

別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

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	世良 康如
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授 小林 正夫	印	
審査委員	教授 田代 聡		
審査委員	准教授 藤井 輝久		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。B 細胞性急性リンパ性白血病(B-ALL)に特徴的な 19 番染色体転座として 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 <i>E2A-PBX1</i> と <i>E2A-HLF</i> がそれぞれ同定されている。E2A-PBX1 キメラ蛋白質は、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白血病の発症にかかわると考えられる。しかし、これまでに、骨髄移植やトランスジェニック(Tg)マウスなどによるいくつかの E2A-PBX1 発現モデルでは、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 경우가多く、E2A-PBX1 による B-ALL 発症機構は現在まで不明の点が多い。</p> <p>そこで本研究では、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を樹立するため、内在性の E2A の発現制御のもと後天的に 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 年間の観察期間中、明らかな造血器腫瘍の発症が認められなかった。この結果から、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が示唆されたため、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。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。さらに 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ことを目的とし、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。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が 8 個単離され、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、<i>Gfi1</i> と <i>Myen</i>、<i>Pim1</i> の 3 個を同定した。また 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 <i>Zfp521</i> を同定し、当該腫瘍組織において、<i>Zfp521</i> mRNA の高発現を確認した。<i>Zfp521</i> 蛋白質は造血幹細胞～前駆細胞で高発現している転写因子であり、B 細胞の初期分化に重要な役割を果たす EBF1 の機能を抑制する。実際、<i>Zfp521</i> 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 <i>E2A-HLF</i> と協調的に機能して B-ALL 発症に関わることがすでに報告されており、<i>Zfp521</i> の発現上昇は E2A-PBX1 cKI においても正常な B 細胞分化を障害し、B-ALL の発症に関与す</p>			

ることが想定された。そこで、この可能性を検証するために、E2A-PBX1 cKI マウスとリンパ球特異的に *Zfp521* を高発現する *Zfp521* Tg マウスを交配し、観察を行なったところ、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* 遺伝子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* mRNA 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を発症させること、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)を有するヒト由来白血病細胞における *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が展開されていくことが期待される。したがって、審査委員会委員全員は、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。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	世良 康如
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 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)			
最終試験担当者			
主査	教授 小林 正夫	印	
審査委員	教授 田代 聡		
審査委員	准教授 藤井 輝久		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年8月7日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 E2A-PBX1 キメラ型転写因子の生成による DNA 結合能の変化			
2 胚細胞に E2A-PBX1 を導入した際に B 細胞系列以外の白血病が発症する生物学的機構			
3 Zfp521 あるいはヒトの相同遺伝子である ZNF521 の発現制御機構			
4 白血病細胞の所属系列を決定するための生細胞免疫染色結果の解釈			
5 ヒト E2A-PBX1 陽性細胞株における ZNF521 発現レベルの相違の意義			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			