

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19463

研究課題名(和文)原がん遺伝子EVI1が白血病を惹起する条件

研究課題名(英文)Conditions for the proto-oncogene EVI1 to induce leukemia

研究代表者

鈴木 未来子(Suzuki, Mikiko)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80508309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3番染色体逆位アリルの制御下に発現するEVI1遺伝子を蛍光でモニターすることにより、EVI1遺伝子が造血幹・前駆細胞だけでなく巨核球系列の細胞にも発現し、巨核球への系列決定を促進していることを明らかにした。さらにEVI1遺伝子の発現に加え、3番染色体転座・逆位により起こるGATA2遺伝子の発現低下を再現すると、ヒト3番染色体転座・逆位を伴う白血病と類似した巨核球増多を伴う白血病の発症が促進した。このことから3番染色体逆位による白血病発症において、造血幹・前駆細胞から巨核球系列へのEVI1遺伝子の発現とGATA2遺伝子発現低下が寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3番染色体転座および逆位は、急性骨髄性白血病の約1-2%にみられる。3番染色体転座・逆位を伴う白血病に対する有効な治療法は確立されておらず、患者の予後は極めて不良である。本研究ではこの白血病発症モデルを樹立し、発症機構の一端を明らかにした。3番染色体転座および逆位を伴う白血病のモデルマウスとして、ヒト3番染色体転座・逆位を伴う白血病にみられる巨核球増多を再現できているのは、本モデルマウスのみであり、このマウスを用いた解析により、今後、さらに詳細な発症機構が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：By monitoring EVI1 gene expression under the control of inv(3) allele, we found that the EVI1 gene is expressed not only in hematopoietic stem and progenitor cells but also in megakaryocyte lineage, which promotes megakaryocyte-lineage skewing. In addition to EVI1 gene expression, the down-regulation of the GATA2 gene caused by inv(3) promoted the development of leukemia with megakaryocyte hyperplasia, similar to leukemia of human patients. These results indicate that these EVI1 and GATA2 misexpression contribute to the development of leukemia caused by chromosome 3 inversion.

研究分野：分子生物学

キーワード：白血病 染色体転座 染色体逆位 EVI1 MECOM GATA2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

3番染色体の転座および逆位は、急性骨髄性白血病の約1-2%にみられ、予後不良因子として知られている。この染色体転座および逆位によって、3q21領域に存在する *GATA2* 遺伝子のエンハンサーの一つである G2DHE (*GATA2* distal hematopoietic enhancer) が、本来の *GATA2* 遺伝子から離れ、3q26領域に存在する原がん遺伝子 *EVII* の近傍へと移動する。これにより、G2DHEを含む3q21領域の制御下に *EVII* 遺伝子が発現する。また、*GATA2* 遺伝子は自身のエンハンサーを失うため、発現が減少する。以前の解析から、3q21領域の制御下に *EVII* 遺伝子が発現することが白血病発症の最も大きな原因であることがわかっている。しかしながら、*EVII* 遺伝子は元々、造血幹細胞において発現している遺伝子であり、G2DHEの制御下に発現することが、なぜ白血病を発症させるのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Gata2* 遺伝子エンハンサーを含む3q21領域によって制御される *EVII* 遺伝子の発現様式を明らかにすること、および *EVII* 遺伝子の発現によっておこる血液細胞への異常を解析することで、白血病の発症機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

蛍光タンパク質を用いて、3番染色体逆位アレルの制御下にある *EVII* 遺伝子発現と内在性の *Gata2* 遺伝子の発現をモニターするマウスモデルを作製し、1細胞レベルで *EVII* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子の発現をモニターした。また、*EVII* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子の発現強度により骨髄細胞を分類し、それぞれの性質を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 3番染色体逆位アレル制御下の *EVII* 遺伝子発現をモニターするレポーターマウスの樹立

以前に私たちは、大腸菌人工染色体 (BAC) ヒトゲノムライブラリのクローンを二つ結合させることによって、ヒト3番染色体逆位アレルの切断点付近のゲノム配列を196 kbに渡って再現するクローンを作製した。さらに、これをマウスの受精卵に注入することによってトランスジェニックマウス (3q21q26-*EVII* マウス) を樹立した。このマウスは、造血幹・前駆細胞で *EVII* 遺伝子を高発現し、白血病を発症することがわかっている。この *EVII* 遺伝子発現を蛍光でモニターするために、上記の BAC クローン内の *EVII* 遺伝子翻訳開始点下流に *tdTomato* 遺伝子を挿入したクローンを作製した (図1)。このクローンをを用いてトランスジェニックマウス (3q21q26-*tdTomato* マウス) を樹立した。3q21q26-*tdTomato* トランスジェンからは *EVII* 遺伝子の転写は起こらず、造血細胞への異常を起こさないことを確認し、次の解析に用いることとした。

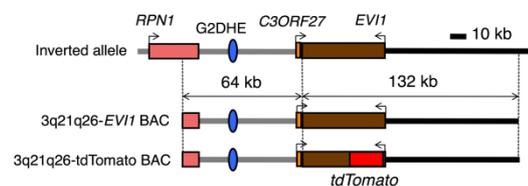


図1 3q21q26-*tdTomato* マウスの構築

### (2) 白血病発症前から *EVII* と *Gata2* 遺伝子の発現が高く誘導されている細胞集団が存在する

逆位アレルの制御下に発現する *EVII* 遺伝子と内在性 *Gata2* 遺伝子の発現を同時にモニターするために、3q21q26-*tdTomato* マウスを内在性 *Gata2* 遺伝子の翻訳開始点下流に GFP 遺伝子を挿入した *Gata2*<sup>+gfp</sup> マウス (*Gata2* 遺伝子はヘテロ欠失となる) と交配させ、*Gata2*<sup>+gfp</sup>::3q21q26-*tdTomato* マウス (以下、*Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスと表記) を作製した (図2左)。さらに、*EVII* 遺伝子の高発現による影響を見るために、このマウスを 3q21q26-*EVII* マウスと交配させ、3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスを得た (図2右)。

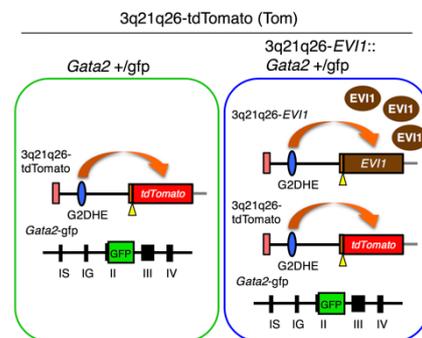


図2 *EVII* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子のレポーターマウス

12週令 (白血病発症前) の *Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスおよび 3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスの骨髄細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、どちらのマウスにおいても *tdTomato* と GFP の両方を高く発現する細胞集団が存在した (High 画分、図3)。3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスでは、*Gata2*<sup>+gfp</sup>::Tom マウスと比較して、High 画分の細胞の割合が増加していた。High 細胞

集団は *EVII* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子が共に高く誘導されており、のちに白血病を発症する 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウスで細胞数が増加していたことから、High 細胞集団から白血病細胞が出現するのではないかと仮説を立てた。

### (3) *EVII* 遺伝子の発現により High 細胞集団は連続コロニー形成能を獲得する

High 細胞集団が白血病細胞の起源となるかを解析するために、*Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウスから High、Low、Negative 画分 (図 3) の細胞を分取し、コロニーアッセイを行った。*Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウス、3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウス共に、High 画分の細胞が高いコロニー形成能をもっていた。さらに、High 画分から得られたコロニーの細胞を回収し、再び培地にまくと、3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウスのみでコロニーが出現した。さらに、3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>::Tom* マウスのコロニーは少なくとも 3 回はリプレーティングすることができた。このことから、High 細胞集団の中に白血病細胞の起源となる細胞が存在することが示唆された。

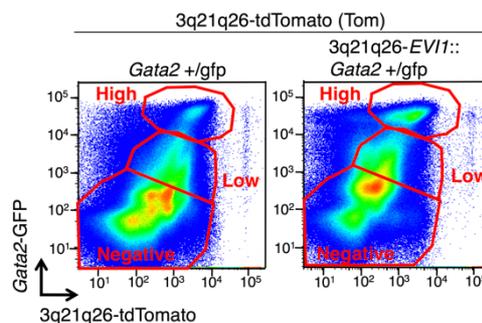


図 3 レポーターマウスの骨髄における tdTomato と GFP の発現

### (4) High 細胞集団には造血幹・前駆細胞と巨核球が含まれている

High 細胞集団が白血病細胞の起源となることが考えられたので、次に High 細胞集団に含まれる細胞の種類をフローサイトメトリーで解析した。High 細胞と Low/Negative 細胞の中に含まれる細胞の表面マーカーを解析したところ、High 細胞には造血幹細胞、前駆細胞が含まれていることがわかった。さらに分化した細胞の表面マーカーを解析すると、多くの分化した血液細胞は Low/Negative 細胞の中に含まれていたが、巨核球は High 細胞に含まれていることがわかった。

### (5) *EVII* 遺伝子の発現により巨核球・赤血球系および骨髄球系の前駆細胞が増加する

High 細胞集団に造血幹・前駆細胞と巨核球が含まれていたことから、これらの細胞の表現型を解析することにした。*EVII* 遺伝子の発現による影響と *Gata2* 遺伝子発現減少による影響を区別するために、ここからは野生型 (WT)、*Gata2* 遺伝子ヘテロ欠失 (*Gata2<sup>+/gfp</sup>*)、*EVII* 遺伝子発現 (3q21q26-*EVII*)、*EVII* 遺伝子発現および *Gata2* 遺伝子ヘテロ欠失 (3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>*) の 4 種類の遺伝子型のマウスを解析した。

造血幹・前駆細胞を含む Lineage-Sca1+c-Kit+(LSK) 画分を解析したところ、WT および *Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスと比較して、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスでは LSK 細胞数が増加していた。さらに LSK 画分の中を表面マーカーによって長期造血幹細胞 (LT-HSC)、短期造血幹細胞 (ST-HSC)、多能性造血前駆細胞 (MPP) に分けて解析を行った。LT-HSC の数は 4 つの遺伝子型のマウスで大きな差はなかった。一方で、MPP の中でも特に巨核球・赤血球系に分化しやすい前駆細胞 (MPP2) と骨髄球系に分化しやすい前駆細胞 (MPP3) の数が WT および *Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスと比較して、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスでは増加していた。さらに MPP2 の割合が 3q21q26-*EVII* マウスと比べて 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスでさらに増加している傾向があった。このことから、3 番染色体逆位アレルの制御下に *EVII* 遺伝子が発現することによって、巨核球・赤血球系および骨髄球系の前駆細胞が増加すること、さらに *Gata2* 遺伝子の発現減少がこれを促進することが明らかとなった。

### (6) *EVII* 遺伝子の発現により巨核球が増加し、リンパ球が減少する

*EVII* 遺伝子の高発現により、巨核球・赤血球系および骨髄球系の前駆細胞が増加していたことから、さらにその先の分化段階にある細胞を解析することにした。巨核球・赤血球共通前駆細胞 (MEP) 数、巨核球数、血小板数は WT や *Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスと比較して、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスでは増加していた。一方で、赤芽球数は 4 つの遺伝子型のマウスで大きな差はなかった。さらに、骨髄球系の好中球と単球の数も 4 つの遺伝子型のマウスで同等であった。しかしながら、B リンパ球と T リンパ球の数は WT や *Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスと比較して、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスでは減少していた。これらの細胞において、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII::Gata2<sup>+/gfp</sup>* マウスの間には大きな差はみられなかった。以上から、3 番染色体逆位アレルの制御下に *EVII* 遺伝子が発現することによって、巨核球への分化が促進される一方で、リンパ球への分化は抑制されることが示された。

### (7) *EVII* 遺伝子高発現と *Gata2* 遺伝子発現減少により巨核球増多を伴う白血病が発症する

以前の解析から、3q21q26-*EVII* マウスと 3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+/gfp</sup> マウスは生後約半年から白血病を発症することがわかっている。逆位アレルの制御による *EVII* 遺伝子の高発現が、巨核球への分化を促進したことから、白血病発症後のマウスにおいて血小板数と巨核球数を測定した。3q21q26-*EVII* マウスは、白血病発症前は高い血小板数を示すものの、白血病発症時には血小板数が減少し、野生型マウスの血小板数の平均値より高値を示すものは25匹中1匹のみであった。一方、3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+/gfp</sup> マウスでは、白血病発症後も25匹中6匹が血小板高値を示した。また、骨髄中の巨核球数も同様の結果を示した。このことから、*EVII* 遺伝子高発現に加えて、*Gata2* 遺伝子の発現が減少することが巨核球増多を伴う白血病の発症に重要と考えられた。

### (8) 3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+/gfp</sup> マウスの巨核球増多を伴う白血病はヒト3番染色体転座・逆位を伴う白血病の表現型を再現する

血小板高値を示した 3q21q26-*EVII*::*Gata2*<sup>+/gfp</sup> マウスの白血病の表現型を解析するため、末梢血塗抹標本のライトギムザ染色を行った(図4)。芽球(白矢頭)に加えて、核が分葉している骨髓球様細胞(黄矢頭)、さらに細胞質の境目が不明瞭である巨核球様細胞(黒矢頭)がみられた。また、巨大血小板(黒矢印)も観察された。この特徴はヒト3番染色体転座・逆位を伴う白血病と類似していた。

さらに骨髄のフローサイトメトリ解析を行ったところ、骨髄には巨核球(CD41+CD61+)がみられたが、それに加えて巨核球以外(CD41-)の細胞も観察された。CD41-画分には、骨髓球(Gr1+)やB220+細胞が存在していた。未熟な細胞のマーカである *c-Kit* の発現を解析したところ、B220+細胞が *c-Kit* を高く発現していた。CD41+CD61+細胞、CD41-B220+Gr1-細胞、CD41-B220-Gr1+細胞を単離し、サイトスピン標本をライトギムザ染色で観察したところ、CD41+CD61+細胞は偽足をもつ巨核球、CD41-B220+Gr1-細胞は芽球、CD41-B220-Gr1+細胞は分葉した核をもつ骨髓球の形態を示していた。

CD41+CD61+細胞、CD41-B220+Gr1-細胞、CD41-B220-Gr1+細胞のうち、どの細胞が白血病幹細胞を含むかを解析するために、白血病マウスからこれらの細胞を分取し、半致死量の放射線照射をした野生型マウスに移植した。その結果、CD41-B220+Gr1-細胞を移植したレシピエントマウスのみが白血病を発症した。このレシピエントマウスは、ドナー細胞と同様に巨核球を含む白血病を発症するものと、巨核球を含まない白血病を発症するものが存在した。このことから、CD41-B220+Gr1-細胞の中に白血病幹細胞が含まれており、芽球、巨核球、骨髓球の白血病細胞を供給していることが明らかとなった。

以上のことから、G2DHEを含む3番染色体逆位アレルの制御によって、*EVII* 遺伝子が造血幹・前駆細胞と巨核球系列に発現し、白血病の発症前から巨核球への系列決定を促進すること、さらに、この *EVII* 遺伝子の発現が *Gata2* 遺伝子の発現低下と協調して、巨核球前駆細胞を蓄積させることが明らかとなった。また、この二つの遺伝子変異が、ヒト3番染色体転座・逆位を伴う白血病の特徴と類似した巨核球増多を伴う白血病を発症させることが示された。

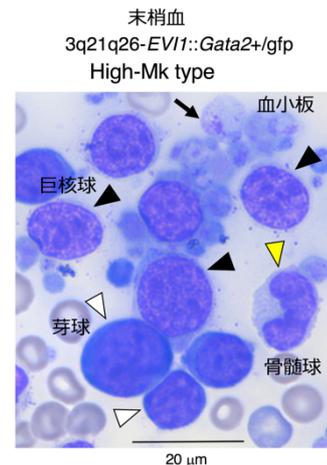


図4 巨核球増多を伴う白血病(High-Mk型)マウスの末梢血像(ライトギムザ染色)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Mikiko, Katayama Saori, Yamamoto Masayuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Two effects of GATA2 enhancer repositioning by 3q chromosomal rearrangements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUBMB Life	6. 最初と最後の頁 159 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka Ayaka, Suzuki Mikiko, Katayama Saori, Orihara Daiki, Engel James Douglas, Yamamoto Masayuki	4. 巻 4
2. 論文標題 EVI1 and GATA2 misexpression induced by inv(3)(q21q26) contribute to megakaryocyte-lineage skewing and leukemogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1722 ~ 1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019000978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 片山 紗乙莉、鈴木 未来子、笹原 洋二、呉 繁夫、山本 雅之	4. 巻 56
2. 論文標題 GATA2ハプロ不全はEVI1誘導性白血病の発症を促進する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 159 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.11412/jspho.56.159">https://doi.org/10.11412/jspho.56.159</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mikiko Suzuki
2. 発表標題 GATA2 haploinsufficiency accelerates EVI1-driven leukemogenesis
3. 学会等名 IUBMB Focused Meeting on GATA Transcription Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山岡彩香, 鈴木未来子, 片山紗乙莉, 山本雅之
2. 発表標題 3番染色体転座・逆位による高血小板型白血病モデルマウスの樹立と解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第84回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山紗乙莉, 鈴木未来子, 山岡彩香, Nadine Keleku-Lukwete, 勝岡史城, 大槻晃史, 呉繁夫, James Douglas Engel, 山本雅之
2. 発表標題 GATA2ハプロ不全はEVI1誘導性白血病の発症を促進する
3. 学会等名 第14回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikiko Suzuki, Ayaka Yamaoka, Saori Katayama, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 Misexpression of EVI1 and GATA2 provokes leukemia associated with high number of megakaryocytes
3. 学会等名 The 21st Hemoglobin Switching Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori Katayama, Mikiko Suzuki, Yoji Sasahara, Shigeo Kure, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 GATA2 haploinsufficiency accelerates EVI1-driven leukemogenesis in an inv(3)(q21q26) mouse model
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木未来子, 山岡彩香, 片山紗乙莉, 山本雅之
2. 発表標題 巨核球増多を伴う3番染色体転座・逆位陽性白血病の解析
3. 学会等名 第23回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木未来子、山岡彩香、織原大貴、片山紗乙莉、山本雅之
2. 発表標題 レポーターマウスを用いた3番染色体逆位を伴う白血病の発症機構の解析
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考