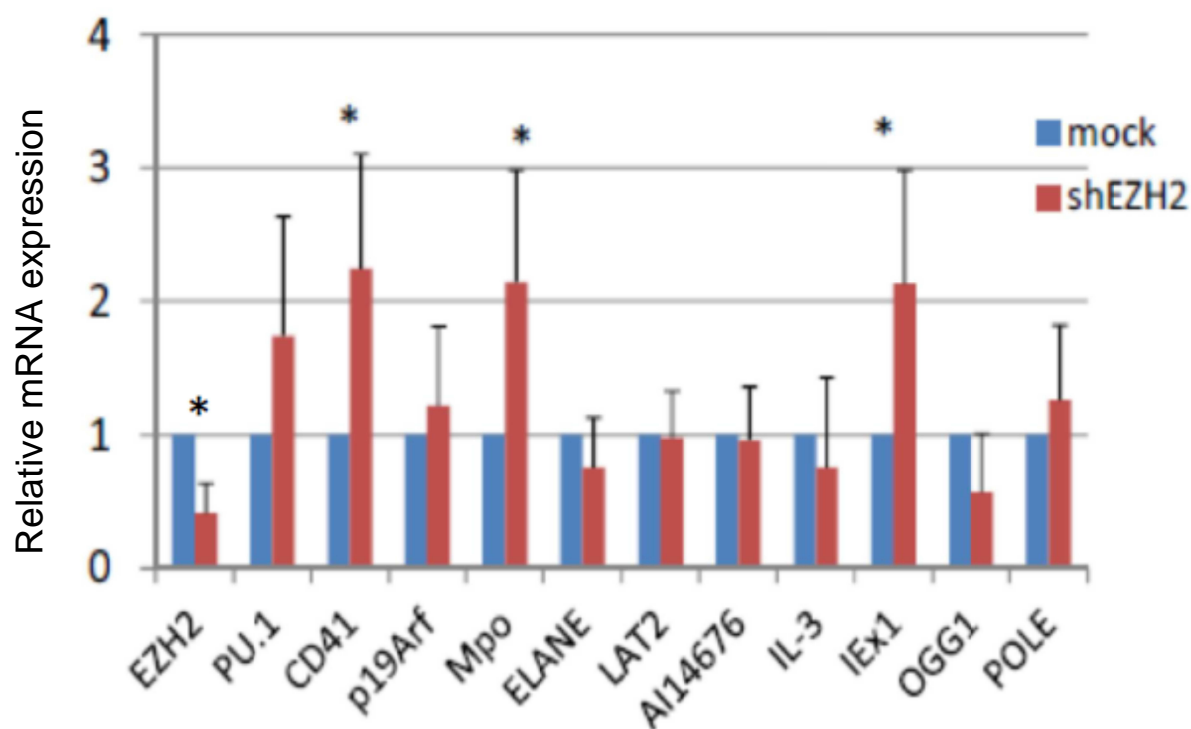


Figure 7 AML1/Evi1 を導入したマウス不死化細胞において EZH2 をノックダウンした際の各候補遺伝子での mRNA の発現変化 (n=3、*p < 0.05)

AML1/Evi1 を発現した不死化細胞において、shRNA による EZH2 ノックダウンを行い、qRT-PCR による mRNA 発現を調べたところ、既知の AML1 標的遺伝子のうち、CD41、Mpo、IEX1 の有意な発現の上昇を認めた。

不死化細胞 MLL/AF9 において、EZH2 をノックダウンしても標的候補遺伝子の発現は上昇を認めなかった

MLL/AF9 は、t(9;11)により構成される MLL 関連キメラ蛋白質であり、11 番染色体長腕 (11q23) に座位する MLL 遺伝子を切断点とする相互転座は AML や急性リンパ性白血病 (ALL)、MDS などに認められる染色体異常で、相互転座の相手は多数報告されている。

MLL/AF9 に代表される MLL 関連キメラ蛋白質は、AML1 関連キメラ蛋白質と同様にヒストンメチル化に関与する一方で、AML1 を標的とする転座によって構成される AML1/ETO や AML1/Evi1 とは全く性質と構造を異にしている。そこで、AML1 関連キメラ蛋白質ではない MLL/AF9 を骨髄細胞に導入して得られる不死化細胞をコントロールとして用い、EZH2 の抑制によって AML1 標的遺伝子の発現が変化するのかを確認した。

マウスの骨髄細胞に MLL/AF9 を導入して継代させた後、不死化させた MLL/AF9 細胞において、まず shEZH2 を transduction させることによって、EZH2 の mRNA 発現が有意差をもって低下していることを確認した(Figure 8 左レーン)が、AML1 標的遺伝子のうち有意に発現が変化するのは認められなかった (Figure 8)。このことから、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 不死化細胞における上記の発現変化は EZH2 によるユニバーサルな作用ではなく、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 存在下に特異的にみられる現象であることが示唆された。

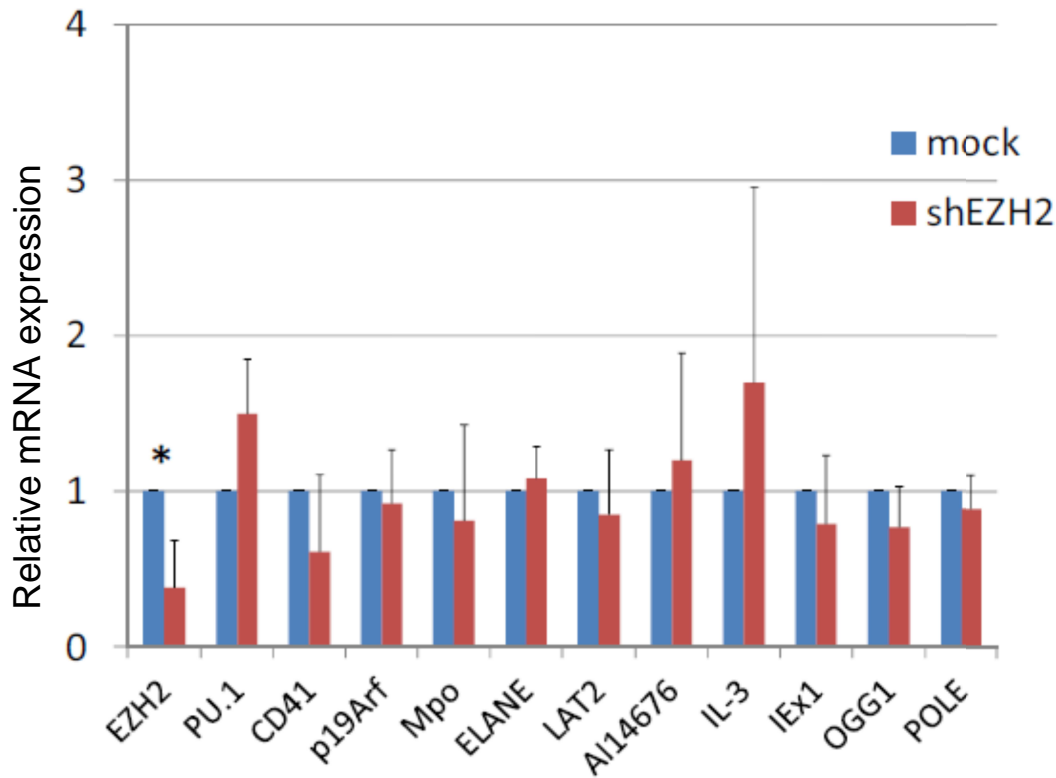


Figure 8 MLL/AF9 を導入したマウス不死化細胞において EZH2 をノックダウンした際の各候補遺伝子での mRNA の発現変化 (n=3、*p<0.05)

MLL/AF9 を導入して作製した不死化細胞において、shRNA による EZH2 ノックダウンを行い、qRT-PCR による mRNA 発現を調べたところ、既知の AML1 標的遺伝子の mRNA 発現の有意な上昇は認められなかった。

マウス正常骨髄細胞における AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 強制発現と EZH2 ノックダウンによる短期遺伝子発現変化の検討

マウス c-kit 陽性骨髄細胞に AML1/ETO、AML1/Evi1 を transduction させ、それぞれ強制発現させた後に pSIREN RetroQ に組み込んだ shRNA を感染させ、puromycin を含む培地で選択し実験に用いた。その結果、Figure 9 に示すように、AML1/ETO 導入細胞では PU.1、

MPO、IEX1 の 3 つの遺伝子の発現が、AML1/Evi1 導入細胞では CD41、IEX1 の 2 つの遺伝子の発現が EZH2 の抑制によって有意に上昇した。

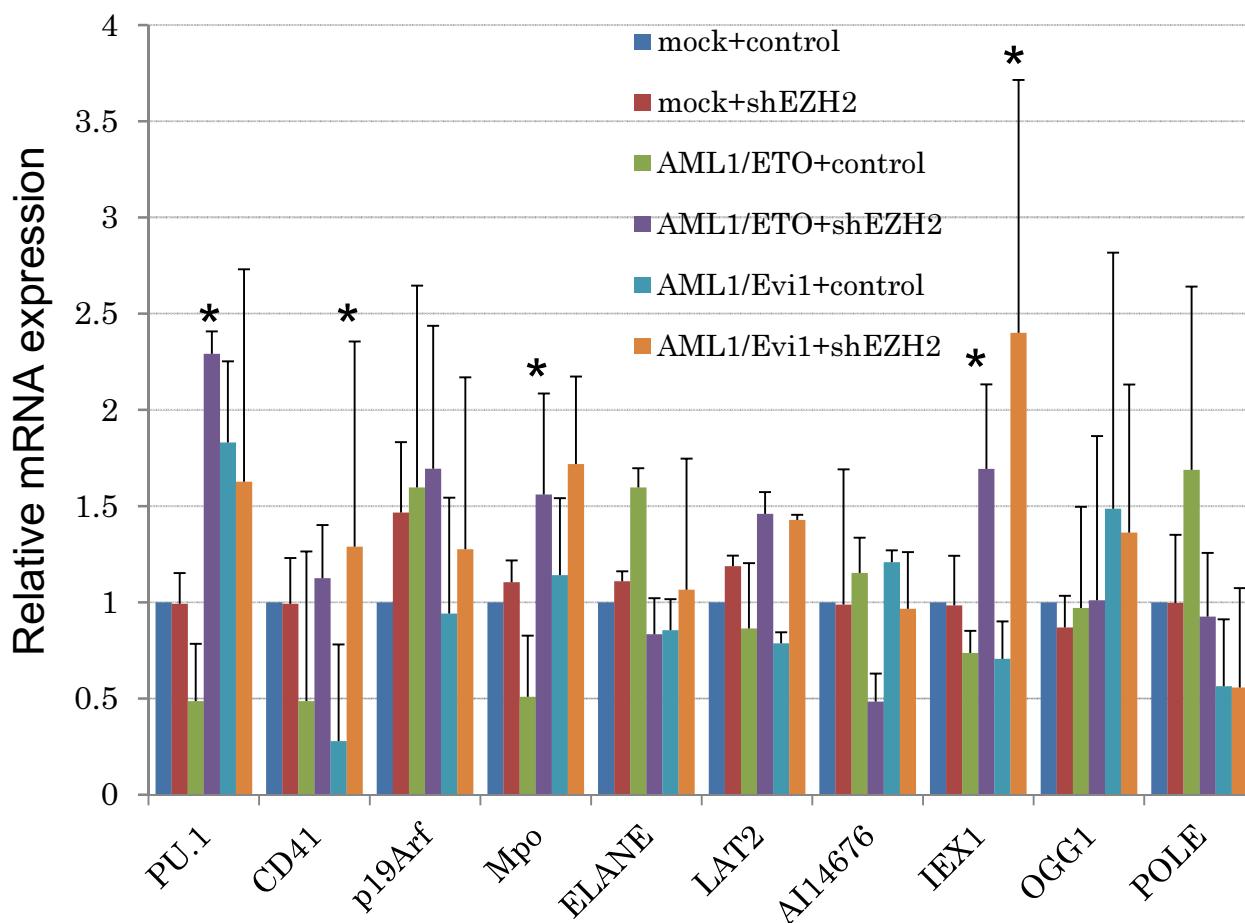


Figure 9 AML1/ETO および AML1/Evi1 強制発現細胞の EZH2 ノックダウン時の各候補遺伝子における発現変化 (n=3, *p<0.05)

マウス c-kit 陽性骨髄細胞に AML1/ETO および AML1/Evi1 を各々強制発現させ、shRNA による EZH2 ノックダウンを行い、qRT-PCR にて mRNA の発現を調べたところ、既知の AML1 標的遺伝子のうち、AML1/ETO では PU.1、Mpo、IEX1 が、AML1/Evi1 導入細胞においては CD41、IEX1 がスクランブル配列を感染させた control 群と比較して、mRNA の発現の有意な上昇を認めた。

AML1/ETO および AML1/Evi1 導入細胞における PcG 複合体の標的候補遺伝子

上述した不死化細胞および各キメラ蛋白質を強制発現させたマウス骨髄細胞 RT-qPCR の結果をまとめると Table 1 のようになる。この結果から分かるように、AML1/ETO 導入細胞においては PU.1、MPO、IEX1 が、AML1/Evi1 導入細胞においては CD41、IEX1 が PcG 複合体からのサイレンシングを受ける標的遺伝子の候補として挙げられたため、次に、これらの候補遺伝子のルシフェラーゼアッセイを行うことにより、それらの転写活性の変化を確かめることとした。

		PU.1	CD41	p19 Arf	Mpo	ELANE	LAT2	AI 14676	IL-3	IEX1	OGG1	POLE
不死化細胞	AML1/ ETO	↑	→	→	↑	→	→	→	→	↑	→	→
	AML1/ Evi1	→	↑	→	↑	→	→	→	→	↑	→	→
強制発現細胞	AML1/ ETO	↑	→	→	↑	→	→	→	→	↑	→	→
	AML1/ Evi1	→	↑	→	→	→	→	→	→	↑	→	→

Table 1 AML1/ETO および AML1/Evi1 導入細胞における候補標的遺伝子のまとめ

AML1/ETO および AML1/Evi1 の不死化細胞および強制発現細胞を shEZH2 でノックダウンを行った結果、既知の AML1 標的遺伝子のうち、不死化細胞と強制発現細胞の両方に、qRT-PCR にて mRNA の発現の上昇が認められたのは、AML1/ETO では、PU.1、Mpo、IEX1 であり、AML1/Evi1 では、CD41、IEX1 であった。

AML1/ETO 発現細胞においては IEX1 の転写が EZH2 により制御される

AML1/ETO 導入細胞においては PU.1、Mpo、IEX1 が上記の検討より AML1/ETO および EZH2 の協調による標的遺伝子と考えられたため、これらの 3 遺伝子のプロモーター領域で Runt ドメインの認識配列 (PEBP2 サイト) を含む領域をルシフェラーゼ用プラスミド pGL4.10 にクローニングしてレポーターアッセイを行った。その結果、候補遺伝子のうち IEX1 のみが EZH2 と AML1/ETO の共発現により相乗的に転写活性が有意に抑制され、dominant negative EZH2 を発現させることによって、転写活性が回復した (Figure 10)。さらに、mutagenesis によって AML1 結合部位である PEBP2 site にランダムな変異を挿入して作成した mutant ベクターで同様の実験を行っても、このような転写活性の挙動は認められなかった。一方で、RT-qPCR の結果から抽出されたその他の候補標的遺伝子である PU.1、Mpo に関しては、EZH2 および dominant negative EZH2 による有意な転写活性の変化はみられなかった (Figure 12、Figure 13)。

上記の結果から、AML1/ETO 発現細胞においては、Runt ドメイン依存性に IEX1 遺伝子プロモーターに AML1/ETO が結合し、EZH2 と協調して発現を抑制していることが示唆された。

AML1/Evi1 発現細胞においては IEX1 の転写が EZH2 により制御される

AML1/Evi1 発現細胞においても同様のレポーターアッセイを行った。その結果、AML1/ETO 発現細胞と同様に、候補遺伝子のうち IEX1 のみが EZH2 により転写制御され

ることが示唆された (Figure 11)。一方、CD41 に関しては同様の挙動はみられなかった (Figure 14)。

上記の結果から、AML1/Evi1 発現細胞においても、AML1/ETO と同様に Runt ドメイン依存性に IEX1 遺伝子プロモーターに AML1/Evi1 が結合し、EZH2 と協調して発現を抑制していることが示唆された。

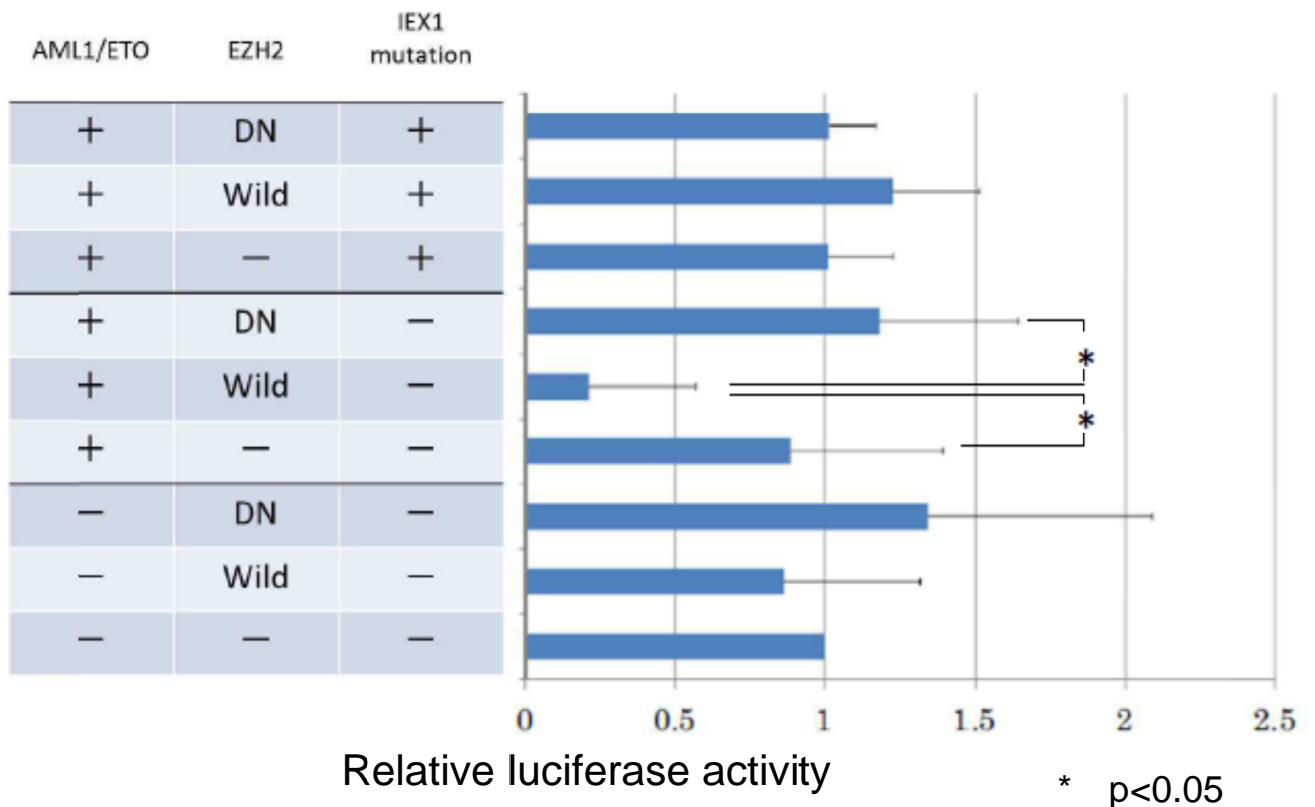


Figure 10 AML1/ETO 発現細胞の EZH2 および dominant negative EZH2 による IEX1 の転写活性の変化

HEK293T 細胞において、AML1/ETO および各 EZH2 プラスミド (EZH2、dominant negative EZH2、mock) をそれぞれ co-transfection し、HEK293T 細胞に mock を感染させた細胞を 1 として、各群のルシフェラーゼ活性相対値を算出したところ、EZH2 群は mock 群、dominant

negative EZH2 に各々有意差をもって、低値であった。またこの現象は mutation を挿入した IEX1 ルシフェラーゼベクターではみられなかった。これは EZH2 と AML1/ETO の共発現によって、相乗的に転写活性の抑制が起こり、dominant negative EZH2 を発現させることによって、転写活性が回復したことを示唆している。

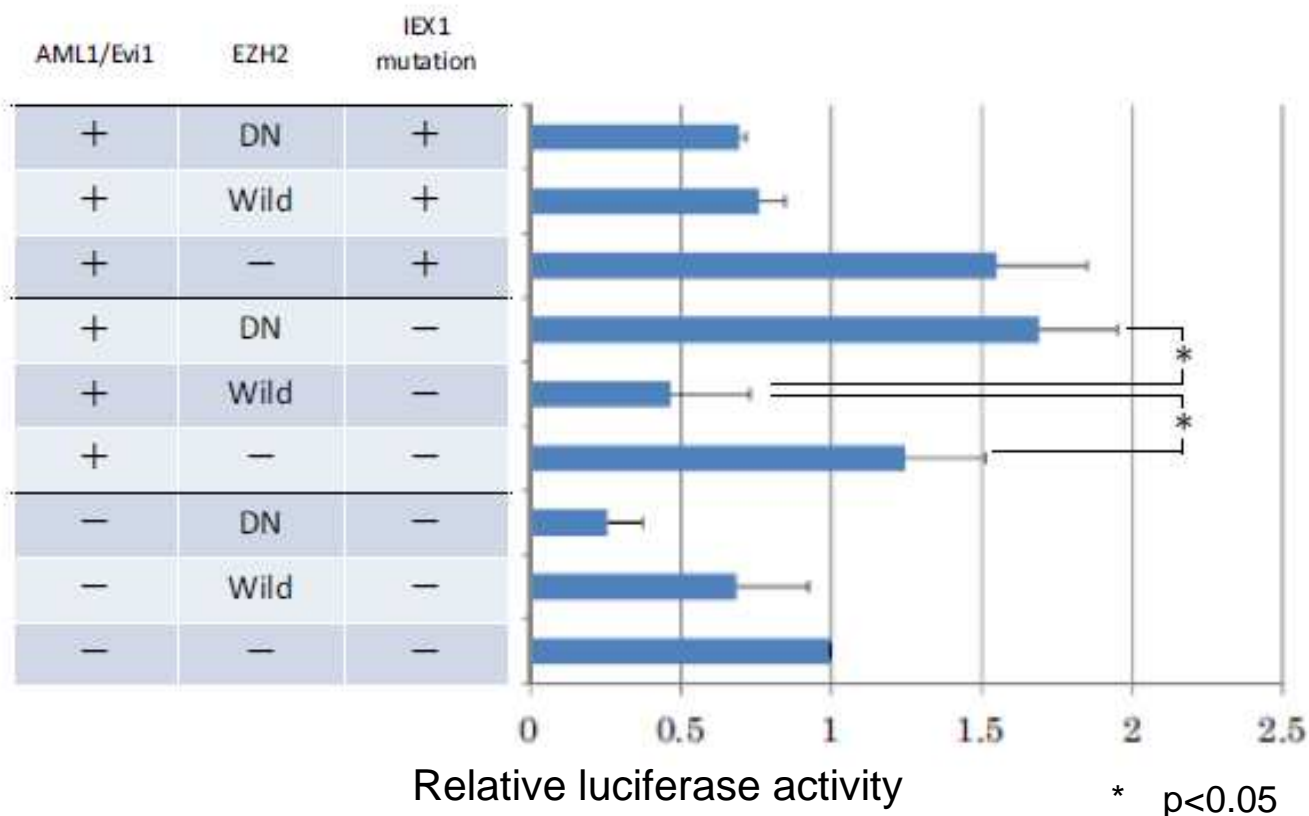


Figure 11 AML1/Evi1 発現細胞の EZH2 および dominant negative EZH2 による IEX1 の転写活性の変化

HEK293T 細胞において、AML1/Evi1 および各 EZH2 プラスミド (EZH2、dominant negative EZH2、mock) をそれぞれ co-transfection し、HEK293T 細胞に mock を感染させた細胞を 1 として、各群のルシフェラーゼ活性相対値を算出したところ、EZH2 群は mock 群、dominant

negative EZH2 に各々有意差をもって、低値であった。またこの現象は mutation を挿入した IEX1 ルシフェラーゼベクターではみられなかった。これは EZH2 と AML1/Evi1 の共発現によって、相乗的に転写活性の抑制が起こり、dominant negative EZH2 を発現させることによって、転写活性が回復したことを示唆している。

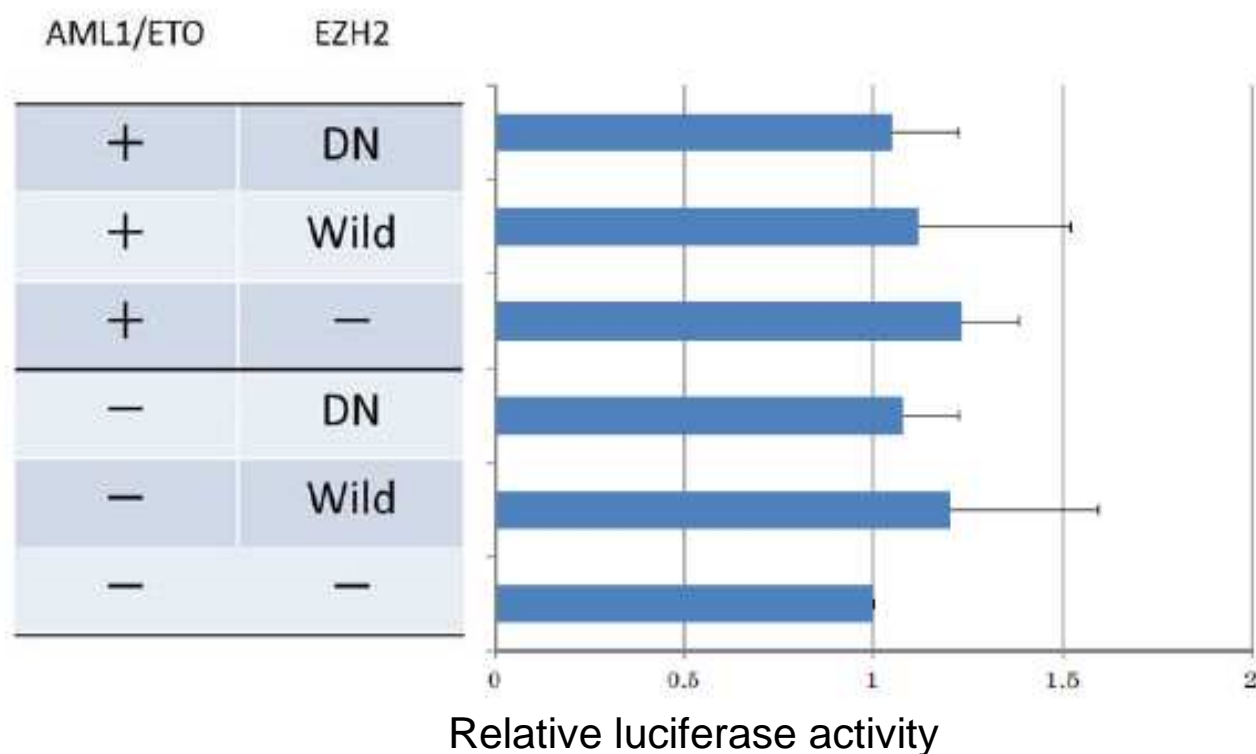


Figure 12 AML1/ETO 発現細胞の EZH2 および dominant negative EZH2 による PU.1 の転写活性の変化

HEK293T 細胞において、AML1/ETO および各 EZH2 プラスミド (EZH2、dominant negative EZH2、mock) をそれぞれ co-transfection しルシフェラーゼ活性を測定したところ、各群での PU.1 のルシフェラーゼ活性の有意な変化は認められなかった。

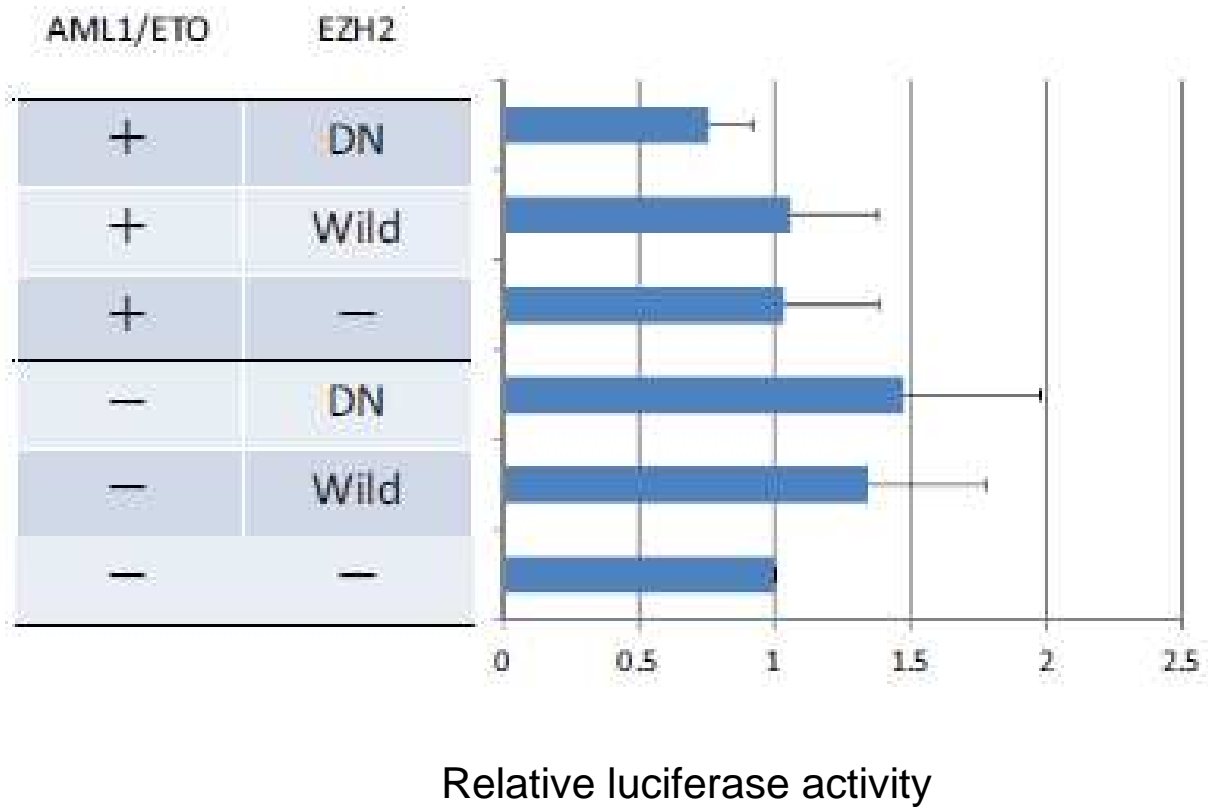


Figure 13 AML1/ETO 発現細胞 EZH2 および dominant negative EZH2 による Mpo の転写活性の変化

HEK293T 細胞において、AML1/ETO および各 EZH2 プラスミド (EZH2、dominant negative EZH2、mock) をそれぞれ co-transfection しルシフェラーゼ活性を測定したところ、各群での Mpo のルシフェラーゼ活性の有意な変化は認められなかった。

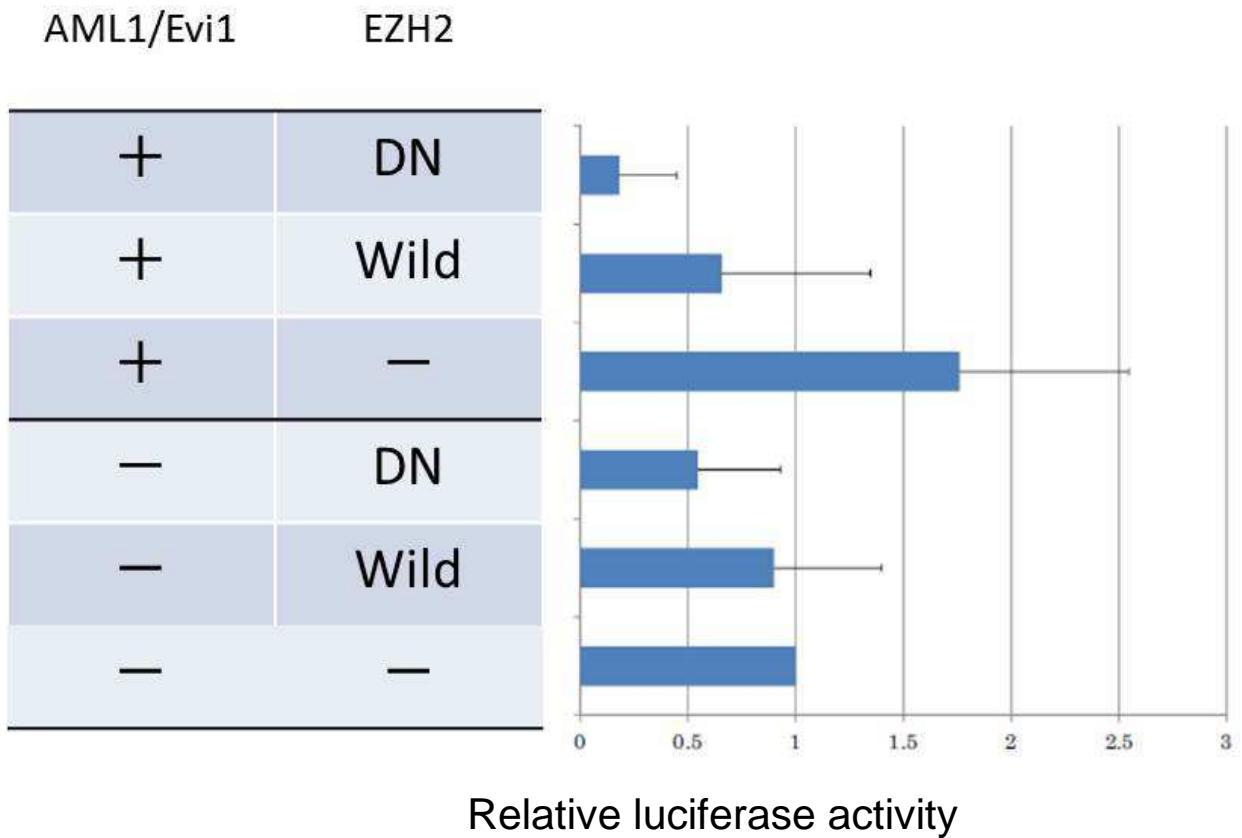


Figure 14 AML1/Evi1 発現細胞の EZH2 および dominant negative EZH2 による CD41 の転写活性

HEK293T 細胞において、AML1/Evi1 および各 EZH2 プラスミド (EZH2、dominant negative EZH2、mock) をそれぞれ co-transfection しルシフェラーゼ活性を測定したところ、各群での CD41 のルシフェラーゼ活性の有意な変化は認められなかった。

考察

今回私は、AML1/ETO および AML1/Evi1 と PcG 複合体との結合をもとに、これらのキメラ遺伝子が PcG 複合体と協調してエピジェネティックな制御を介して転写を制御する標的遺伝子の同定を試みた。その結果、AML1 の標的遺伝子として知られている 11 の候補遺伝子の中から IEX1 にその可能性があることを突き止めた。

この IEX1 (the immediate early gene X-1) は別名として、IER3 (immediate early response gene 3) とも呼ばれるストレス誘導遺伝子であり、放射線照射、成長因子、ウイルス感染、炎症性サイトカインなどにより発現が惹起され、細胞周期の進行およびアポトーシスの調節に関与する。IEX1 は TNF および Fas に代表される様々なアポトーシス誘発因子により誘導されるアポトーシスに対して NF- κ B シグナルを介して細胞抵抗性に重要な役割を果たすこと (35) やあるいくつかの細胞株において細胞周期進行を加速すること (38) が報告されている。ただし、その発現は癌種によって、様々な報告があり、固形癌では膵臓癌 (39) や乳癌(40)で高発現が認められている一方で、ハイリスクの直腸癌 (41)では低下が認められる。

血液腫瘍領域においても同様に、多発性骨髄腫ではその発現が上昇している (42) という報告がある一方で、初期の MDS において発現の低下が認められる (43-45) という報告も存在する。このように IEX1 は発癌との関連に対して、論議の分かれる遺伝子であるが、上記の私の検討では AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 はともに PcG と協調して IEX1 の発現を負に制御していることが示唆された。また、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 発現骨髄細胞においては IEX1 ががん抑制遺伝子として機能している可能性が考えられる。今後は造

血器における IEX1 の発現と造腫瘍性との関係について、主に細胞周期やアポトーシスへの影響をもって評価する必要があると考えられる。

今回、候補に選択した 11 の標的遺伝子に関しては、いずれも AML1、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 による直接の制御が知られている遺伝子である。これらの標的遺伝子の転写は、いずれも AML1 あるいはキメラ蛋白質がその Runt ドメインを介して PEBP2 サイトに結合して制御していると考えられる。しかし、それらの制御で EZH2 が関わる標的遺伝子は IEX1 のみであった。また、AML1 あるいはキメラ蛋白質による標的遺伝子制御には、PcG 複合体以外にも複数の結合タンパク質が関与する。CBF β は AML1 の DNA 結合領域に結合し、AML1 の安定化と DNA 結合能を強化する(46)。また、p300 と CBP はヒストンアセチル化を介して AML1 の標的遺伝子の発現を誘導する(47)。一方で、転写抑制因子である mSin3A も AML1 と結合し、AML1 の安定化と標的遺伝子の発現抑制に関与するが、MAP キナーゼの一つである ERK により AML1 がリン酸化されると、AML1 と mSin3A は解離する (48)。AML1/ETO は DNA 結合能を保持し、野生型 AML1 に対して dominant negative に働く。AML1/ETO は C 末端側の転写活性化ドメインなどを欠損し、代わりに ETO 部分が転写抑制因子である N-CoR、HDAC、mSin3A などと結合することにより、正常 AML1 が転写を活性化する遺伝子の発現を異常に抑制する (49)。AML1/ETO と PcG 複合体が結合することから、PcG 複合体は N-CoR、HDAC や mSin3A などとともに AML1/ETO による dominant negative な転写制御に関わる複合体を形成する可能性が考えられたが、複数の標的遺伝子が PcG 複合体により制御されるわけではなく、IEX1 のみはその関与を示した。したがって AML1/ETO による転写抑制機構には標的遺伝子ごとに

異なるエピジェネティック制御因子複合体が関わる可能性が示唆された。この観点から、AML1/ETO と PcG 複合体の協調によって制御される標的遺伝子は、N-CoR、HDAC や mSin3A などとは異なる context で制御される可能性が考えられる。同時に、既知の標的遺伝子以外にも AML1 やそのキメラ遺伝子と PcG 複合体により制御される標的遺伝子が存在する可能性がある。IEX1 の AML1 関連標的遺伝子の中での位置づけは不明であるが、AML1 関連造血器腫瘍の発症におけるその意義についてはさらに検討が必要である。

また、本研究において、取り扱った 11 の標的遺伝子は先行研究にて AML1 の標的となっていることが知られている遺伝子であり、その他にも未知の AML1 標的遺伝子が PcG の標的になっている可能性も十分に考えられる。

AML1 関連造血器腫瘍における治療標的としての PcG 複合体に意義について、現時点での結論は早急であるが、すでに腫瘍発症に関わることが示されている p19Arf (29) などの制御には関わらないことから、PcG 複合体の抑制による抗腫瘍効果が十分に得られない可能性がある。近年、PcG 複合体、あるいは EZH2 の働きを抑制する阻害剤が複数報告されており、いずれも造血器腫瘍に対する抗腫瘍効果が注目されているが、例えば AML でも subtype によって治療効果が異なるのは、subtype ごとに異なる標的遺伝子の転写制御に関わっていることが一つの理由として考えられる。AML1 関連造血器腫瘍における PcG 複合体の標的については上記のように解析が現時点では不十分であるが、IEX1 をはじめとする AML1 関連キメラ蛋白質と PcG 複合体の共通標的のうち、造腫瘍性に関わる鍵分子が存在すれば、PcG 複合体の AML1 関連造血器腫瘍における治療標的としての意義も深まる。

謝辞

実験全般に関してご指導いただいた、共同研究者の先生方に感謝いたします。

血液・腫瘍内科教授 黒川峰夫先生

血液・腫瘍内科特任助教 吉見昭秀先生

血液・腫瘍内科講師 荒井俊也先生

参考文献

1. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360(22): 2289-2301.
2. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145(6): 788-800.
3. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363(25): 2424-2433.
4. van Haafden G, Dalglish GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Cole J, Forbes S, Jia M, Jones D, Kok CY, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, Pleasance E, Shepherd

R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Collins VP, Ichimura K, Law S, Wong J, Yuen ST, Leung SY, Tonon G, DePinho RA, Tai YT, Anderson KC, Kahnoski RJ, Massie A, Khoo SK, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet* 2009; 41(5): 521-523.

5. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439(7078): 871-874.

6. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110(13): 4385-4395.

7. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; 111(3): 1534-1542.

8. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgeroth G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A, Chase AJ, Cross NC. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*

2009; 113(24): 6182-6192.

9. Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, Neuberg D, Kornblau SM, Issa JP, Gilliland DG, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Estey EH, Look AT. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 2009; 23(9): 1605-1613.

10. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boultonwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010; 42(8): 722-726.

11. Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, Sauntharajah Y, Guinta K, Keddache MA, Putnam P, Sekeres MA, Moliterno AR, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 2010; 24(10): 1799-1804.

12. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010; 42(8): 665-667.

13. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y,

- Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010; 42(2): 181-185.
14. Villa R, Pasini D, Gutierrez A, Morey L, Occhionorelli M, Viré E, Nomdedeu JF, Jenuwein T, Pelicci PG, Minucci S, Fuks F, Helin K, Di Croce L. Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 2007; 11(6): 513-525.
15. Boukarabila H, Saurin AJ, Batsché E, Mossadegh N, van Lohuizen M, Otte AP, Pradel J, Muchardt C, Sieweke M, Duprez E. The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation. *Genes Dev* 2009; 23(10): 1195-1206.
16. 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* 2011; 117(13): 3617-28.
17. Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11): 773-784.
18. Va rambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008; 322(5908): 1695-1699.

19. Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, Wu L, Li J, Hu M, Gong Y, Cheng H, Laxman B, Vellaichamy A, Shankar S, Li Y, Dhanasekaran SM, Morey R, Barrette T, Lonigro RJ, Tomlins SA, Varambally S, Qin ZS, Chinnaiyan AM. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 2010; 17(5): 443-454.
20. Kurokawa M, Ogawa S, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y, Witte ON, Hirai H. The AML1/Evi1 fusion protein in the t(3:21) translocation exhibits transdorming activity on Rat1 fibroblasts with dependence on the Evi-1 sequence. *Oncogene* 1995; 11(5): 833-840.
21. 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* 2011; 117(23): 6304-14.
22. Mitani L, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Misao O, Hirai H. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J* 1994; 13(3): 504-510.
23. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *nat med* 2004; 10(3): 299-304.
24. Nishimoto N, Arai S, Ichikawa M, Nakagawa M, Goyama S, Kumano K, Takahashi T, Kamikubo Y, Imai Y, Kurokawa M. Loss of AML1/Runx1 accelerates the development of

MLL-ENL leukemia through down-regulation of p19ARF. *blood* 2011; 118(9): 2541-2550.

25. Takeshita M, Ichikawa M, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M.

AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia* 2008; 22(6): 1241-1249.

26. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A,

Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439(7078): 871-874.

27. Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T,

Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD, Tenen DG. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature Genet* 2008; 40 (1): 51-60.

28. Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardnani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao

A, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Nimer SD. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 2008; 22(5): 640-653.

29. Linggi B, Müller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der

Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP, Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2002; 8(7): 743-750.

30. Balkhi MY, Christopheit M, Chen Y, Geletu M, Behre G. The t(3;21) fusion product, AML1/ETO-induced survivin expression inhibits transcriptional regulation of myeloid differentiation. *Exp Hematol* 2008; 36(11): 1449-1460.
31. Carlsson G, Fasth A, Berglöf E, Lagerstedt-Robinson K, Nordenskjöld M, Palmblad J, Henter JJ, Fadeel B. Incidence of severe congenital neutropenia in Sweden and risk of evolution to myelodysplastic syndrome/leukaemia. *Br J Haematol* 2012; 158(3): 363-369.
32. Duque-Afonso J, Solari L, Essig A, Berg T, Pahl HL, Lübbert M. Regulation of the adaptor molecule LAT2, an in vivo target gene of AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1), during myeloid differentiation. *Br J Haematol* 2011; 153(5): 612-622.
33. Ferreras C, Lancrin C, Lie-A-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G. Identification and characterization of a novel transcriptional target of RUNX1/AML1 at the onset of hematopoietic development. *Blood* 2011; 118(3): 594-597.
34. Barbetti V, Gozzini A, Rovida E, Morandi A, Spinelli E, Fossati G, Mascagni P, Lübbert M, Dello Sbarba P, Santini V. Selective anti-leukaemic activity of low-dose histone deacetylase inhibitor ITF2357 on AML1/ETO-positive cells. *Oncogene* 2008; 27(12): 1767-1778.
35. Hamelin V, Letourneux C, Romeo PH, Porteu F, Gaudry M. Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood* 2006; 107(8): 3106-3113.
36. Liddiard K, Hills R, Burnett AK, Darley RL, Tonks A. OGG1 is a novel prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2009; 29(13): 2005-2012.

37. Albertson TM, Ogawa M, Bugni JM, Hays LE, Chen Y, Wang Y, Treuting PM, Heddle JA, Goldsby RE, Preston BD. DNA polymerase epsilon and delta proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(40): 17101-17104.
38. Grobe O, Arlt A, Ungefroren H, Krupp G, Fölsch UR, Schmidt WE, Schäfer H. Functional disruption of IEX-1 expression by concatemeric hammerhead ribozymes alters growth properties of 293 cells. *FEBS Lett* 2001; 494(3): 196-200.
39. Hamidi T, Algül H, Cano CE, Sandi MJ, Molejon MI, Riemann M, Calvo EL, Lomberk G, Dagorn JC, Weih F, Urrutia R, Schmid RM, Iovanna JL. Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis. *Clin Invest* 2012; 122(6): 2092-2103.
40. Yang C, Trent S, Ionescu-Tiba V, Lan L, Shioda T, Sgroi D, Schmidt EV. Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11649-11658.
41. Nambiar PR, Nakanishi M, Gupta R, Cheung E, Firouzi A, Ma XJ, Flynn C, Dong M, Guda K, Levine J, Raja R, Achenie L, Rosenberg DW. Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res* 2004; 64(18): 6394-6401.
42. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AM, De Luisi A, Mattioli M, Ronchetti D, Morabito F, Guarini A, Petrucci MT, Dammacco F, Ribatti D, Neri A, Vacca A. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*

2009; 15(17): 5369-5378.

43. Prall WC, Czibere A, Grall F, Spentzos D, Steidl U, Giagounidis AA, Kuendgen A, Otu H, Rong A, Libermann TA, Germing U, Gattermann N, Haas R, Aivado M. Differential gene expression of bone marrow-derived CD34+ cells is associated with survival of patients suffering from myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2009; 89(2): 173-187.

44. Hofmann WK, de Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koefler HP. Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 2002; 100 (10): 3553-3560.

45. Steensma DP, Neiger JD, Porcher JC, Keats JJ, Bergsagel PL, Dennis TR, Knudson RA, Jenkins RB, Santana-Davila R, Kumar R, Ketterling RP. Rearrangements and amplification of IER3 (IEX-1) represent a novel and recurrent molecular abnormality in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 2009; 69 (19): 7518-7523.

46. Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel *Drosophila runt*-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* 1993; 194(1): 314-331.

47. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* 2006, 25(17), 3955-3965.

48. Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H. The Corepressor mSin3A Regulates Phosphorylation-Induced Activation, Intranuclear

Location, and Stability of AML1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(7):3967-3979.

49. Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW. ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors. *Mol Cell Biol* 1998; 18(12): 7176-7184.