

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08747

研究課題名(和文) EVI1-GATA2バランスによる3q白血病悪性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of 3q leukemia malignant transformation mechanism by EVI1-GATA2 balance

研究代表者

鈴木 未来子 (Suzuki, Mikiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80508309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：3番染色体転座・逆位アリルでは、3q21側のGATA2遺伝子エンハンサーによって、3q26側の原がん遺伝子EVI1が高発現しており、これが白血病発症の原因となっている。3番染色体逆位アリルによって制御されるEVI1遺伝子発現をモニターしたところ、内在性EVI1遺伝子は造血幹細胞に特異的に発現する一方で、逆位アリル由来EVI1遺伝子は造血前駆細胞でも高く発現していることがわかった。逆位アリルをもつマウスでは造血幹細胞だけでなく前駆細胞からも白血病細胞が出現したことから、転座・逆位によるEVI1遺伝子発現様式の変化は、造血幹細胞だけでなく造血前駆細胞にも白血病細胞産生能力を付与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3番染色体転座・逆位によりGATA2遺伝子エンハンサーを獲得したEVI1遺伝子は、造血幹細胞だけでなく造血前駆細胞にも高発現し、白血病の起源となる細胞数を大幅に増加させていることが明らかとなった。染色体転座・逆位に伴う原がん遺伝子の発現量増加のみでなく、発現細胞種の変化によっても白血病発症がもたらされることを示しており、白血病発症における新たな知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Chromosome 3 translocation/inversion is a known poor prognostic factor in acute myeloid leukemia. In these alleles, the proto-oncogene EVI1 on 3q26 is highly expressed by the GATA2 gene enhancer on 3q21, which is responsible for leukemogenesis. Using reporter mice to monitor EVI1 gene expression regulated by the inverted allele, we found that the inverted allele-derived EVI1 gene is highly expressed in both hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitor cells, whereas the endogenous EVI1 gene is specifically expressed in HSCs. Since leukemic cells arise not only from HSCs but also from progenitor cells in the mice with the inverted allele, the altered EVI1 gene expression pattern due to translocation/inversion confers the ability to generate leukemic cells not only from HSCs but also from progenitor cells.

研究分野：血液学

キーワード：GATA2 EVI1 白血病

1. 研究開始当初の背景

3 番染色体長腕 21 (3q21) と同じく 3 番染色体長腕 26 (3q26) 領域の間の転座または逆位は、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。この転座または逆位アレルでは、3q26 側に存在する原がん遺伝子 *EVII* が高発現しており、これが白血病発症の原因となっている (図 1)。私たちは以前に、大腸菌人工染色体ヒトゲノムライブラリの二つのクローンを結合することによって、ヒト 3 番染色体逆位アレルを 196 kb にわたって再現するトランスジーンをもつマウス (3q21q26-*EVII* マウス) を作製した (Yamazaki and Suzuki et al., *Cancer Cell* 2014)。このマウスはヒト *EVII* 遺伝子を高く発現し、生後約半年で白血病を発症した。*EVII* 遺伝子の高発現に貢献している 3q21 側のエンハンサーは当初わかっていなかった。私たちは 3q21 側に造血幹/前駆細胞で発現する *GATA2* 遺伝子の遠位造血エンハンサー (G2DHE) があることに着目し、3q21q26-*EVII* マウスのトランスジーンから G2DHE を欠かさせたところ、*EVII* 遺伝子発現および白血病発症が抑制された。このことから、*GATA2* 遺伝子エンハンサーが *EVII* 遺伝子の高発現に必要であることが明らかとなった。すなわち、この 3 番染色体転座・逆位アレルによって誘導される *EVII* 遺伝子は、*GATA2* 遺伝子エンハンサーと *EVII* 遺伝子プロモーターによって制御されており、内在性の *EVII* 遺伝子とは異なる発現様式を示すことが予想される。

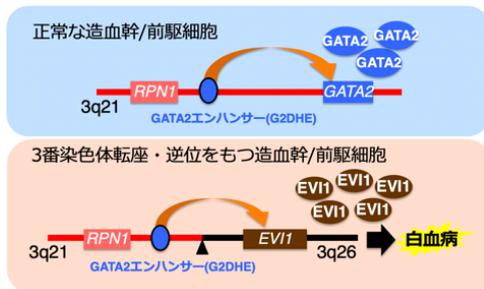
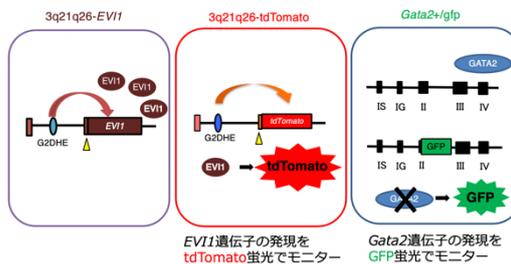


図 1. 3 番染色体転座・逆位における *EVII* 遺伝子発現

内在性の *EVII* 遺伝子は造血幹細胞特異的に高発現しており、造血前駆細胞ではその発現が著しく低下する。一方で、*GATA2* 遺伝子は造血幹細胞のみでなく、一部の造血前駆細胞にも高く発現しており、内在性の *EVII* 遺伝子よりも広い細胞種に発現している。転座・逆位により *GATA2* 遺伝子エンハンサーを獲得した *EVII* 遺伝子が細胞種によりどのような発現を示すのか、詳細はわかっていない。

2. 研究の目的

転座または逆位アレルによって制御される *EVII* 遺伝子発現を 1 細胞レベルでモニターすることによって、内在性 *EVII* 遺伝子や *GATA2* 遺伝子との発現様式との違いを明らかにし、白血病発症の基盤となる細胞を同定することを目的とする。



3. 研究の方法

白血病発症前の 3q21q26-*EVII* マウスにおいて、ヒト 3 番染色体逆位アレルによって制御される *EVII* 遺伝子の発現を 1 細胞レベルでモニターするため、3q21q26-*EVII* マウスの *EVII* 遺伝子翻訳開始点下流に tdTomato 遺伝子を挿入した 3q21q26-tdTomato マウスを作製した (図 2, Yamaoka and Suzuki et al., *Blood Adv.* 2020)。また、内在性 *Gata2* 遺伝子の発現を同時にモニターするために、*Gata2* 遺伝子翻訳開始点下流に GFP 遺伝子を挿入したノックインマウス (*Gata2^{gfp/+}* マウス) を 3q21q26-tdTomato マウスと交配させた。この交配により得られた 3q21q26-tdTomato::*Gata2^{gfp/+}* (*Gata2^{gfp/+}::Tom*) レポーターマウスに、3q21q26-*EVII* マウスを交配させ、3q21q26-*EVII*::3q21q26-tdTomato::*Gata2^{gfp/+}* (3q21q26-*EVII*::*Gata2^{gfp/+}::Tom*) マウスを得た。これらのマウスにおいて、*EVII* 遺伝子高発現の細胞を同定し、連続コロニー形成能および表面マーカー解析により白血病発症の起源となりうるかを検討した。

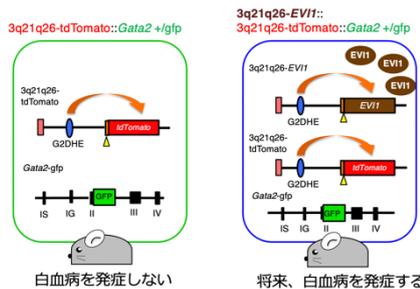


図 2. 蛍光レポーターを用いた逆位アレル由来の *EVII* 遺伝子発現モニタリング

4. 研究成果

白血病発症前のマウス骨髄には逆位アレル由来の *EVII* 遺伝子と内在性 *Gata2* 遺伝子が強く誘導されている独立した細胞集団 (High 画分) が存在する

白血病発症前の 12 週齢において、*Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスおよび 3q21q26-*EVII*::*Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスの骨髄細胞を解析したところ、どちらのマウスにおいても tdTomato と GFP 蛍光は相関していた (図 3)。また、tdTomato と GFP を高発現する細胞集団が独立して存在していたため、これ

を High 画分、それ以外の部分を Low、Negative 画分とした。High、Low、Negative 画分の細胞が白血病発症に関連するかを検討するため、連続コロニーアッセイを行った。1 回目のコロニー形成では、どちらのマウスも High 画分のみコロニー形成能があった。High 画分のコロニーを回収し、リプレATING (新しい培地に撒きなおす) を行ったところ、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスのみにおいて少なくとも 4 回の連続コロニー形成能があった。このことから、High 画分に白血病細胞の起源となる細胞が含まれていることがわかった。

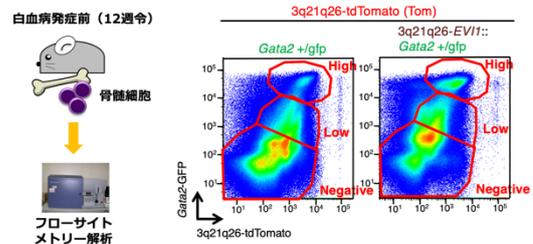


図 3. 白血病発症前の骨髄における逆位アレル由来 *EVII* 遺伝子と内在性 *Gata2* 遺伝子の発現パターン

3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウス High 画分には造血前駆細胞が多く含まれている

次に、*Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスおよび 3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスの High 画分の中のような細胞が含まれているかを、フローサイトメトリーで解析した。その結果、High 画分には Lineage-Sca1+c-Kit+ (LSK) 細胞が特に多く含まれていた。さらに、*Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスと比較して、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは High 画分に含まれる LSK 細胞の割合が高かった。LSK 画分には、幹細胞と前駆細胞が含まれている。内在性の *Evi1* 遺伝子は造血幹細胞に発現していることから、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスの High 画分では、造血幹細胞が増加しているのではないかと予想されたが、長期造血幹細胞 (LT-HSC) はむしろ減少していた (図 4)。

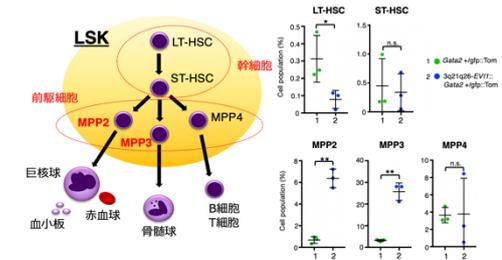


図 4. High 画分内の各細胞種の割合

一方で、赤血球・巨核球への分化傾向がある造血前駆細胞 MPP2 や、骨髄球への分化傾向がある MPP3 が増加していることがわかった。短期造血幹細胞 (ST-HSC) やリンパ球への分化傾向がある MPP4 は、大きな変化はなかった。

これらの細胞における *EVII* 遺伝子の発現量を解析するために、内在性マウス *Evi1* 遺伝子とヒト *EVII* トランスジーンを両方検出するプライマーセットを用いて、定量 RT-PCR 解析を行った。3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは、*GATA2* 遺伝子エンハンサーの制御によって、幹細胞だけでなく、前駆細胞でも高い *EVII* 遺伝子の発現が誘導されていた (図 5)。このことから、造血幹細胞ではなく造血前駆細胞が白血病発症の起源となっているのではないかと考えた。

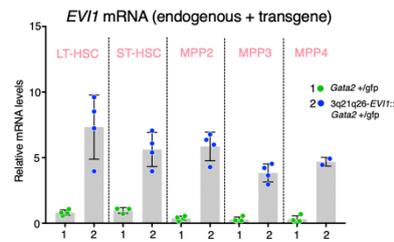


図 5. 造血幹/前駆細胞における *EVII* 遺伝子の発現

3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは造血幹細胞だけでなく造血前駆細胞にも高いコロニー形成能がみられる

造血幹細胞だけでなく、造血前駆細胞白血病発症の起源となっているかを検討するために、幹細胞画分 (LT-HSC、ST-HSC) と前駆細胞画分 (MPP2、MPP3、MPP4) を分けて、コロニーアッセイを行った。その結果、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは、幹細胞だけでなく、前駆細胞も連続コロニー形成能をもつことがわかった (図 6 上)。

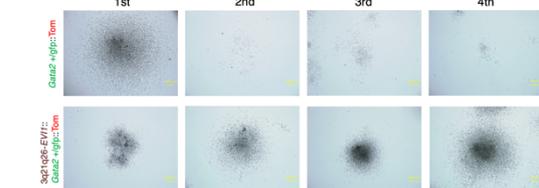
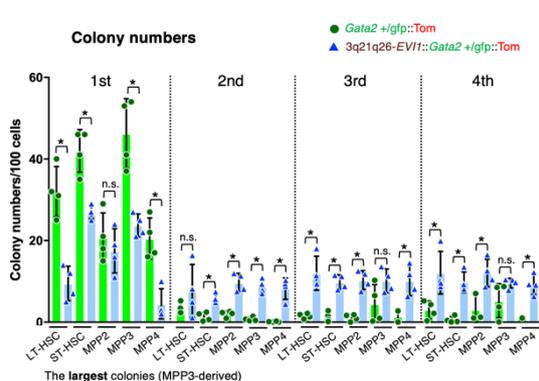


図 6. 造血幹細胞および前駆細胞由来のコロニー

Gata2^{gfp/+}::Tom マウスの前駆細胞由来コロニーでは、2 回目のコロニーからコロニー 1 個あたりに含まれる細胞数が激減した (図 6 下)。一方で、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは 2 回目以降のコロニーも 1 回目と同様の細胞数を維持していた。このことから、3q21q26-*EVII::Gata2^{gfp/+}::Tom* マウスでは、幹細胞だけでなく、前駆細胞も白血病細胞の起源となりうると考えた。

造血幹細胞のみでなく造血前駆細胞からも白血病細胞が出現する

以前の 3q21q26-*EVII* マウス白血病細胞の解析から、c-Kit+Gr1-B220+画分に白血病幹細胞が含まれることがわかっている (Katayama and Suzuki et al., *Blood* 2017)。この表面マーカーを示す細胞は

正常骨髄中にはほとんどいない。そこで、形成されたコロニーの細胞中に **c-Kit+Gr1-B220+**細胞が出現するかをフローサイトメトリーで確認した。その結果、3回目のコロニー以降に **c-Kit+Gr1-B220+**細胞が出現することがわかった。造血幹細胞および前駆細胞のうちどの細胞由来のコロニーから **c-Kit+Gr1-B220+**細胞が出現するのかを解析したところ、幹細胞および前駆細胞どちらからも **c-Kit+Gr1-B220+**細胞がランダムに出現した (図 7、赤矢印)。このことから、幹細胞および前駆細胞の両方から白血病細胞が出現することがわかった。

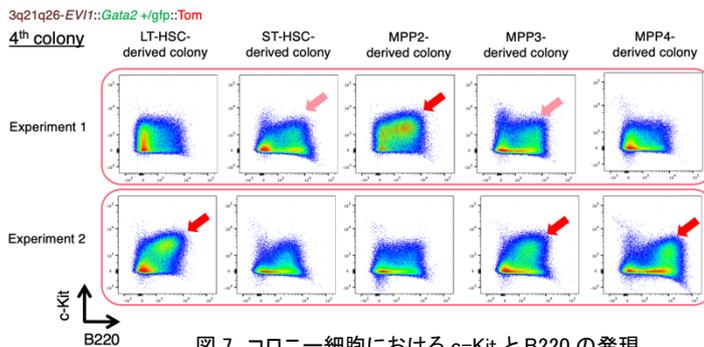


図 7. コロニー細胞における c-Kit と B220 の発現

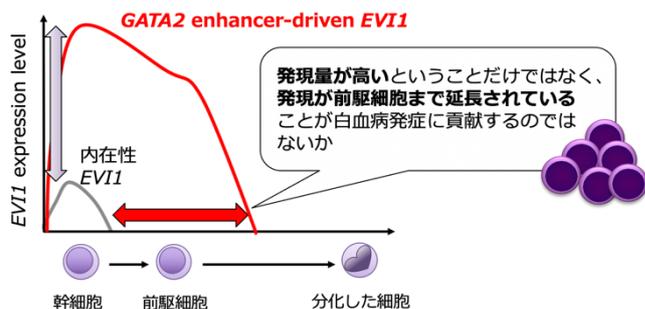


図 8. GATA2 遺伝子エンハンサー獲得による EVI1 遺伝子発現変化と白血病発症

以上の結果から、3番染色体転座・逆位により GATA2 遺伝子エンハンサーを獲得した EVI1 遺伝子は造血幹細胞だけでなく、造血前駆細胞にも高発現することによって、白血病の起源となる細胞数を大幅に増加させていることが明らかとなった。染色体転座・逆位により制御領域を獲得することで、発現量の増加のみでなく、発現細胞の変化によっても白血病発症がもたらされるのではないかと考えられた (図 8)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木未来子
2. 発表標題 GATA2遺伝子エンハンサーの移動をもたらす急性骨髄性白血病
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------