

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	池田 健一郎
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency （ポリコ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 のハプロ不全は白血病感受性を亢進させる）			
論文審査担当者			
主査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	一戸 辰夫	
審査委員	教授	田代 聡	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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り、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。しかしながら、各構成因子に共通した発癌機構は现阶段では明らかにされていない。著者らの研究室では、骨髄異形成症候群およびその関連疾患症例において、PRC2 構成因子である EED の機能欠失型変異を同定した。この結果は EED の機能低下が造血器腫瘍発症に関与していることを示唆している。</p> <p>本研究では後天的な EED の欠失が可能な <i>Eed</i> 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 <i>Eed</i> 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 のメチル化レベルの低下が認められた。</p> <p><i>Eed</i> cKO マウスは早期に造血細胞の減少を伴い死亡した。<i>Eed</i> 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と考えられた。</p> <p>FCM を用いてコントロールおよび <i>Eed</i> 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 <i>Eed</i> 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。</p> <p>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 <i>Eed</i> 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</p>			

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。EED 欠失による遺伝子群の発現変化について GSEA (gene set enrichment analysis)を用いて解析したところ、*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と推定された。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をおこなった結果、コントロールと比較して *Eed* cHet 由来の造血細胞は高頻度に白血病を発症し、EED のヘテロ状態は 2 次的遺伝子異常と協調して白血病発症に寄与すると考えられた。

本論文は *Eed* cKO マウスを作製・解析することにより、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明らかとした。これらの結果は、臨床における発がん機構の解明やがん治療の新たな治療戦略となる可能性を示しており、腫瘍学領域の発展に資すること大である。よって審査委員会全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。