

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22934

研究課題名（和文）白血病関連遺伝子EVI1の正常造血における下流標的の検討

研究課題名（英文）Downstream targets of the leukemia-associated gene EVI1 in normal hematopoiesis

研究代表者

千葉 晶輝（Chiba, AKira）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70875947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子改変細胞株を用いChIP-seqを施行し、さらにEvi1をノックアウトした同細胞株のRNA-seqのデータや、Evi1高発現マウス白血病細胞を利用したChIP-seqのデータと統合し、Evi1と協調して造血幹細胞の未分化性の維持に関わる遺伝子候補を得た。これらのうちEvi1欠失したマウスの造血幹細胞にGfi1を過剰発現させるとコロニー形成能が回復した。またマウスの競合移植の系を用いたところEvi1欠失がGfi1の過剰発現によりレスキューされた。これらの検証から、正常造血モデルにおいてGfi1がEvi1の下流標的であり、協調して幹細胞性の維持に寄与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は正常造血幹細胞に発現する遺伝子が高発現することによって特徴づけられるタイプの、他の難治性急性骨髄性白血病（AML）に共通する治療開発のモデルとなりうる可能性があり、これによって難治性AMLの病態解明と新規治療開発の基盤を確立することができる。

研究成果の概要（英文）：ChIP-seq was performed on the genetically engineered cell lines and integrated with RNA-seq data from Evi1 knockout cell lines and ChIP-seq data from Evi1-overexpressing mouse leukemia cells to obtain candidate genes involved in maintaining undifferentiated HSCs in cooperation with Evi1. Of these, overexpression of Gfi1 in HSCs from mice lacking Evi1 restored colony-forming ability. In addition, overexpression of Gfi1 rescued Evi1 deletion using a competitive transplantation system in mice. These findings suggest that Gfi1 is a downstream target of Evi1 in normal hematopoietic models and may cooperate with Evi1 to maintain stemness.

研究分野：急性骨髄性白血病

キーワード：正常造血 急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

EVI1 は AML と正常造血双方において重要な遺伝子であり、治療標的とするのが難しい。EVI1 はヒト染色体 3q26 上に位置する MDS and EVI1 complex (MECOM) locus にコードされている転写因子である。AML では、その 8-10% に EVI1 遺伝子の高発現が認められ、この特徴を持つ患者群は他の AML の患者群と比較しても極めて予後不良であり、その特殊性から EVI1 高発現 AML という独立した病型とみなされている。一方正常造血においては、マウスモデルにおいて Evi1 欠失で胎生期の HSC の発生不全が起こり、Evi1 のホモ欠失個体ではマウスは骨髄不全・出血・発育不全により胎生 10.5 日で死亡する。また Evi1 は成体マウスの HSC の維持にも関わっていることが、成体マウスで条件付き欠失させた時に HSC の自己複製能が減少し、HSC の減少をきたすことから証明された。また Evi1 の末端に GFP を挿入して、Evi1 の発現を GFP で標識可能にしたレポーターマウスを用いることで、造血系における Evi1 の発現は胎生期・成体期ともに長期の骨髄再構築能を有する HSC に限局することが明らかになった。これらより Evi1 は正常造血において重要であり、HSC 維持に必須の遺伝子であると考えられる。このように EVI1 は AML と HSC の両方に発現するものの、AML では発症や治療抵抗性に寄与するのに対し、正常造血では必須という点が、高発現では難治性で予後不良にもかかわらず、EVI1 を治療標的とするのが難しい理由である。この 2 面性は EVI1 の下流標的が発現量および細胞の状態によって大きく異なっていることに起因している可能性があり、その違いを明らかにすることが難治性 AML の病態解明と治療標的の探索につながると考える。

正常造血における EVI1 の網羅的な下流標的の探索はこれまで進んでいない。AML においては、EVI1 が Gata2 (GATA binding protein 2) や Pbx1 (Pre B cell leukemia homeobox 1) の遺伝子の制御領域に直接結合し、転写を活性化させたり、Pten (Phosphatase and tensin homolog) の転写を直接抑制したりすることが知られている。一方正常造血における EVI1 の下流標的の探索はこれまで殆ど行われていなかった。その理由の 1 つとしては、*in vivo* では先程述べたように Evi1 の発現が長期の骨髄再構築能を有する HSC に限局しており、その後のアッセイに必要な細胞数が十分確保しにくいことがある。また ChIP-seq においては、安定して使用可能な品質の anti-EVI1 抗体がないことが、下流標的の探索を困難にしている。

2. 研究の目的

EVI1 の下流標的が発現量および細胞の状態によって大きく異なっている可能性があり、造血細胞と AML 細胞での下流標的の違いを明らかにすることが、難治性 AML の病態解明と治療標的の探索につながると考えられる。本研究では CRISPR-Cas9 system を用いた遺伝子改変細胞株を用いて EVI1 の正常造血における下流標的の探索を行う。

3. 研究の方法

AML と正常造血における EVI1 の下流標的の違いを明らかにするために、まずは EVI1 の正常造血における下流標的を探索し、次にその下流標的が EVI1 とどのように協調し正常造血にどのような影響を及ぼすかを検証することを目的とする。先に上げた *in vivo* で十分な細胞数が確保できない問題を解決するために、まずは CRISPR-Cas9 system を用いて、*in vitro* で 3xFLAG タグを Evi1 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウス造血細胞 32D-cl3 を作製する。この遺伝子改変細胞株を用い、抗体クロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq) を施行し、Evi1 の下流標的を網羅的に探索する。

4. 研究成果

In vitro で 3xFLAG tag を Evi1 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウス造血細胞株 32Dcl3 を CRISPR-Cas9 system を用いて作成することに成功した。この細胞株において ChIP-seq を施行し、正常造血における Evi1 の下流標的たりうる候補遺伝子を複数同定した。さらに Evi1 をノックアウトした同細胞株の RNA-seq のデータや、Evi1 高発現マウス白血病細胞を利用した ChIP-seq のデータと統合することで、正常造血に特異的な、造血細胞の未分化性維持に関わる可能性の高い遺伝子群を抽出した。この遺伝子群候補の生理的な意義を検証するために、Evi1 を条件的に欠失させることが可能なマウスの骨髄細胞を用いた検証を行った。具体的には、これらの遺伝子群の中で、Evi1 欠失に連動して発現の低下する遺伝子群を、Evi1 と協調して造血幹細胞の未分化性の維持に関わる遺伝子として考えた。Evi1 欠失したマウスの造血幹細胞に候補遺伝子を過剰発現させることにより、コロニー形成能が回復するかを検証したところ、Gfi1 が候補遺伝子として考えられた。マウスの競合移植の系を用いることにより Evi1 欠失が Gfi1 の過剰発現によりレスキューされるかを検証したところ、レスキューされる。これら *ex vivo* および *in vivo* の系での検証から、正常造血モデルにおいて Gfi1 が Evi1 の下流標的であり、協調して幹細胞性の維持に寄与している可能性を見出した。

今後はより生理的なモデルを用いて Gfi1 の正常造血での Evi1 と関連する文脈での役割を検証予定である。

これまで正常造血細胞において、EVI1 の標的に関して述べた既報は存在せず、試みられた報告もない。正常造血側から白血病関連遺伝子の標的を網羅的に探索する本研究はこれまでと全く違った観点からの研究である。この研究は正常造血細胞と AML 細胞の差分を見出しにくく、治療標的を見出すのが困難な難治性白血病の病態解明のアプローチの 1 つを提示するものと考えられ、特異的な標的を同定した後は、そこをターゲットとした分子標的療法につなげやすい。この手法は造血器悪性腫瘍に限らず、他の悪性腫瘍においても、正常との差分が見出しにくい難治性腫瘍の治療開発のモデルとなりうるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Chiba
2. 発表標題 GF11 Is a Downstream Target of EVI1 in Normal Hematopoiesis
3. 学会等名 米国血液学会学術集会（オンライン開催）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Akira Chiba
2. 発表標題 GF11 Is a Downstream Target of EVI1 in Normal Hematopoiesis
3. 学会等名 日本血液学会総会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------