

論文内容要旨

Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to
develop acute lymphoblastic leukemia.

(キメラ遺伝子 E2A-PBX1 と協調して急性リンパ球
性白血病発症に関わる遺伝子の同定)

Cancer Science, 107 (7) :890-8, 2016.

主指導教員：一戸 辰夫 教授

(原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野)

副指導教員：稲葉 俊哉 教授

(原爆放射線医科学研究所 がん分子病態研究分野)

副指導教員：菅野 雅元 教授

(医歯薬保健学研究科 免疫学)

世良 康如

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍においては、染色体の転座や逆位などの染色体異常を高頻度に認める。特に、疾患特異的な染色体異常を認める場合には、その結果生じた遺伝子異常である融合遺伝子形成や特定の遺伝子の過剰発現が疾患発症の病態生理に深く関わっていると考えられる。

E2A は 19 番染色体上に位置する B 細胞特異的な転写因子であり、B 細胞の運命決定に中心的な役割を果たす(Murre et al., *Adv Exp Med Biol*, 2007)。B 細胞性の急性リンパ球性白血病 (B-lineage acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)において、特徴的な 19 番染色体転座、 $t(1;19)(q23;p13)$ と $t(17;19)(q22;p13)$ が見出されており、それに伴う融合遺伝子として E2A-PBX1(Hunger et al., *Blood* 1991)と E2A-HLF(Inaba et al., *Science* 1992)がそれぞれ同定されている。E2A-PBX1 は、E2A の N 末端にある transactivation domain と PBX1 の C 末端にある homeodomain が融合した構造を有しており、E2A の発現制御のもとでこのキメラ蛋白質が発現することが疾患の本体と考えられる(Kamps et al., *Genes Dev* 1991)。E2A-PBX1 による B-ALL 発症過程の検証は、これまでに、骨髄移植やトランスジェニック (Tg)マウスなどのいくつかの動物モデルで試みられてきた。しかし、その多くは、骨髄球性白血病や T リンパ球性白血病など B-ALL 以外の白血病を発症するもので(Kamps et al., *Genes Dev* 1991; Dederer et al., *Cell* 1993)、E2A-PBX1 による B-ALL 発症機構は依然として不明な点が多かった。そこで我々は、この問題を解決し、より正確に $t(1;19)(q23;p13)$ を有する B-ALL を模倣した動物モデルの樹立を試みた。この目的のため、我々は内在性の E2A の発現制御のもと後天的に誘導可能に E2A-PBX1 を発現するコンディショナルノックイン(cKI)マウスを作製し、造血器腫瘍発症に関する解析を行った。E2A-PBX1 の発現を誘導した cKI マウスでは、約 1 年間の継時観察の過程で明らかな造血器腫瘍の発症は認められなかった。この結果は、後天性の E2A-PBX1 発現のみでは白血病発症には不十分であり、付加的な遺伝子変異が必要である可能性を強く示唆している。この可能性を検証する目的で、E2A-PBX1 cKI マウスに白血病ウイルス MOL4070A を用いて 2 次的な遺伝子挿入変異の導入を試みた(Nakamura et al., *Cancer Sci*, 2005)。MOL4070A はマウス体内で増幅とゲノム挿入を繰り返すウイルスであり、ウイルスが E2A-PBX1 と協調的に白血病発症に機能する遺伝子近傍に挿入された場合、当該遺伝子の発現増強を介して個体レベルで白血病発症を誘導すると考えられている(Nakamura et al., *Cancer Sci*, 2005)。MOL4070A 感染によって、E2A-PBX1 cKI マウスはコントロールマウスに比較してはるかに高い頻度で T 細胞、B 細胞または両細胞性の ALL を発症した。この結果はから、E2A-PBX1 は 2 次的な遺伝子異常と協調して白血病を発症することを示している。さらに我々は、ALL 発症において E2A-PBX1 と協調的に機能する遺伝子を同定する目的で、E2A-PBX1 cKI マウスの腫瘍組織における MOL4070A 挿入部位について、inverse PCR 法を用いて検索を行なった(Nakamura et al., *Cancer Sci* 2005)。その結果、MOL4070A が近傍に挿入された遺伝子のうち、複数の腫瘍組織間で共通する遺伝子を 8 個単離した。これらの遺伝子の発現変化について qPCR による解析を行い、ウイルス挿入により発現増強が認められた遺伝子として、Gfi1 と Mycn、Pim1 の 3 個を同定した。またヒト $t(1;19)(q23;p13)$ と同じ B-ALL を発症した E2A-PBX1 cKI

マウス 1 例において、ウイルス挿入部位として **Zfp521** を同定し、当該腫瘍組織において、**Zfp521** の高発現を確認した。**Zfp521** は造血幹～前駆細胞で高発現している転写因子であり、B 細胞の初期分化で重要な役割を果たす **EBF1** の機能を抑制することが報告されている (Mega et al., *Cell Cycle*, 2011)。従って、**Zfp521** の高発現は正常な B 細胞分化を障害し、結果として B-ALL 発症に関与すると考えられている。我々はこれまでの研究から、**Zfp521** の発現上昇が、B-ALL で認められる別の E2A 融合遺伝子である **E2A-HLF** と協調的に機能して B-ALL 発症に関わることを報告した (Yamasaki et al., *Oncogene*, 2010)。この結果から、**E2A-PBX1** においても **Zfp521** の発現上昇は協調的に機能して、B-ALL を発症すると想定された。この可能性を検証する目的で、我々は **E2A-PBX1 cKI** マウスとリンパ球特異的に **Zfp521** を高発現する **Zfp521 Tg** マウス (Yamasaki et al., *Oncogene*, 2010) を交配し、観察を行なった。その結果、**E2A-PBX1 cKI/Zfp521 Tg** マウスは全例で B-ALL を発症し、**Zfp521** 高発現は **E2A-PBX1** と協調して B-ALL 発症に寄与することが明らかとなった。最後に、ヒト B-ALL 発症において、**Zfp521** のヒトホモログである **ZNF521** の関与を検討する目的で、ヒト B-ALL 腫瘍株における **ZNF521** の発現を検討した。その結果、**t(1;19)** もしくは **t(17;19)** 陽性ヒト B-ALL 細胞株は、**t(1;19)** と **t(17;19)** 陰性ヒト B-ALL 細胞株に比較して平均発現レベルが上昇しており、10 倍以上の高い発現レベルを示す細胞株も複数見出された。

本研究の結果により、**E2A-PBX1** の後天的発現は複数の転写因子の発現上昇と協調して白血病発症に至ること、特に **Zfp521/ZNF521** の発現上昇は白血病細胞に系統特異性を付加し B-ALL 発症に重要な働きをすることが示された。今後は **t(1;19)** と **t(17;19)** 臨床検体における **ZNF521** の発現上昇の分子機構を解析し、**E2A-PBX1** と **E2A-HLF** がどのような機序で **ZNF521** と協調して B-ALL を発症するかについて解明を行い、それらの知見をもとに E2A 転座型白血病に対する新規治療法の確立へと研究を展開していく予定である。