

論文内容要旨

Maintenance of the functional integrity of
mouse hematopoiesis by EED and promotion of
leukemogenesis by EED haploinsufficiency

(ポリコーム複合体の構成因子EEDは造血幹細胞の機能維持に必須
であり、EEDハプロ不全は白血病感受性を亢進させる)

Scientific Reports,6:29454,2016.

主指導教員：本田 浩章教授

(原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析)

副指導教員：稲葉 俊哉教授

(原爆放射線医科学研究所 がん分子病態)

副指導教員：松原 昭郎教授

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

池田 健一郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

近年、多くの悪性腫瘍において染色体の転座、遺伝子の欠損、遺伝子数のコピー異常などのゲノム異常と同様に、DNAメチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな過程の重要性が認識されている。ポリコーム複合体 PRC2 はヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) のメチル化を触媒し転写抑制に寄与するヒストンメチル化複合体である。その各構成因子の体細胞変異や過剰発現が造血器腫瘍を含む多くの腫瘍で報告されているが、共通した発癌機構は现阶段では明らかにされていない。我々の研究室では、骨髄異形成症候群およびその関連疾患 (MDS/MPN) 症例において、PRC2 構成因子である EED の機能欠失型変異を同定した。EED の機能低下と造血器腫瘍発症との関連が強く疑われた。

本研究では後天的な EED の欠失が可能な *Eed* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、成体造血細胞の分化・増殖機構における EED の生物学的機能及び造血器腫瘍発症への意義について個体レベルでの解析を行った。この *Eed* cKO マウスの造血組織では EED タンパク発現の消失ならびにグローバルな H3K27 のトリメチル化レベルの低下が認められた。

Eed cKO マウスは早期に造血細胞の減少を伴い死亡した。*Eed* cKO マウスでは肉眼的および病理組織学的解析において造血組織 (骨髄・胸腺・脾臓) の萎縮・減少を認め、フローサイトメトリー (FCM) により骨髄細胞の中でも未熟な細胞集団である造血幹細胞の細胞数に著明な減少を認めた。以上の結果から、EED は H3K27 メチル化レベルを維持することにより造血幹細胞の維持に必須の役割を果たすことが強く示唆された。

FCM を用いてコントロールおよび *Eed* cKO マウス各々の造血幹細胞を選別し、この細胞を用いて競合的骨髄移植実験による造血幹細胞の骨髄再構築能の比較を行った。その結果、末梢血ならびに骨髄中の *Eed* cKO マウス由来の細胞のキメリズムの著明な低下が認められた。このことから EED は細胞自律的な機構により造血幹細胞活性を維持していることが明らかとなった。

造血幹細胞減少の原因を明らかにする目的でコントロールと *Eed* cKO マウス造血幹細胞の細胞周期状態を BrdU、Pyronin Y を使用して FCM にて比較した結果、造血幹細胞分画では細胞周期 S 期の細胞割合が増加する一方で、G0/G1 比は低下していた。また、マウスより単離した造血幹細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA-sequence を行い、コントロールと *Eed* cKO マウス造血幹細胞の遺伝子発現データを比較した。Gene Ontology などから作成された遺伝子群が、サンプルデータ中で有意に変動したかどうかを評価する GSEA 解析を用いたところ、*Eed* cKO マウス造血幹細胞では細胞接着関連遺伝子群が有意に濃縮されていた。以上より、EED 欠損状態では造血幹細胞と造血微小環境との接着能が亢進し、造血幹細胞の分化が妨げられ、その結果 *Eed* cKO マウスでは造血細胞が枯渇することが予想された。この仮説を確認する目的でコントロールおよび *Eed* cKO マウスの造血幹細胞をフィブロネクチンでコートした培養皿上で短時間培養し、その接着能を比較したところ EED 欠失造血幹細胞の接着能が有意に亢進していた。以上より細胞周期の異常と接着能の亢進が造血幹細胞減少の原因として考えられた。

また、ヒト悪性腫瘍における EED 変異が大部分ヘテロ変異であることから、片アレルのみ EED を後天的欠失可能な *Eed* コンディショナルヘテロ (cHet) マウスを作製し、腫瘍感受性に

ついてレトロウイルスを用いた *in vivo* mutagenesis により検討を行った。その結果、*Eed*cHet マウスではコントロールと比較して有意に白血病発症率の上昇、発症時期の短縮を認めた。また、ウイルス挿入部位解析の結果、*Eed* のヘテロ欠損と協調的に腫瘍発症に寄与する遺伝子として *Evi1* を同定した。また、*Evi1* を導入した造血幹細胞移植により *Eed*cHet マウスが早期に白血病発症することも確認した。

本研究では、*Eed* cKO マウスを作製することにより、後天性の EED 欠損が造血において細胞周期および接着異常による造血幹細胞の枯渇を誘導し、その結果マウスは汎血球減少を伴う造血不全により死亡することを明らかとした。また、EED をヘテロ欠損した造血幹細胞では白血病感受性の亢進を認めることも併せて示した。これらの結果は、EED が造血幹細胞維持に必須であり、EED のハプロ不全が白血病化に寄与していることを証明したものである。今後は、H3K27 メチル化修飾関連遺伝子の遺伝子改変マウスを用い、他の癌種における腫瘍発症との関連について検討を行って行く予定である。