

博士論文（要約）

論文題目 ヒト白血病遺伝子 *EVI1* の制御因子の探索

氏 名 木暮 泰寛

【序文】

EVII (*ecotropic viral integration site-1*) は造血細胞において重要な転写因子であり、特に造血幹細胞を維持する上で必須である。また、*EVII* は急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病あるいは骨髄異形成症候群などで高頻度に活性化されていることが知られている。*EVII* 高発現白血病は極めて予後不良であるが、*EVII* が発現亢進する機構は不明な点が多い。特に、染色体異常を有さず *EVII* 発現が亢進している白血病が存在することも知られており、このタイプの *EVII* 高発現機構を担うメカニズムを明らかにする必要があると考えた。

Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いると、任意位置でのゲノム改変が可能になる。そこでヒト腫瘍細胞株 HEL, HEC1B のゲノムを改変し *EVII*-eGFP レポーター細胞の樹立を行った。このレポーター細胞を用いて cDNA ライブラリーによるスクリーニングを行うことで、網羅的に *EVII* up-regulator を探索することができると考えた。

更に、*EVII* の転写調節は必ずしも転写因子によらず、エピゲノミックな制御である可能性を考慮した。その中でもヒストンのメチル化修飾に着目し、*EVII* 転写開始点付近で転写促進性のヒストンマークである Histone H3 Lysine 4 tri-methylation (H3K4me3)、 H3K36me3、H3K79me2 と抑制性のヒストンマークである H3K27me3 について探索した。

【主な材料と方法】

TALEN 発現ベクター及びドナーベクターの設計

TALEN 発現ベクターは ZiFiT Targeter で設計し、Joung Lab REAL Assembly TALEN kit を用いて REAL 法で制作した。OCT4-eGFP-2A-Puro ベクターを改変して *EVII*-eGFP-2A-Puro ドナーベクターを作成した。

TALEN によるゲノム改変

ゲノム改変の細胞株として、*EVII* が発現しているヒト白血病細胞株 HEL とヒト子宮体癌細胞株 HEC1B を用いた。HEL へのトランフェクションは NEPA21 electroporator を、HEC1B に対しては polyethylenimine をそれぞれ用いて行った。ゲノム改変細胞をクローン化した後、ゲノム改変が目的の箇所で起こっているか PCR 法で確認した。また、フローサイトメトリーやウェスタンブロットで GFP 発現を確認した。

cDNA ライブラリーの作成

ヒト白血病細胞株 KU812 から mRNA を抽出し、Universal RiboClone cDNA Synthesis System を用いて cDNA ライブラリーを作成した。cDNA を pMXs-Neo ベクターにクローニングした。

single cell sort を用いたライブラリースクリーニング

cDNA ライブラリー発現アンフォトロピックウイルス粒子を Plat-A パッケージング細胞を用いて作成し、ゲノム改変にて作成したレポーター細胞に感染させた。感染成立細胞のうち、GFP シグナル上位 3 パーセントイル集団に属する細胞を FACS AriaII を用いて single cell sort し、増殖させた。各細胞のゲノムに挿入された cDNA 断片をサンガーシークエンスし、nucleotide BLAST によって解析した。

shRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験

ライブラリースクリーニングで得られた候補遺伝子それぞれに対する shRNA を pRSI12-U6-sh-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro レンチウイルスベクターを用いて HEC1B に導入した。候補遺伝子と *EVII* の発現量変化を RT-qPCR で確認した。

EVII プロモーター領域のヒストンメチル化修飾の解析

EVII 発現白血病細胞株である KU812、HEL 及び *EVII* 低発現白血病細胞株の HL60 に対し、H3K27me3、H3K4me3、H3K36me3、H3K79me2 に対する各抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を施行した。*EVII* の転写開始点上流 5 kb 程度の領域内に設定したプライマーを用いて qPCR を行った。

【結果】

HEL のゲノム改変

EVII 終止コドンターゲットにした TALEN 及び *EVII*-2A-eGFP-PGK-Puro ドナーベクターを作成し HEL のゲノム改変を行うと、フローサイトメトリーで GFP シグナルの陽性分画が出現した。この分画の細胞を単離してゲノムを解析すると、ゲノムの目的の位置にドナーベクター由来の配列が挿入されていた。また、この細胞では GFP がタンパクレベルで発現していた。また、すでに *EVII* を up-regulate することが知られている *MLL* 融合遺伝子をこのゲノム改変 HEL に導入すると、細胞の GFP シグナルが増強され、レポーター細胞として有用であることが分かった。

cDNA ウイルスライブラリーの作成

白血病細胞株 KU812 は 3q26 異常を有さず *EVII* を比較的高発現しており、このような細胞では *EVII* up-regulator の mRNA を多量に含むと想定された。そこで、KU812 より cDNA を抽出し、pMXs-NEO ウイルスベクターにクローニングした。ウイルスベクターライブラリーを大腸菌で増幅すると同時に、ライブラリーの integrity や insert 長をコロニー PCR によって評価した。

ゲノム改変 HEL を用いたライブラリースクリーニング

作成したゲノム改変 HEL にウイルスライブラリーを感染させた。GFP シグナル上位 3 パーセントイル分画を single cell sort し、挿入された cDNA ライブラリー由来の配列を解析したが、遺伝子に該当しないゲノム領域の小断片が主に得られ、有意な候補遺伝子は得られなかった。

HEC1B のゲノム改変とライブラリースクリーニング

スクリーニングのスループットを向上させるため、HEC1B をゲノム改変細胞として用いた。HEL と同様にしてゲノム改変 HEC1B を樹立した。この細胞ではタンパクレベルで GFP が発現しており、*EVII* 発現量と GFP シグナルが相関していた。また、*MLL* 融合遺伝子の導入で GFP シグナルが上昇した。

また、ゲノム改変 HEC1B を用い、HEL と同様の手順でウイルスライブラリーを感染させ GFP シグナル上位 3 パーセントイル分画に挿入された配列を解析したところ、*EVII* up-regulator 候補として 2 種類の転写因子の配列が検出された。

スクリーニング結果の確認

マイクロアレイの公開データを用い、腫瘍細胞株や急性骨髄性白血病症例におけるこれらの候補転写因子と *EVII* の発現量の相関関係をそれぞれ評価したが、相関関係を認めなかった。一方、白血病細胞株で RT-qPCR を行い、両遺伝子と *EVII* の発現量の相関関係を評価したところ、一方の転写因子と *EVII* の間に有意な相関を認めた。また、HEC1B にそれぞれの転写因子の shRNA を導入したところ、ともに *EVII* 発現量が低下した。

ヒストン修飾による *EVII* 転写調節の検討

EVII 転写開始点付近のヒストンメチルを評価するため、KU812、HEL 及び HL60 で ChIP-qPCR を施行した。3q26 異常を伴わない *EVII* 高発現株である KU812 では、*EVII* の転写調節領域において H3K4me3 や H3K27me3、H3K79me2 が特徴的に亢進していた。

【考察】

本研究では第一に、*EVII* 発現に相関して GFP シグナルを有する白血病細胞株を作成した。HEL と HEC1B のゲノム改変を行ったところ、これらの細胞において GFP は発現し、そのシグナルをフローサイトメトリーで検出することができ、改変に成功したと考えられた。ゲノム編集効率は数%程度であり、既報と比してほぼ妥当だった。また、GFP シグナルの強弱と *EVII* 発現量は相関し、スクリーニング系として適切であると考えられた。

KU812 を用いて cDNA 発現ウイルスライブラリーを作成した。このライブラリーは、integrity

は確保されていたが insert の平均長が約 0.7kbp と短かった。またゲノム DNA やミトコンドリア DNA 由来配列が混入していた。そのためライブラリーの品質向上によりスクリーニングの精度向上の余地があると考えられた。

この cDNA 発現ウイルスライブラリーと、作成したレポーター細胞株を用いてスクリーニングを施行したところ、ゲノム改変 HEC1B を用いた実験で 2 種類の候補転写因子を同定した。shRNA を用いてこれらの遺伝子をノックダウンすると *EVII* の発現量が低下した。したがって、スクリーニング結果は妥当であったと考えられた。今後、これらの遺伝子の強制発現等で *EVII* 発現との関連を詳細に検討する必要がある。

最後に、*EVII* 制御にエピゲノミックな修飾が関与している可能性を考慮し、白血病細胞株で *EVII* プロモーター領域のヒストンメチル化を ChIP-qPCR で分析した。KU812 では H3K4me4 の他に H3K27me3 と H3K79me2 が亢進していることが特徴的であった。このことから *EVII* プロモーター領域の bivalent な修飾を保持しつつも *EVII* 発現が亢進している可能性が考えられた。生理的なプロモーターによる *EVII* の転写活性化においてはこれらのヒストン修飾が重要な役割を担っている可能性が示唆された。