

主論文の要旨

Chromosomal translocation-mediated evasion from miRNA induces strong MEF2D fusion protein expression, causing inhibition of PAX5 transcriptional activity

MEF2D 融合タンパクの高発現は、染色体転座によってマイクロ RNA の制御を回避することで引き起こされ、PAX5 の転写活性を抑制する

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

(指導：清井 仁 教授)

平野 大希

【背景】

MEF2D 融合遺伝子 (*MEF2D-HNRNPUL1*, *MEF2D-BCL9* など) は、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) の約 5% に認められることが近年明らかにされた。既報で *MEF2D* 融合遺伝子を導入した pro B 細胞をマウスに移植すると、一部のマウスで分化停止が起こることが示されたが、そのメカニズムは不明であった。また、*MEF2D* 融合タンパクの発現は、発現ベクターを作製して比較すると、野生型に比べて著明に高発現していることも示されたが、そのメカニズムや重要性・意義も不明であった。

【方法】

MEF2D 融合タンパクの発現を細胞株 (Kasumi7, Kasumi9) や *MEF2D-HNRNPUL1* (M-H) 陽性 ALL の患者検体でもウエスタンブロッティングにて確認した。次に M-H 及び野生型の発現ベクターに種々の変異、欠失を導入した発現ベクターを作製した。導入した変異およびプロテオソーム阻害剤、シクロヘキシミドなどが、*MEF2D* タンパク発現に与える影響を、これらの発現ベクターを 293T 細胞に導入することで検討した。

また、各種 *MEF2D* タンパクが B 細胞分化を制御する転写因子である PAX5 の機能に与える影響、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC との親和性の有無・程度をルシフェラーゼアッセイ、プルダウンアッセイで検討した。

【結果】

MEF2D 融合タンパクの高発現は、発現ベクターだけでなく細胞株や M-H 陽性 ALL の患者検体でも確認できた (Figure 1a and 1b and 1c)。発現ベクターでは M-H タンパクは野生型に比べて約 10 倍高い発現を示したが、タンパク半減期、プロテオソーム阻害剤添加によるタンパク発現上昇の程度に M-H と野生型の間に明らかな相違は認めなかった (Figure 1d and 1e)。野生型 *MEF2D* 発現ベクターに、融合遺伝子のブレイクポイントに相当する 336 番目のアミノ酸を終止コドンに置換する変異を導入した発現ベクターと、終止コドンを導入した後、終止コドン以降の DNA を欠失させた発現ベクターを作製した。両者は同じタンパク (*MEF2D* のアミノ酸 1-335 番の部分) を発現するが、前者では野生型と同様に低発現であったのに対し、後者では M-H 同様にタンパク発現が著明に上昇した (Figure 2a and 2b)。

次に、PAX5 の転写標的である BLNK のプロモーター領域にある PAX5 結合配列を組み込んだレポーター遺伝子を用い、ルシフェラーゼアッセイを行った。そのレポーター遺伝子を用い、PAX5 発現ベクターを導入するとルシフェラーゼの発現は約 13 倍に上昇した。ここにさらに M-H 発現ベクターを導入するとルシフェラーゼの発現は約 3 倍まで低下したが、野生型を導入しても発現は低下しなかった (Figure 4a)。融合タンパクはそのタンパク発現量、用量依存的に PAX5 の転写活性を抑制した (Figure 5a)。また、PAX5 が標的とするプロモーターへの融合タンパクの競合的な結合をゲルシフトアッセイで検討したが、PAX5 結合配列への結合は認められず、PAX5 の DNA 結合を阻害したが、野生型と融合タンパクで差は認めなかった (Figure 4c and 4d)。さらにプル

ダウンアッセイを行い、融合タンパクは PAX5 と HDAC4 と直接結合することが示されたが、HDAC1 との結合は示されなかった(Figure 4b and 4e and 6a)。なお、HDAC4 との結合を示した S35 で標識して検出されたバンドの発現量は野生型で標識されたバンドに比べ、約 3.5 倍強かった。HDAC4 によって M-H の PAX5 の転写抑制能が強まること、HDAC1 は強めないこともルシフェラーゼアッセイにて確認した(Figure 6b)。

【考察】

MEF2Dタンパクの発現はMEF2DのC末端側のmRNAを標的とするマイクロRNAにより抑制されること、融合タンパクの高発現は標的mRNAの喪失によるマイクロRNAの制御の破綻によることが示された(Figure 2c)。更なる解析により、マイクロRNAの標的が3'UTRではなくMEF2Dのcoding regionに存在し、その部分に変異を導入することで野生型の発現が上昇し、その部分を含むようにMEF2D部分を延長した融合遺伝子から発現する融合タンパクは低発現になることを確認し、発現を制御する責任マイクロRNA (miR-122) を同定した(Figure 2d and 2e and 3a and 3b)。miR122-5pのマイクロRNA mimicとMEF2Dの発現ベクターを両方同時にトランスフェクションし、miR122-5pにより野生型タンパクが選択的に発現抑制されることを確認した(Figure 3c)。

また、融合タンパクはPAX5の機能障害をきたし、野生型はPAX5の機能障害はきたさない。融合タンパクは高発現であることがPAX5の機能障害には重要であることを示したが、MEF2Dの336番目のアミノ酸を終止コドンに置換し以降のDNAを欠失させた発現ベクターと、MEF2Dのcoding regionにあるmiR-122-5pの標的結合部分に変異を導入した発現ベクターは共に高発現であったが、PAX5の転写活性は抑制しなかった(Figure 5b)。よって高発現になること以外にもPAX5の機能障害に寄与するメカニズムがある可能性が考えられた。そこでHDACとの関係を検討したところ、野生型に比べM-HタンパクはHDAC4への結合親和性が高く、HDAC4がヒストン脱アセチル化酵素としてM-HのPAX5の転写抑制能を強めることが示唆された(Figure 6c)。

従来マイクロRNAと発がんの関わりは、がん遺伝子の作用やマイクロRNA制御因子の異常などが、マイクロRNAの発現を変化させることに伴い、マイクロRNAの標的遺伝子の発現が変化し、結果、細胞に増殖・不死化・分化障害が誘導され、がん化に繋がるというモデルである。本研究で明らかにしたモデルはこれらとは異なるモデルで、融合遺伝子という異常により、その遺伝子自身に対するマイクロRNAの制御の破綻が引き起こされ、その遺伝子自身がコードするタンパクの高発現がおこり、発がんに繋がるというモデルである。このようなモデルの報告は既報でもわずか数例(MYB-NFIB、FGFR3-TACC3など)しか報告がない。今回の現象は微小欠失など他の遺伝子異常でも同様のことが起きている可能性があり、今後がん発症のメカニズムの解明においてより広範に認められる現象になるかもしれない。

【結論】

MEF2D融合タンパクは、染色体転座によってマイクロRNAの制御を回避すること

で高発現が引き起こされる。さらに高発現になったMEF2D融合タンパクはPAX5とHDAC4と直接結合し、PAX5の転写抑制を介してB細胞分化障害をきたすことで、白血病化（ALL）に寄与していることが示唆された。