

## 主論文の要旨

### **Functionally deregulated AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to induce a blastic phase-like phenotype of chronic myelogenous leukemia in mice**

AML1/RUNX1 遺伝子の機能的な脱制御は BCR-ABL と協調し  
マウスに慢性骨髄性白血病急性転化様の病態を引き起こす

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

山本 起代子

## 【諸言】

BCR-ABL 融合遺伝子は慢性骨髄性白血病（CML）発症の原因遺伝子である。チロシンキナーゼ阻害薬の臨床導入により、慢性期（chronic phase: CP）における治療成績は飛躍的に向上したが、一部の症例では移行期、急性期（blast crisis: BC）に進行する。しかし、BC への病期進展の分子病態に関しては多くが不明のままである。*AML1* 遺伝子は造血に関与する様々な遺伝子の転写を制御しており、また急性白血病においてはその遺伝子異常がしばしば報告されている。BC 患者においても、*AML1* 遺伝子の点突然変異や、過剰発現の報告があるものの、BC の病期進展への寄与については検討されていない。今回の研究では、BCR-ABL と変異 *AML1* もしくは *AML1* 野生型 (wt.*AML1*) を造血前駆細胞に共発現させ、*in vitro* と *in vivo* での機能解析を通して *AML1* 遺伝子機能の脱制御が BC の病態に寄与しているかどうかを検討した。

## 【対象と方法】

### 1. 患者検体及び細胞株の *AML1* mRNA 測定、遺伝子変異検索

BC 患者検体（13 例）と細胞株（5 種）の *AML1* mRNA の発現量の測定を定量 RT-PCR で行い、CP 患者及び正常検体と比較した。さらに、BC 検体・細胞株における *AML1* 遺伝子変異の有無を検索した。細胞株の *AML1* 遺伝子を 2 種類の shRNA を用いて knock down し増殖能を検討した。

### 2. 変異 *AML1* の機能解析

変異 *AML1* の DNA 結合能及び、転写活性を調べた。

### 3. 変異 *AML1* 及び wt.*AML1* と BCR-ABL の協調作用の解析（*in vitro*、*in vivo*）

*In vitro*: 変異 *AML1*（*AML1*R80C、*AML1*K83Q、*AML1*R139G、*AML1*D171N）もしくは wt.*AML1* と BCR-ABL を、妊娠 14 日目マウス（C57BL/6）の胎児肝細胞から分離した造血前駆細胞にそれぞれレトロウイルスベクターを用いて導入し、サイトカイン無添加培地において液体培養及びコロニーアッセイを行った。

*In vivo*: 5-FU を投与したマウスから採取した骨髄細胞に BCR-ABL と変異 *AML1*（*AML1*R80C、*AML1*K83Q）もしくは wt.*AML1* をそれぞれレトロウイルスベクターを用いて導入し、免疫不全マウスに移植した。

## 【結果】

### 1. 患者検体及び細胞株の *AML1* mRNA 測定、遺伝子変異検索

BC 患者と正常検体及び CP 患者の mRNA を比較すると統計学的優位差は認めなかったが、BC で高値を示した 4 例は、CP 患者の mean+2SD を超えていた（Figure 1）。解析可能な BC 患者 12 例中 3 例（25%）で、今までに報告のない *AML1* 遺伝子変異（G190R、R135EfsX42、A297LfsX7）を認めた。*AML1* mRNA が高値を示した 4 例では遺伝子変異を認めなかった。細胞株の *AML1* 遺伝子を knock down すると細胞の増殖が抑制された（Figure2）。

## 2. 変異 AML1 の機能解析

変異 AML1 の機能解析を行うと、AML1K83Q は DNA 結合能を有していたが、AML1R80C、R139G、D171N は DNA 結合能を有しなかった。AML1K83Q は wt.AML1 より弱いものの転写活性化能を認め、AML1R139G はわずかに転写活性化能を示したにすぎなかった。一方、AML1R80C と AML1D171N は wt.AML1 の転写活性を抑制した (Figure3)。

## 3. 変異 AML1 及び wt.AML1 と BCR-ABL の協調作用の解析 (in vitro、in vivo)

In vitro: BCR-ABL/AML1K83Q、BCR-ABL/AML1R139G、BCR-ABL/wt.AML1 導入細胞はサイトカイン無添加液体培地で持続的な増殖を認め、コロニーアッセイでもほぼ同様の結果が確認できた。しかし、BCR-ABL/AML1R80C、BCR-ABL/AML1D171N 導入細胞は持続的な増殖を認めなかった。増殖した細胞は、形態学的に N/C 比の高い芽球様細胞であり、フローサイトメトリーでは約 50%は Lineage 陰性の幼若細胞であった (Figure4)。

In vivo: マウス骨髄移植では、BCR-ABL 単独 (コントロール) と BCR-ABL/AML1R80C 導入細胞を移植したマウスは、1 次及び 2 次移植マウスともに CP 様の病態を呈した。一方、BCR-ABL/AML1K83Q 及び BCR-ABL/wt.AML1 導入細胞を移植したマウスは、少数例ではあったが 1 次及び 2 次移植マウスにおいて BC 様の病態を呈した (Figure5)。

### 【考察】

慢性骨髄性白血病急性転化の患者において *AML1* 遺伝子異常 (点突然変異や過剰発現) が報告されている。今回、BCR-ABL と変異 AML1 及び wt.AML1 の協調作用を検討すると、実験に使用した変異 AML1 の中で DNA 結合能や転写活性を維持していた AML1K83Q は in vitro assay で持続的な増殖能を獲得したが、転写活性が抑制された AML1R80C では増殖しなかった。興味深いことに wt.AML1 も増殖能を獲得している。また、マウス骨髄移植モデルでは、BCR-ABL/AML1K83Q、BCR-ABL/wt.AML1 導入細胞を移植したマウスでは BC 様の病態を呈したが BCR-ABL/AML1R80C は BCR-ABL 単独 (コントロール) と同様に CP 様の病態を呈した。この結果から、一部の変異 AML1 は CML の病期進展に寄与するが、すべての変異が同様に寄与するものではないことが示唆される。AML1 は造血に必須の転写因子であり、当初転写活性化能と病期進展に相関関係があると仮説を立てたが、単純に説明できないと考えられる。wt.AML1 に対してドミナントネガティブ効果のある変異 AML1 でもマウス骨髄移植モデルでは phenotype に差があると報告されていることから、異なったアミノ酸変異による僅かな構造の違いが病態の差に関わることが推測される。また今回の結果から、遺伝子変異だけでなく wt.AML1 の過剰発現も BC の病態に関与する可能性が示唆される。wt.AML1 は、細胞依存的に癌遺伝子、癌抑制遺伝子の両者の役割をすることが報告されており、今回は BCR-ABL と協調し癌遺伝子として機能したと考えられる。最近、ドミナントネガティブ効果を持つ変異 AML1 がマウス骨髄移植モデルで BC を発症し

たことが報告された。我々のマウス骨髄移植モデルでは AML1R80C（ドミナントネガティブ効果有り）は BC 様の病態は引き起こさなかったが、AML1R80C は、実際に BC 患者で認められている変異であること、AML1K83Q、wt.AML1 は BCR-ABL と協調して BC 様の病態を発症するが、頻度が低かったことを考慮すると、既報告との結果の違いから、AML1 遺伝子の機能的な脱制御だけでなく、更に付加的な異常が病期進展に必要となる可能性が示唆された。

#### 【結語】

AML1 遺伝子異常の一部や wt.AML1 遺伝子の過剰発現により芽球（blast）が誘導され、BC 病態成立に寄与することが明らかとなった。しかしながら、BC 病態の成立・維持には不十分であり、他の遺伝子異常と協調することが重要であることが示唆された。