

研 究 成 果 報 告 書

PR ドメイン欠損型 EVI1/MEL1S 蛋白質発現
による白血病発症機構の解析

課題番号：16590950

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者 西 片 一 朗

宮崎大学 医学部 助手

<はしがき>

本研究課題「PR ドメイン欠損型 EVI1/MEL1S 蛋白質発現による白血病発症機構の解析」は、森下らが行ってきた20年にも及ぶEVI1, あるいはMEL1を原因遺伝子とする難治性白血病に関する一連の研究に連なる検討であり, 多くの類似点をもつ両者に共通する白血病発症機構を解明することが目的である。

1988年, 森下らはマウス白血病におけるウイルス感染による白血病発症機構の解析から, 白血病ウイルスのゲノム挿入により転写活性化した宿主側の遺伝子EVI1 (Ecotropic viral integration site-1) を単離した (Morishita K *et al*, Cell, 1988) (図1A). その後, ヒト白血病において3q21q26症候群におけるt(3;3)(q21;q26), あるいはinv(3)(q21;q26)染色体転座によるEVI1の異常発現を突き止め, ヒト白血病の責任遺伝子候補であることを明らかにした (Morishita K *et al*, PNAS, 1992) (図1B). さらに, これと類似した症状を示す白血病が有するt(1;3)(p36;q21)染色体転座の転座点近傍より異常発現する新規の遺伝子MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) を単離した (Mochizuki N *et al*, Blood, 2000) (図1C). MEL1遺伝子は前出のEVI1遺伝子に高い相同性をもつZinc finger型転写因子であり, EVI1とファミリーを形成していた。このファミリーではいずれの遺伝子にも, N端にPRドメインと呼ばれる機能未知の領域を含む・含まない2通りの発現が可能で, 前出の白血病ではPRを欠くEVI1, あるいはMEL1S(short)が主に発現していた (Nishikata I *et al*, Blood, 2003). 最近, 慶応大学医学部須田らのグループとの共同研究によりEVI1欠損マウスの造血発生過程を解析を行い, EVI1が直接GATA-2遺伝子の発現調節に関与し, 主として二次造血においてGATA-2遺伝子の発現を亢進させ, 造血幹細胞の維持と分化に関与することが明らかになった (Yuasa H *et al*, EMBO J, 2005).

今回, 我々は本研究課題の遺伝子群が高発現している白血病細胞でも同様な制御が存在するか調べた。その結果, EVI1発現に伴いGATA-2遺伝子IS上流6-7kbのEVI1結合DNA配列に直接結合, 転写が促進していた。一方, 顆粒球分化能をもつ骨髓細胞でEVI1が同じDNA配列に結合して転写を抑制しG-CSFによる分化誘導を阻止した。またEVI1と同じく, PRドメインを欠くMEL1S(short)でも分化誘導阻止が起きた。このようなGATA-2遺伝子の発現調節の違いから, 異所性発現したEVI1やMEL1Sによる転写制御の変化が白血病発症につながる共通の機構の存在が明らかとなってきた。

研 究 組 織

研究代表者 : 西片 一 朗 (宮崎大学 医学部 助手)
研究分担者 : 白 神 俊 幸 (宮崎大学 医学部 助手)
研究分担者 : 森 下 和 広 (宮崎大学 医学部 教授)
研究協力者 : 島 原 明 子 (宮崎大学 医学部 大学院生)

交付決定額 (配分額)

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成 16 年度	2, 200, 000	0	2, 200, 000
平成 17 年度	1, 300, 000	0	1, 300, 000
総 計	3, 500, 000	0	3, 500, 000

研 究 発 表

(1) 学会誌

Hiromi Yuasa, Yuichi Oike, Astushi Iwama, Ichiro Nishikata, Daisuke Sugiyama, Archibald Perkins, Michael L Mucenski, Toshio Suda and Kazuhiro Morishita, **Oncogenic transcription factor Evil regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression.** The EMBO Journal, VOL24-N011, 1976-1987, 12 May 2005 (published online).

(2) 口頭発表

西片一朗, 湯浅博美, 尾池雄一, 須田年生, 森下和広. **EVI1/MEL1 遺伝子群による GATA-2 遺伝子調節と白血病発症機構の解析.** 第 66 回日本血液学会総会. 平成 16 年 9 月 17 日.

湯浅博美, 尾池雄一, 岩間厚志, 西片一朗, 須田年生, 森下和広. **Evi1 は GATA-2 の転写を制御して造血幹細胞の自己複製能を制御している.** 第 66 回日本血液学会総会. 平成 16 年 9 月 18 日.

西片一朗, 湯浅博美, 尾池雄一, 須田年生, 森下和広. **EVI1/MEL1 遺伝子群による GATA-2 遺伝子調節と白血病発症機構の解析.** 第 63 回日本癌学会学

術総会. 平成 16 年 9 月 29 日.

西片一朗, 島原明子, 森下和広. EVI1 遺伝子群による GATA-2 遺伝子発現制御と白血病発症機構の解析. 厚生労働省がん研究班会議「造血器腫瘍における染色体転座関連遺伝子の基礎的・臨床的研究. 平成 17 年 10 月 28 日.

(3) 出版物

特になし.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし.

PR ドメイン欠損型 EVI1/MEL1S 蛋白質発現による白血病発症機構の解析

染色体異常（転座や欠失等）はヒトがんにおける発症機構に本質的な役割を演じていると考えられる (Rabbitts TH et al, *Nat*, 1994; Mitelman F et al, *Nat Gen*, 1997). 近年, 科学技術の進展に伴い, ヒト白血病の染色体異常に関するゲノム解析が進み、染色体切断点（転座点）またはその近傍から数多くの原因遺伝子候補が単離同定された。特に急性白血病ではその70%近くが転写因子であることが判明した (Look TA et al, *Science*, 1997). 転写因子の発現異常は細胞内環境を直接変化させ, 血球細胞の分化増殖機構に異常をもたらすと考えられ, 転写因子による遺伝子制御機構の解析が重要である。本研究課題であり, t(3;3)(21;26)あるいはinv(3)(q21q26)染色体転座をもつ急性骨髄性白血病 3q21q26症候群において, その転座点近傍に存在し顕著に活性化している zinc-finger 型転写因子 EVI1 (Ecotropic viral integration site-1) も (図1B), 同じくt(1;3)転座を有する急性骨髄性白血病(AML)細胞の転座点近傍から我々が単離した新規の zinc-finger 型転写因子である MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) (図1C) も, 1p36.3, 3q26と染色体上での存在が異なるにも関わらず, アミノ酸配列で64%, 2つあるDNA結合ドメイン(DBD1およびDBD2)ではそれぞれ 80%, 98%と極めて高い構造上の同一性(図2A)や機能上の同一性(図2B)が判明し, さらに各遺伝子が関連する白血病の病態上の類似性 (表1) から, 両者に共通した白血病発症機構の存在を示唆する結果(Mochizuki N et al, *Blood*, 2000; Nishikata I et al, *Blood*, 2003)を我々は得ており, この発症機構の解明は重要である。また両遺伝子とも, N端領域にPR ドメインを含むPRドメイン蛋白質(PRDM)ファミリーの構成員であり, PRドメイン(PR)は Chromatin remodeling に関わる蛋白質間相互作用やメチル基転移酵素活性に重要とされるSETドメインのスーパーファミリーに属し, 転写制御に関与するといわれており, PRドメインを有するRIZ1はがん抑制遺伝子, PRドメインを欠くEVI1遺伝子のがん遺伝子として機能することが推察されている。PRドメイン蛋白質には, alternative splicingにより, PRD+とPRD-の2種類の転写産物が発現することが知られており, RIZ遺伝子にRIZ1(PRD+)とRIZ2(PRD-), EVI1遺伝子にもMDS1/EVI1(PRD+)とEVI1(PRD-)とそれぞれ2種類が発現している。MEL1遺伝子にも2種類の転写産物が存在することがこれまでの我々の検討で判明しており, EVI1とMEL1(S), それぞれ関連した白血病ではPRD-型蛋白質が主に発現していたことから, PRドメインの有無による機能的差異と白血病化の関係を明らかにすることも重要である。さらにEVI1では一部の報告(Morishta K et al, *Oncogene*, 1995)を除き, 転写抑制因子としての側面ばかりが強調されてきた(Bartholomew C et al, *Oncogene*, 1997; Lopingco MC et al, *Curr Top Microb*

iol Immunol, 1996). その理由のひとつは、今までEVI1が実際に特異的なDNA配列に直接結合して発現活性化するような標的遺伝子の存在がほとんど知られていなかったためと考えられる. 今回、我々は須田らのグループと行ったEVI1欠損マウスの造血発生の解析(Yuasa H et al, *EMBO J*, 2005) (図3)に端を発する一連の解析により、新規に標的遺伝子GATA-2を発見したことを報告する.

EVI1の強制発現によりGATA-2遺伝子ISエクソンからの転写を活性化した.

EVI1欠損マウスの解析から、(1)胎生10.5日で出血死すること、(2)2次造血における造血幹細胞数の激減、並びにこれに伴う血管新生の異常が見られたこと、(3)造血幹細胞のGATA-2遺伝子発現が著しく低下していたことが判明した(Yuasa H et al, *EMBO J*, 2005) (図3). 造血系において、GATA-2は幹細胞の維持・増殖に必須の因子と言われている. 白血病細胞に見られる未分化性の維持も、異所性発現したEVI1が標的遺伝子GATA-2の発現を活性化していることが原因かもしれない. これを検証するため、EVI1をマウス造血前駆細胞EMLC1に強制発現させ、GATA-2遺伝子の発現を観察することにした. GATA-2遺伝子には、IS(specific)とIG(general)、2つの第1エクソンが存在する. 前者は造血組織や神経組織で特異的に、後者は組織全般に発現していると言われており、発現を識別する必要がある. GATA-2 ISとGATA-2 IGを区別するため、峰岸らが用いたプライマー(Minegishi et al, *Blood*, 1998)でRT-PCR解析を行った(図4A). 結果は図4Bに示した通り、EVI1の発現に伴ってGATA-2の発現も増加した. この発現増加は造血系特異的なGATA-2 ISエクソンからの発現に対応するものであり、GATA-2 IGの増減はほとんどなかった. 今後、GATA-2 ISエクソンに注目することにした.

GATA-2 IS領域上流7kb内に複数個のEVI1結合配列を同定した.

GATA-2 ISエクソンの上流領域のEVI1結合DNA配列の有無を調べた. EVI1結合DNA配列には、D1-CONS(GACAAGATAAGATAA)とD2-CONS(CTCATCTTC)の2つがあり、転写因子の、GATAとEts、それぞれ似ている. 図5Aに示したように、候補となるD1-CONSは4箇所(a, b, c, d)あり、D2-CONSは8箇所(e, f, g, h, i, j, k, l)であった. さらにEMSA法によりそれぞれの箇所を精査したところ、D1-b、並びにD2-f, g, h, j, lの6箇所が結合可能であった(図5B, 5C). これらの結合可能な箇所はGATA-2 ISエクソンの上流領域0~7kbの広い範囲に分布していた.

GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 6 – 7 k b の範囲に EVI1 により活性化する領域が存在する.

GATA-2 IS エクソンの上流領域に分布する結合可能な D1-b, 並びに D2-f, g, h, j, l の 6 箇所のうち, TA-2 遺伝子の発現活性化に関係する領域を同定するため, 長さの異なる GATA-2 IS エクソンの上流領域をホタル・ルシフェラーゼに繋いだレポーター遺伝子 (pGL3-B, 同 B1.6kb, 同 B3.3kb, 同 B6.0kb, 同 B7.0kb) を構築した (図 6A). EVI 1 を発現させたマウス造血先駆細胞 EML C1 で, レポーターアッセイを行ったところ, 図 6B の通り, GATA-2 IS エクソンの上流 6kb から 7kb に架けて急激に活性が強まった. この 6-7kb の範囲に, GATA-2 遺伝子の発現活性化に関わる箇所が存在することが考えられた. この範囲には結合が可能な D1-b と D2-f が含まれているので (図 5A), それぞれ点変異体を作製して更に検討したところ, D1-b 点変異体で活性が一挙に下がったが, D2-f 点変異体にはほとんど変化がなかった. ヒト赤白血病細胞 HEL でも, ほぼ同様の結果を得た (図 6C). 少なくとも, D1-b を含む, GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 6-7kb の範囲に, EVI1 により活性化する領域が存在する.

EVI1 は GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流に存在する D1-b を含む領域と特異的に結合する.

GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 6-7kb に存在する D1-b に EVI1 は, 実際に結合しているのかどうか EVI1 特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により, マウス造血前駆細胞 EML C1 を調べた. その結果, EVI1 特異抗体を添加した D1-b (EMSA+) では PCR の特異バンドを検出できたが, 非特異抗体 (NRS) 添加時, 対照とした D1-a (EMSA-) では何も検出されなかった. EVI1 は GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流に存在する D1-b を含む領域と特異的に結合することがわかった.

GATA-2 転写活性化には第 1 DNA 結合ドメイン, 並びに C 末端酸性アミノ酸集中領域が重要である.

EVI1 蛋白質のドメイン構造のうち, GATA-2 遺伝子の転写活性化に必須な領域は何処なのか, EVI1 欠失変異体を構築して (図 8 左), これを用いたレポーターア

ッセイを行った。レポーター遺伝子には GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 7kb まで含む pGL3-B7.0 を用いた。図 8 右に示したように、第 1 DNA 結合ドメインを欠く変異体で、活性がほとんど無くなった。現在、GATA-2 遺伝子の発現活性化に寄与していると考えられる D1-f はこの DNA 結合ドメインに特異的な DNA 配列である。また C 末端領域を欠く変異体でも、活性がなくなった。この領域は酸性アミノ酸が集中する特徴的な領域だが、今のところ、理由は不明である。

EVI1 高発現白血病細胞において、更なる EVI1 の強制発現により GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 7kb までを含むレポーター遺伝子の発現が亢進した。

実際に EVI1 を高発現している白血病細胞で、GATA-2 遺伝子の発現活性化は起きているのか調べるため、マウス EVI1 高発現白血病細胞株 NSF58 および同 M1S2、並びにヒト EVI1 高発現白血病細胞株 MOLM1 に EVI1 を強制発現させ、GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 7kb まで含む pGL3-B7.0 でレポーターアッセイを行った。結果は図 9A(NSF58)、図 9B(M1S2)、図 9C(MOLM1)の通り、若干バックグラウンドに違いが見えるが、いずれも、EVI1 の強制発現により、数倍程度の活性増加が認められた。すなわち、EVI1 高発現白血病細胞での更なる EVI1 強制発現により GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 7kb まで含むレポーター遺伝子の発現が亢進した。

マウスおよびヒト EVI1 高発現白血病細胞株では、GATA-2 遺伝子の転写活性が見られた。

GATA-2 遺伝子そのものの発現は EVI1 高発現白血病細胞株でどのようになっているのか RT-PCR を用い、EVI1 非発現白血病細胞株と比較解析した。マウス白血病細胞株の場合、EVI1 発現の有無に関わらず、GATA-2 遺伝子が発現していることがわかった(図 10A)。少なくとも、EVI1 が GATA-2 遺伝子の発現を抑制する兆候は認められなかった。一方、ヒト白血病細胞株の場合、やはり EVI1 発現の有無に関わらず、GATA-2 遺伝子が発現しているが、EVI1 が高発現している細胞で、GATA-2 遺伝子の転写活性化がやや強い(図 10B)。引用した高屋敷らのデータでは(Ohyashiki et al, *Blood*, 1995)、プライマリー検体でも、EVI1 高発現白血病細胞で GATA-2 遺伝子の転写活性化が見られている。

EVI1 siRNA 導入ヒト EVI1 高発現白血病細胞株 UCSD/AML では増殖が抑制され、GATA-2 の発現が著しく低下した。また EVI1 アンチセンス導入 EVI1 高発現白血病細胞 MOLM1 でも、細胞の増殖速度が顕著に低下した。

EVI1 高発現白血病細胞を EVI1 siRNA で一過性に処理した場合、白血病細胞の細胞増殖パターンや GATA-2 のような、EVI1 標的遺伝子の発現パターンはどのように変わるのか、ヒト EVI1 高発現白血病細胞株 UCSD/AML1 とヒト EVI1 非発現白血病細胞株 HL60 とで比較した。EVI1 siRNA は Dharmacon 社に外注、白血病細胞への導入には Nucleofector system (amaxa biosystems/Wako) を使用した。EVI1 高発現白血病細胞株 UCSD/AML1 の場合、EVI1 siRNA 処理後 2-3 日目かけて、対照よりおよそ 1 日程度の細胞増殖の遅延が認められた。これに対して、EVI1 非発現白血病細胞株 HL60 では、ほとんど差が認められなかった(図 11A)。一方、EVI1 siRNA 処理後 2 日目(48hr)で細胞を回収、RT-PCR で発現を解析した。EVI1 高発現白血病細胞株 UCSD/AML1 では EVI1 の著しい発現低下とともに、GATA-2 の発現も大きく下がったが、EVI1 非発現白血病細胞株 HL60 ではまったく変化はなかった(図 11B)。またヒト EVI1 高発現白血病細胞株 MOLM1 に EVI1 アンチセンスを導入したところ、細胞増殖速度の著しい低下が認められた。

EVI1 はヒストンアセチル基転移酵素 PCAF と相互作用したが、p300, CBP とは相互作用しなかった。

今回の検討の中で、転写因子である EVI1 によって GATA-2 遺伝子の転写活性化が認められた。転写活性化には、標的遺伝子周辺におけるヒストンのアセチル化や転写因子自身のアセチル化、更にはアセチル基転移酵素との相互作用が必須と言われている。代表的なヒストンアセチル基転移酵素、p300 および CBP, PCAF について、基本となる相互作用の有無を確認するため、サル腎細胞株 COS7 で、タグ抗体や特異抗体を用いた免疫沈降法で解析した。結果は図 12 に示した。すなわち、COS7 の中で、EVI1 は PCAF とは相互作用したが、p300, CBP とは反応を見出すことができなかった。EVI1 には PCAF によるアセチル化と、これによる転写活性化の機構が想定される。

MEL1S はその導入により、IL-3 依存性骨髓細胞株 L-G3 に対して分化抑制能を示した、

EVI1 は、その過剰発現により、G-CSF が誘導する 32Dc13 骨髄細胞の分化を阻止したと森下らは報告した (Morishita et al, *Mol Cell Biol*, 1992) が、新規の zinc finger 型転写因子である MEL1S の分化誘導阻止活性については、まだよくわかっていないことが多い。IL-3 依存性骨髄細胞株 L-G3 も、G-CSF による誘導で顆粒球に分化するという表現型をとる (図 13A)。MEL1 (PRD+)、MEL1S (PRD-) を挿入した pLXSN ウイルスベクターを用いて L-G3 に安定導入できた結果、MEL1 (PRD+) および MEL1S (PRD-) の蛋白質発現を確認できた (図 13B)。MEL1S を安定発現する L-G3 細胞のみ G-CSF 存在下で増殖を維持、アポトーシス抵抗性を示した (図 13C)。また G-CSF による分化誘導を受けず、顆粒球の核染色像を示さなかった (図 13D) ばかりでなく、顆粒球の分化マーカー MPO の発現も認められなかった (図 13E)。

MEL1S を導入した L-G3 骨髄細胞株では TSA 存在下で G-CSF により誘導される細胞分化を回復し、MEL1S による分化抑制能に脱アセチル化が関与することが示唆された。

骨髄細胞で示された MEL1S の分化抑制能が転写因子の働きに依存するとしたら、転写活性化なのか？ 転写抑制なのか？ まず、HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) での処理を試みた。MEL1、あるいは MEL1S 安定発現 L-G3 骨髄細胞の分化の程度を核形の違いから分類、細胞数をカウントした (図 14A)。その結果を図 14B にまとめた。G-CSF による細胞分化に抵抗性を示した MEL1S 安定発現 L-G3 骨髄細胞も、TSA の添加により、G-CSF に対する感受性が回復し、分化誘導が成立した。したがって、TSA が働く HDAC そのもの、あるいはその HDAC も参加する転写抑制活性こそが分化抑制能の本体かもしれない。

MEL1S 導入細胞株と同様、MEL1S AS 変異体導入骨髄細胞株は G-CSF 存在下で増殖を続けた。CtBP との相互作用は MEL1S の分化阻止能に必須ではない。

MEL1S が示した分化阻止能の本体が転写抑制活性であるなら、CtBPこそ重要な転写抑制コファクターではないのか？ MEL1S には、典型的な CtBP 結合モチーフが 2 箇所 抑制領域 (RD) にある (図 15A)。この結合モチーフを通じて HDAC との相互作用を仲介している可能性があるため、このモチーフに関する点変異体 (MEL1S AS) を作製した。変異を確認するため、CtBP との相互作用を免疫沈降法

でみたところ、この変異体は CtBP との反応性を失っていた(図 15B)。しかしながら、この変異体(MEL1S AS)を安定導入した L-G3 骨髄細胞は、変異のない MEL1S と同様、G-CSF 存在下で細胞増殖してアポトーシス抵抗性を示した(図 15C)。MEL1S は CtBP を介することなく、HDAC と相互作用できるのかもしてない。CtBP 結合能を失った変異体(MEL1S AS)も含め、HDAC1, HDAC2, HDAC3 との相互作用を調べた。その結果、正常でも、変異体であっても相互作用した。CtBP との反応の有無に関わらず反応した(図 15D)。HDAC2 でも、HDAC3 でも結果は同じだった(Data not shown)。CtBP との相互作用は MEL1S の分化抑制能にとって必須ではないのかもしれない。

MEL1S 導入により、L-G3 細胞では GATA-2 遺伝子の発現が低下した。

G-CSF による分化誘導を阻止する MEL1S。この MEL1S を安定発現する IL-3 依存性骨髄細胞株 L-G3 を DNA マイクロアレーで解析した。その結果は図 16A に示した。Up95 遺伝子、Down47 遺伝子。Down した遺伝子の中に、MPO と GATA-2 が含まれていた。顆粒球の分化マーカーである MPO の発現低下と MEL1S による分化誘導阻止は、矛盾の無い関係であると考えられる。一方、GATA-2 の発現低下がどうか？ GATA ファミリー(GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, GATA-5, GATA-6)のうちでも、発現低下が顕著なのは、GATA-2 のみである(図 16B)。この結果に従い、MEL1S 安定発現細胞で RT-PCR 解析を行い、GATA-2 発現低下を確認した(図 16C)。EVI1 安定発現細胞でも、同様の結果であった(図 16D)。

ま と め

各種白血病細胞を用いて EVI1、並びに MEL1S(short; PRD-)による GATA-2 遺伝子の発現調節と白血病発症機構との関係を検討した。EML-C1 や HEL において EVI1 発現に伴う GATA-2 遺伝子 IS エクソンからの転写促進、逆に L-G3 においては同領域に転写抑制が見られた。EML-C1, HEL における転写は GATA-2 IS 領域上流 6-7kb に存在する EVI1 結合 DNA 配列に直接結合することにより活性化した。EVI1 の第一 DNA 結合ドメイン及び C 末側に存在する酸性アミノ酸領域欠失変異体により GATA-2 プロモーター活性が失われた。この活性化には EVI1 とヒストンアセチル化酵素 PCAF との相互作用、EVI1 のアセチル化が関与することが示唆された。逆に、L-G3 では同じ領域に EVI1 が結合することで転写が抑制された。L-G3 における EVI1 遺伝子の発現は G-CSF による細胞分化抑制能を持つ。この細

胞分化抑制能はトリコスタチン A の添加により回復するため、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の関与による EVI1 遺伝子の転写抑制が関係している。また L-G3 に関する同様の結果から、MEL1S 高発現白血病細胞にも MEL1S に依存した GATA-2 の発現調節機構の存在が示された。さらに NFS58 及び MOLM1 でも、GATA-2 IS 領域上流 6-7kb に存在する EVI1 結合 DNA 配列を含むレポーター遺伝子で、GATA-2 の転写活性化が認められた。以上、白血病細胞における EVI1/MEL1S に依存した GATA-2 の発現調節に違いが見られたことから、EVI1/MEL1S の異所性発現による転写制御の変化が白血病発症につながることを示唆された。

今 後 の 展 開

EVI1 が PCAF によりアセチル化修飾を受けたのち、GATA-2 の転写を活性化して白血病細胞の状態維持に寄与することが示唆されたことから、今後、PCAF との相互作用部位およびアセチル化部位の同定、アセチル化 EVI1 による GATA-2 転写活性化機構、さらに GATA-2 高発現による白血病発症機構を検討する。一方、EVI1 は HDAC との相互作用により GATA-2 の転写を抑制して分化阻止能に関係することも示唆されたことから、MEL1S とともに、転写抑制の検討を継続する。

参 考 文 献

1. Morishita, K., Parker, D.S., Mucenski, M.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ihle, J.N. : Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell*. 54:831-840 (1988).
2. Morishita, K., Parganas, E., William, C.L., Whittaker, M.H., Drabkin, H., Oval, J., Taetle, R., Valentine, M.B., Ihle, J.N. : Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3937-3941 (1992).
3. Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, T., Taniwaki, M., Yokota, J., Morishita, K. : A novel gene *MEL1*, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the *MDS1/EVI1* gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*. 96:3209-3214 (2000).

4. Nishikata, I., Sasaki, H., Iga, M., Tateno, Y., Imayoshi, S., Asou, N., Nakamura, T., Morishita, K. : A novel *EVII* gene family, *MEL1*, lacking a PR domain (*MELIS*) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. *Blood*. 102:3323-3332 (2003).
5. Yuasa, H., Oike, Y., Iwama, A., Nishikata, I., Sugiyama, D., Perkins, A., Mucenski, M., Suda, T., Morishita, K. : Oncogenic transcription factor *Evi1* regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO. J.* 24:1976-1987 (2005).
6. Rabbitts, T.H. : Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372:143-149 (1994).
7. Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, B. : A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet.* 15(Spec.No.):417-474 (1997).
8. Look, A.T. : Oncogenic transcription factors in human acute leukemias. *Science*. 278:1059-1064 (1997).
9. Morishita, K., Suzukawa, K., Taki, T., Ihle, J.N., Yokota, J. : Evi-1 zinc finger protein works as a transcriptional activator and via binding to a consensus sequence of GACAAGATAAGATAN₁₋₂₈CTCATCTTC. *Oncogene*. 10:1961-1967 (1995).
10. Bartholomew, C., Kilbey, A., Clark, A.M., Walker, M. : The Evi-1 proto-oncogene encodes a transcriptional repressor activity associated with transformation. *Oncogene*. 14:569-577 (1997).
11. Lopingco, M.C., Perkins, A.S. : Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:211-222 (1996).
12. Delwel, R., Funabiki, T., Kreider, B.L., Morishita, K., Ihle, J.N. : Four of the seven zinc fingers of the Evi-1 myeloid-transforming gene are required for sequence-specific binding to GA(C/T)AAGA(T/C)AAGATAA. *Mol. Cell Biol.* 13:4291-4300 (1993).
13. Funabiki, T., Kreider, B.L., Ihle, J.N. : The carboxyl domain of zinc fingers of the Evi-1 myeloid transforming gene binds a consensus sequence of GAAGATGAG. *Oncogene*.

9:1575-1581 (1994).

14. Minegishi, N., Ohta J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel J.D., Yamamoto M. : The mouse *GATA-2* gene is expressed in the Para-Aortic Splanchnopleura and Aorta-Gonados and Mesonephros region. *Blood*. 93:4196-4207 (1999).
15. Ohyashiki, H.J., Ohyashiki, K., Shimamoto, T., Kawakubo, K., Fujimura, T., Nakazawa, S., Toyama, K. : Ecotropic virus integration site-1 gene preferentially expressed in post-myelodysplasia acute myeloid leukemia: possible association with GATA-1, GATA-2, and stem cell leukemia gene expression. *Blood*. 85:3713-3718 (1995).
16. Morishita, K., Parganas, E., Matugi, T., Ihle, J.N. : Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor.. *Mol. Cell Biol*. 12:183-189 (1992).

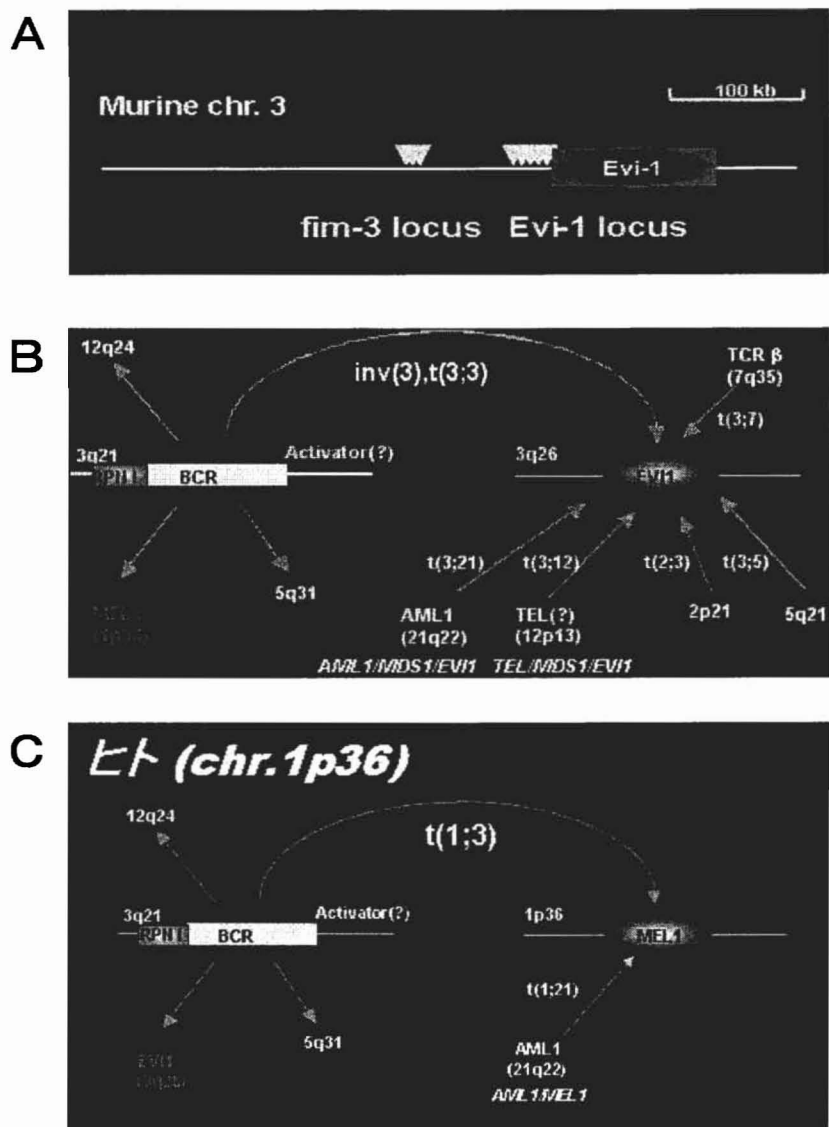


図1 EVI1とMEL1は白血病の責任遺伝子である。

- A : マウスEvi-1 (Ecotropic viral integration site-1), マウス白血病ウイルス感染由来骨髄性白血病の原因遺伝子. ウイルスの挿入により活性化する宿主側因子. (Morishita et al Cell, 1988)
- B : ヒトEVI1, Evi-1ヒト型ホモログ. Chr3q26に染色体異常を有する骨髄性白血病の原因遺伝子. (Morishita et al, PNAS, 1992)
- C : ヒトMEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1), 1p36に染色体異常を有する骨髄性白血病の原因遺伝子. (Mochizuki et al, Blood, 2000; Sakai et al, Genes Chromosomes Cancer, 2005)

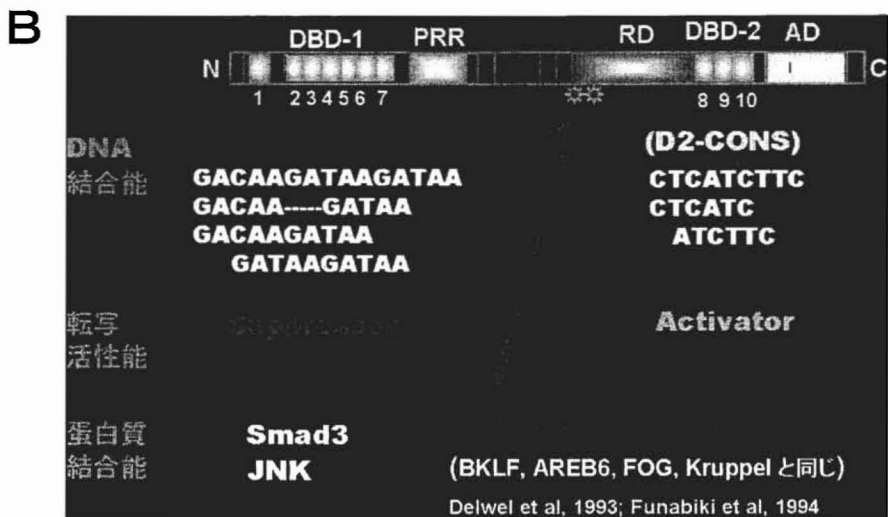
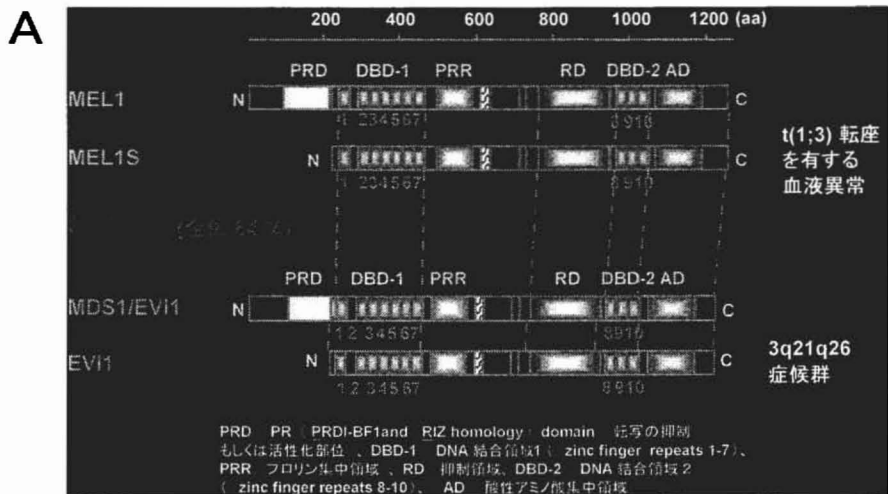


図2 EVI1とMEL1は同じ転写因子群のメンバーである。

A : EVI1とMEL1、その遺伝子産物のドメイン構造は酷似している。

B : EVI1とMEL1、転写因子としての機能は極めてよく似している。

臨床病態	EVI1	t(1;3)転座を有する血液異常
責任遺伝子 染色体異常		MEL1S 5番染色体欠失
病型	7番染色体欠失 骨髄異形成症候群での発症が多い 急性骨髄性白血病(M0-7)に移行	骨髄異形成症候群での発症が多い 急性骨髄性白血病(M1, M4)に移行
造血系異常	巨核芽球形態異常 血小板増多	巨核芽球形態異常 血小板増多
経過	化学療法に不反応性 短期間に死亡	化学療法に不反応性 短期間に死亡
頻度	3~5%	1%以下

表1 EVI、並びにMEL1が関係する白血病.

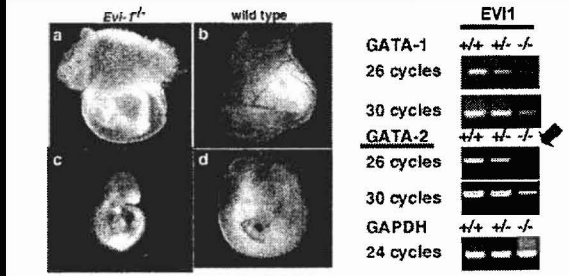
t(1;3)転座を有する急性骨髄性白血病はEVI1を高発現している3q21q26症候群と似ている. t(1;3)転座白血病ではEVI1のようにPRドメインを欠くMEL1S(short)が主に発現している.

A

EVI1 欠損マウスの解析

1. 胎生10.5日、出血死する。
2. 二次造血における造血幹細胞数の低下、それに伴う血管新生の異常が見られた。
3. 造血幹細胞のGATA-2 遺伝子発現が低下していた。

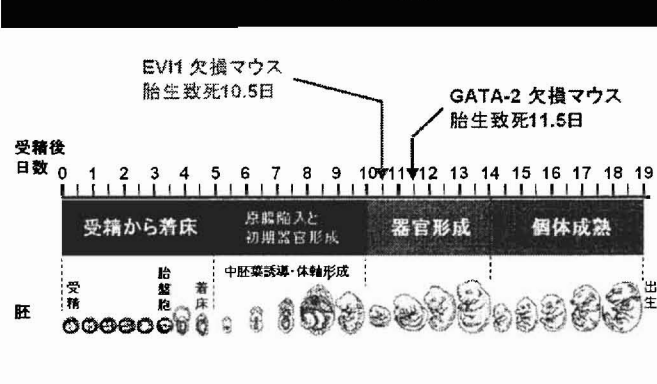
GATA-2 遺伝子は EVI1 の標的遺伝子の一つではないか？



(Yuasa et al, 2004)

B

マウスの発生過程



C

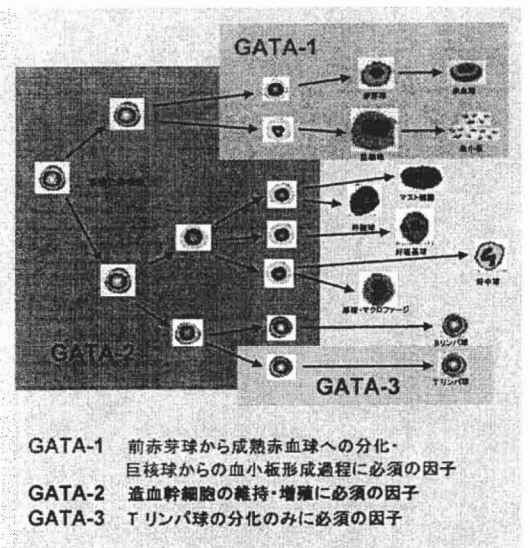


図3 GATA-2遺伝子はEVI1の標的遺伝子のひとつか？

- A : EVI1はGATA-2の転写を制御して造血幹細胞の自己複製能を制御している。
- B : EVI1欠損マウスは、胎生致死である。
- C : GATA-2は造血幹細胞の維持・増殖に必須の因子である。

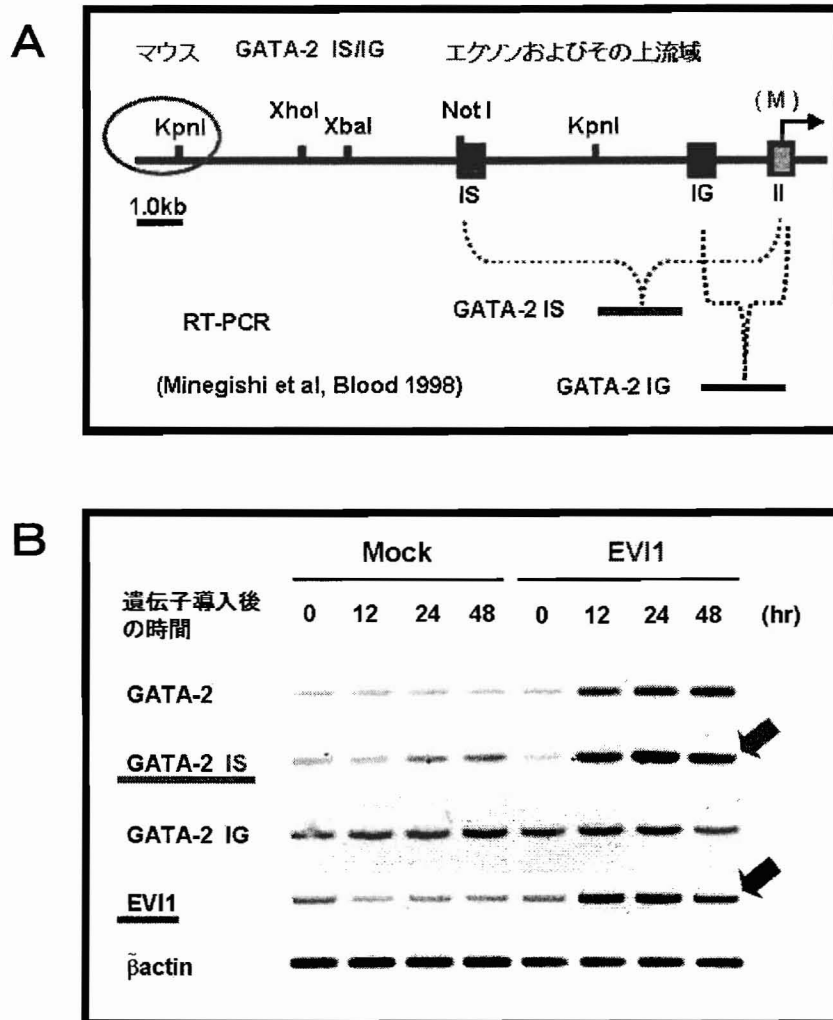


図4 EVI1の強制発現により、GATA-2遺伝子ISエクソンからの転写が活性化した。

A : GATA-2 ISは造血組織や神経組織で、IGは組織全般に発現している。

B : EVI1をマウス前駆細胞EMLC1で強制発現させ、両エクソンの発現をRT-PCRで比較した。PCRバンドのサイズは、Gata-2:268bp, Gata-2IS:238bp, Gata-2IG:287bp, Evi-1:507bp, b-Actin:203bp

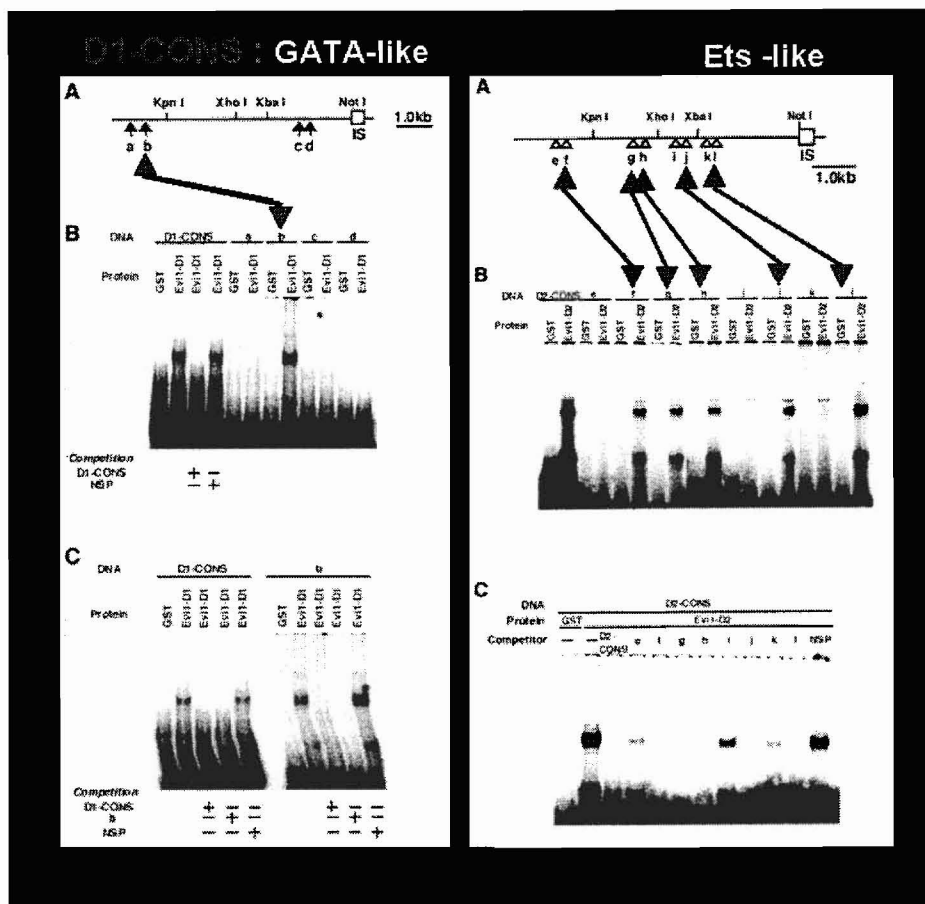


図5 GATA-2IS領域上流7kb内に複数個のEVI1結合DNA配列を同定した。

- A : GATA-2IS上流のEVI1結合DNA配列の位置. EVI1結合DNA配列はD1-CONSとD2-CONSの2種類がある.
- B : GST-DNA結合ドメイン(EVI1-D1/EVI1-D2)を用いたEMSA解析.
- C : EVI1結合DNA配列(D1-CONS/D2-CONS)を用いた特異性の確認.

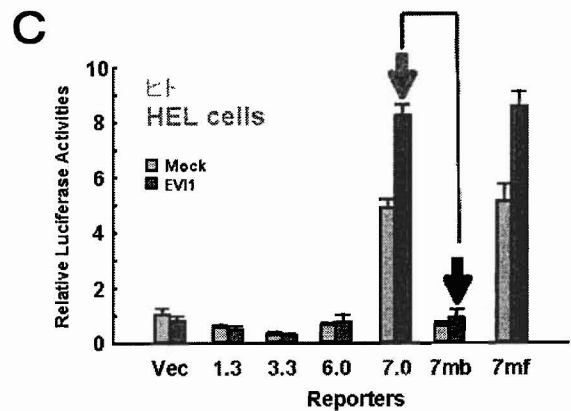
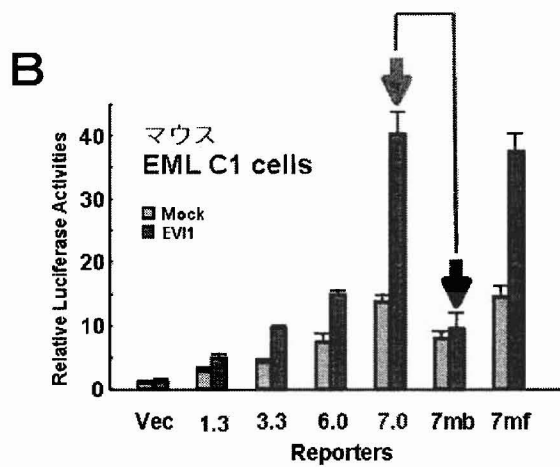
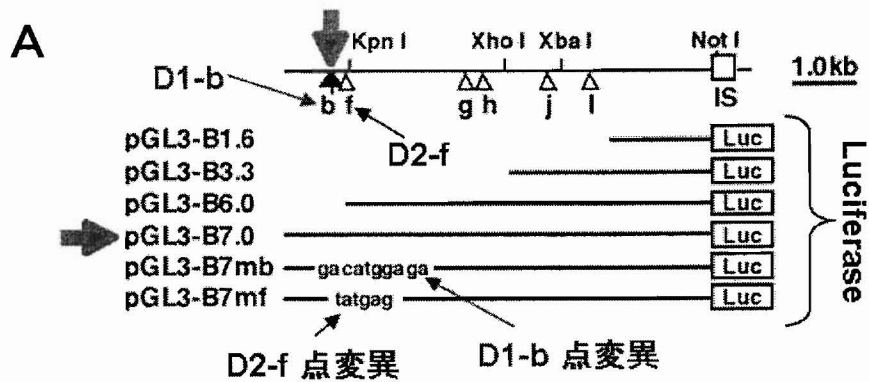


図6 GATA-2遺伝子ISエクソン上流6-7kbの範囲にEVI1により活性化される領域が存在する。

A : GATA-2ISエクソン上流を含むレポーター遺伝子の構造。

B : EVI1を一過性に導入したマウス血液前駆細胞 EML C1の場合。

Vecは空の、他は上記のレポーター遺伝子。

C : 同じく、ヒト赤白血病細胞 HELの場合。

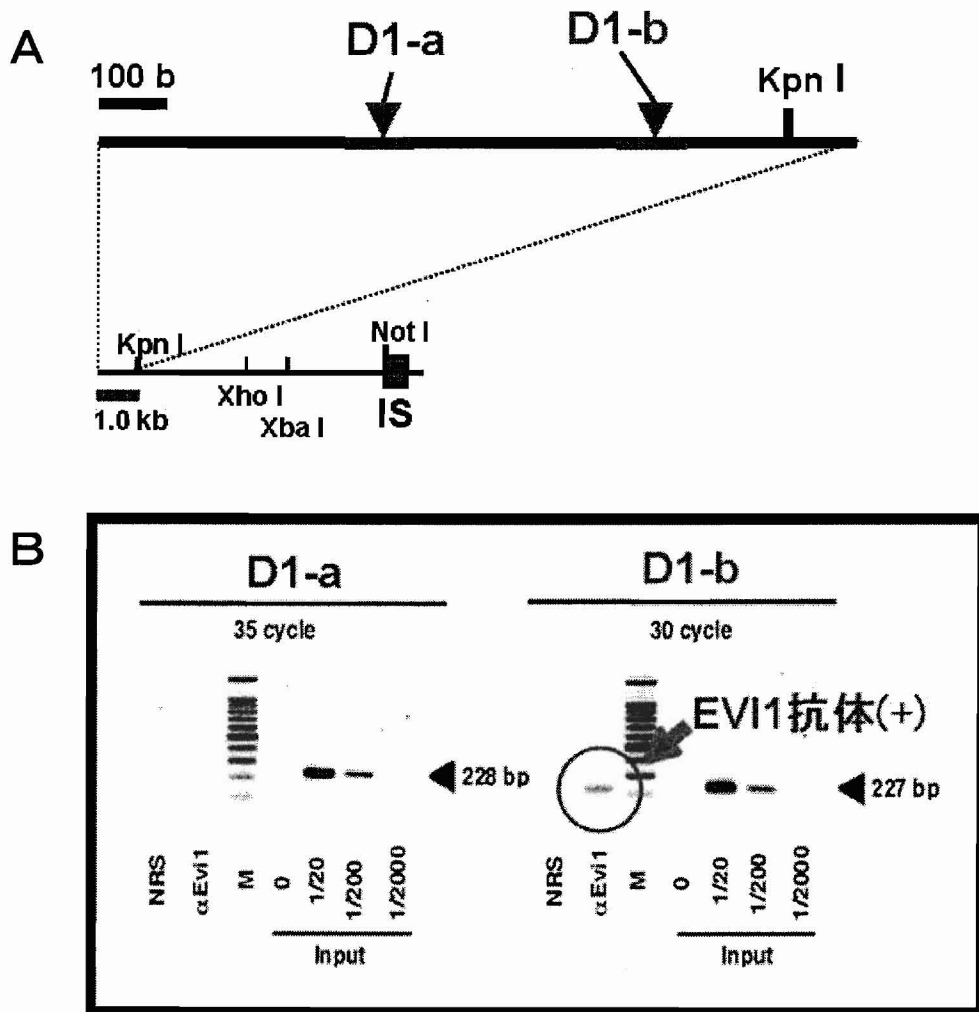


図7 EVI1はGATA-2遺伝子ISエクソン上流6-7kbに存在するD1-bを含む領域と特異的に結合する。

- A : GATA-2遺伝子ISエクソン上流6-7kbに存在するD1-a (EMSA-) とD1-b (EMSA+) を含む領域
 B : マウス血液前駆細胞 EML C1をEVI1特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法で解析した。

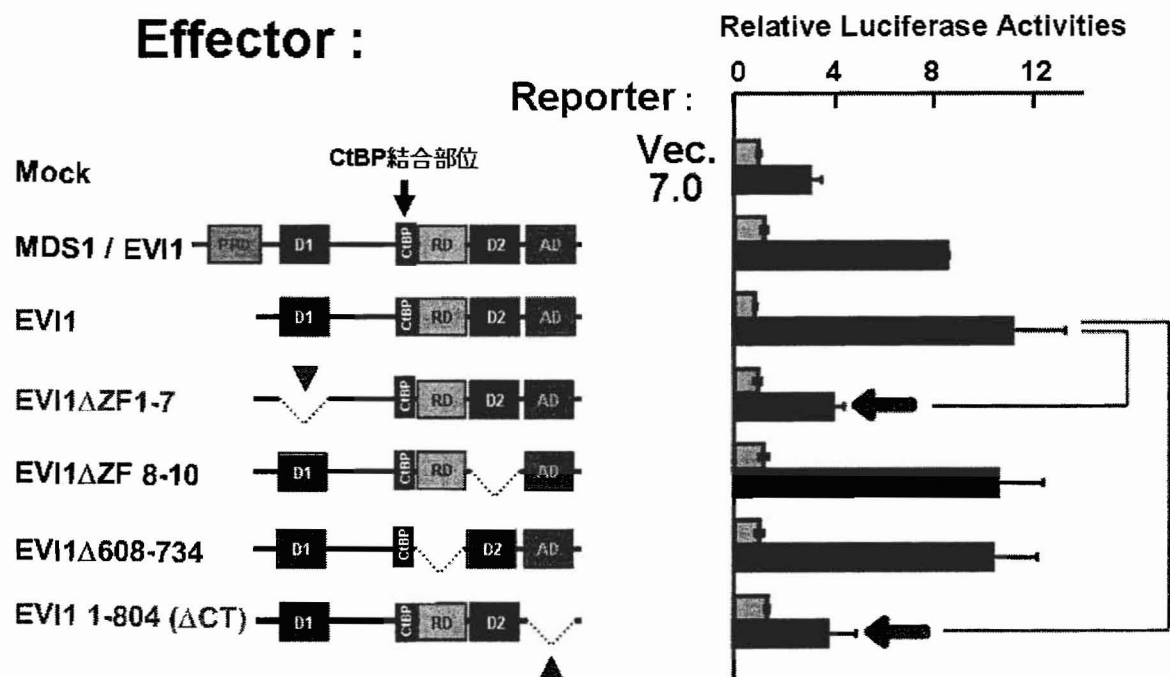


図8 GATA-2 転写活性化には、第1 DNA 結合ドメイン及びC末端酸性アミノ酸集中領域が重要であった。

EVI1欠失変異体を導入したマウス血液前駆細胞EML C1を用い、レポーター解析を行った。PRD：PRドメイン，D1：第1 DNA結合ドメイン，RD：抑制領域，D2：第2 DNA結合ドメイン，AD：C末端酸性アミノ酸集中領域。

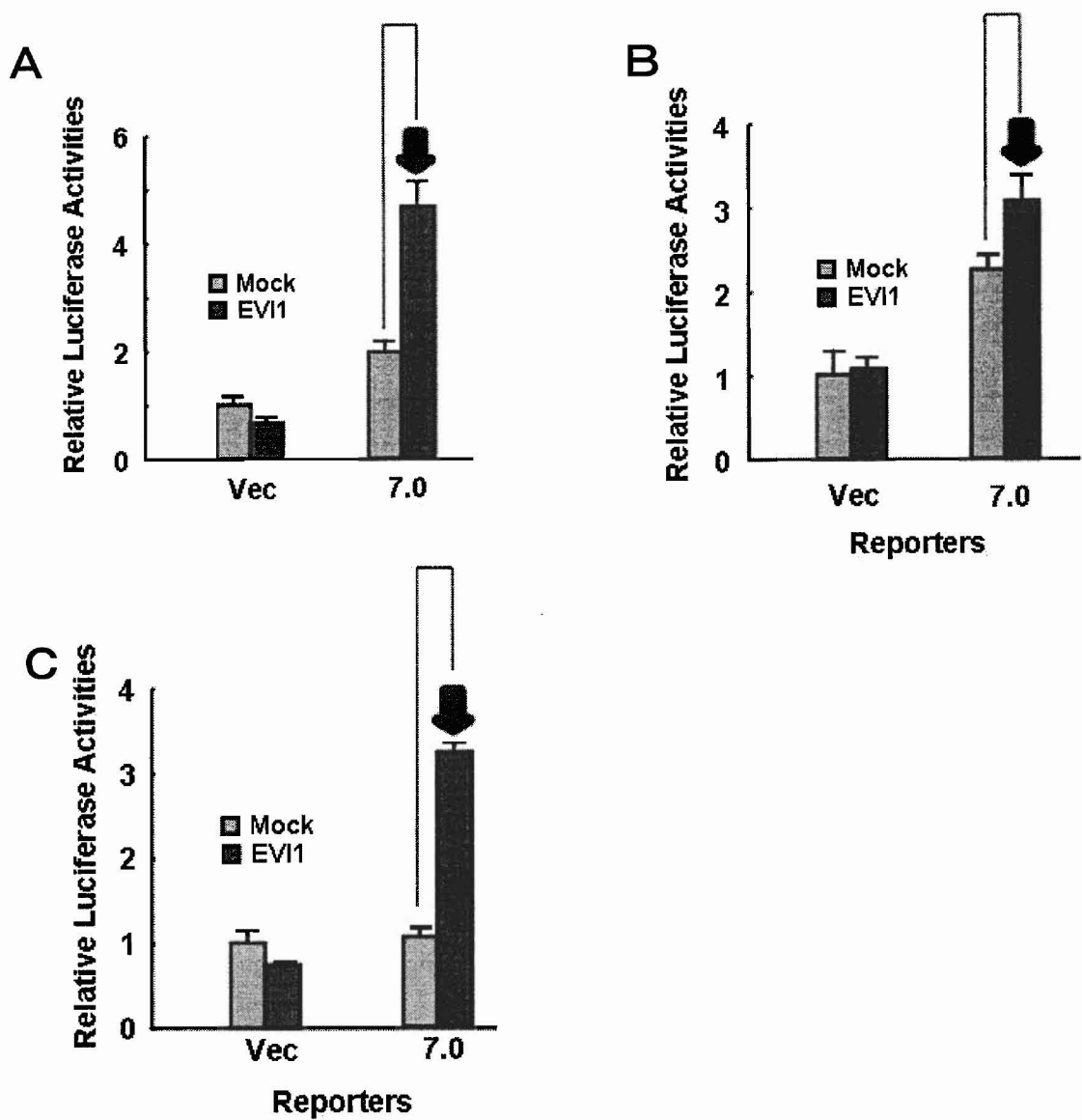


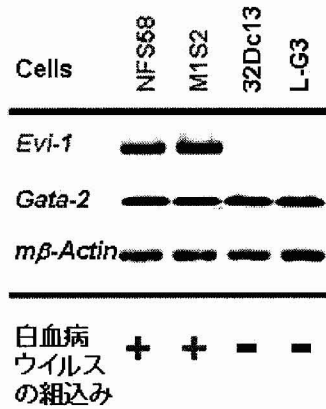
図9 EVI1高発現白血病細胞において、更なるEVI1の強制発現により、GATA-2遺伝子ISエクソン上流7Kbまでを含むレポーター遺伝子の発現が亢進した。

A : EVI1を一過性に導入したマウスEVI1高発現白血病細胞 NFS58.

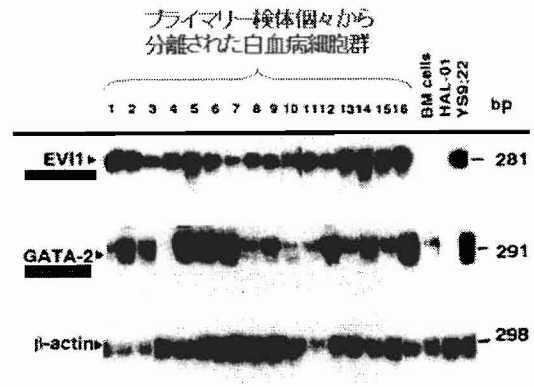
B : 同じく、マウスEVI1高発現白血病細胞 M1S2.

C : 同じく、ヒトEVI1高発現白血病細胞 MOLM1.

A マウス白血病細胞株



C 白血病細胞群



(Ohyashiki et al, Blood 1995)

B ヒト白血病細胞株

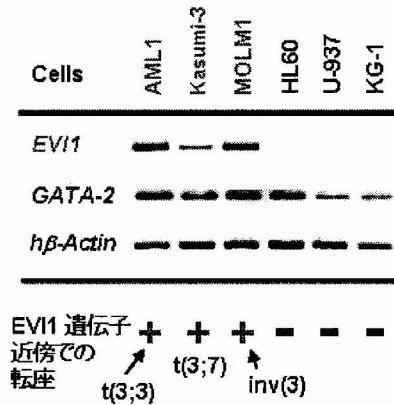


図 10 マウスおよびヒトEVI1高発現白血病細胞株では、GATA-2遺伝子の転写活性化が見られた。

- A : マウスEVI1高発現および非発現細胞株に関するGATA-2発現RT-PCR解析。
Evi-1(507bp), Gata-2(168bp), mβ-Actin(203bp)
- B : ヒトEVI1高発現および非発現細胞株での同解析。
EVI1(508bp), GATA-2(291bp), hβ-Actin(274bp)
- C : プライマリー検体での大屋敷らのGATA-2発現解析。

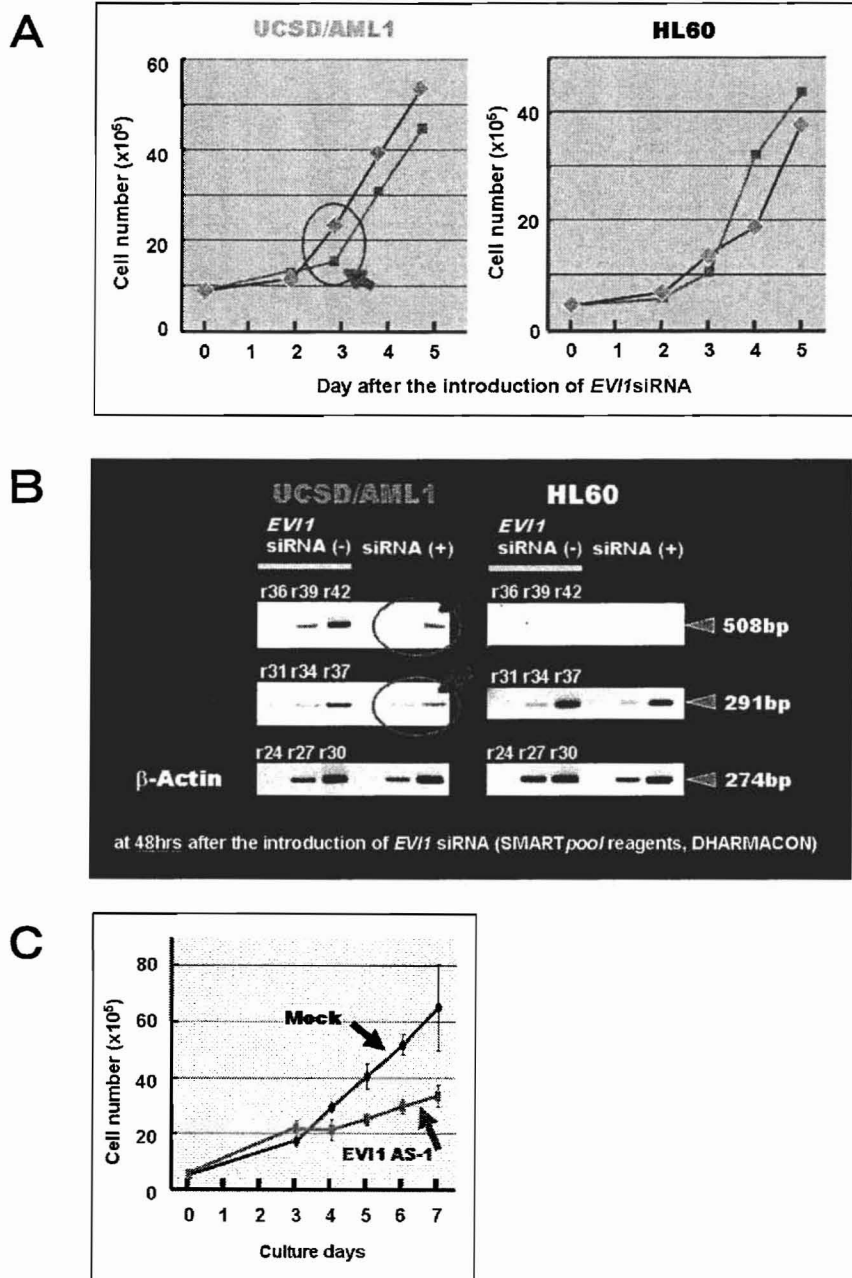


図 1 1 EVI1 siRNA導入ヒトEVI1高発現白血病細胞UCSD/AML1では増殖が抑制され、GATA-2の発現が著しく低下した。またEVI1アンチセンス導入EVI1高発現白血病細胞MOLM1でも細胞の増殖速度が顕著に低下した。

A : EVI1 siRNAを一過性に導入したヒトEVI1高発現白血病細胞UCSD/AML1およびEVI1非発現白血病細胞HL60の増殖パターン。

B : RT-PCRを用いたEVI1 siRNA導入白血病細胞の発現パターン。

C : EVI1アンチセンスを安定導入したEVI1高発現白血病細胞MOLM1の増殖パターン。

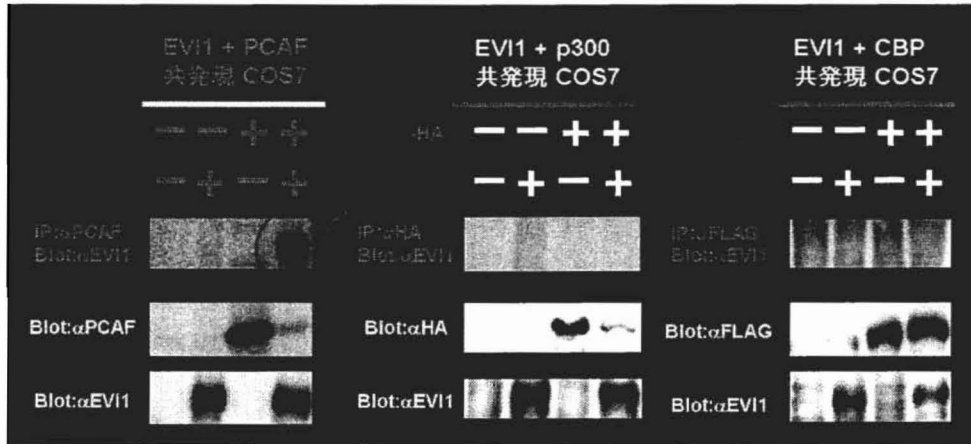


図 1 2 EVI1はヒストンアセチル基転移酵素PCAFと相互作用したが、p300、CBPとは相互作用しなかった。

サル腎細胞株COS7にEVI1とヒストンアセチル基転移酵素を発現させ、タグ抗体および特異抗体を用いた免疫沈降法で相互作用解析した。

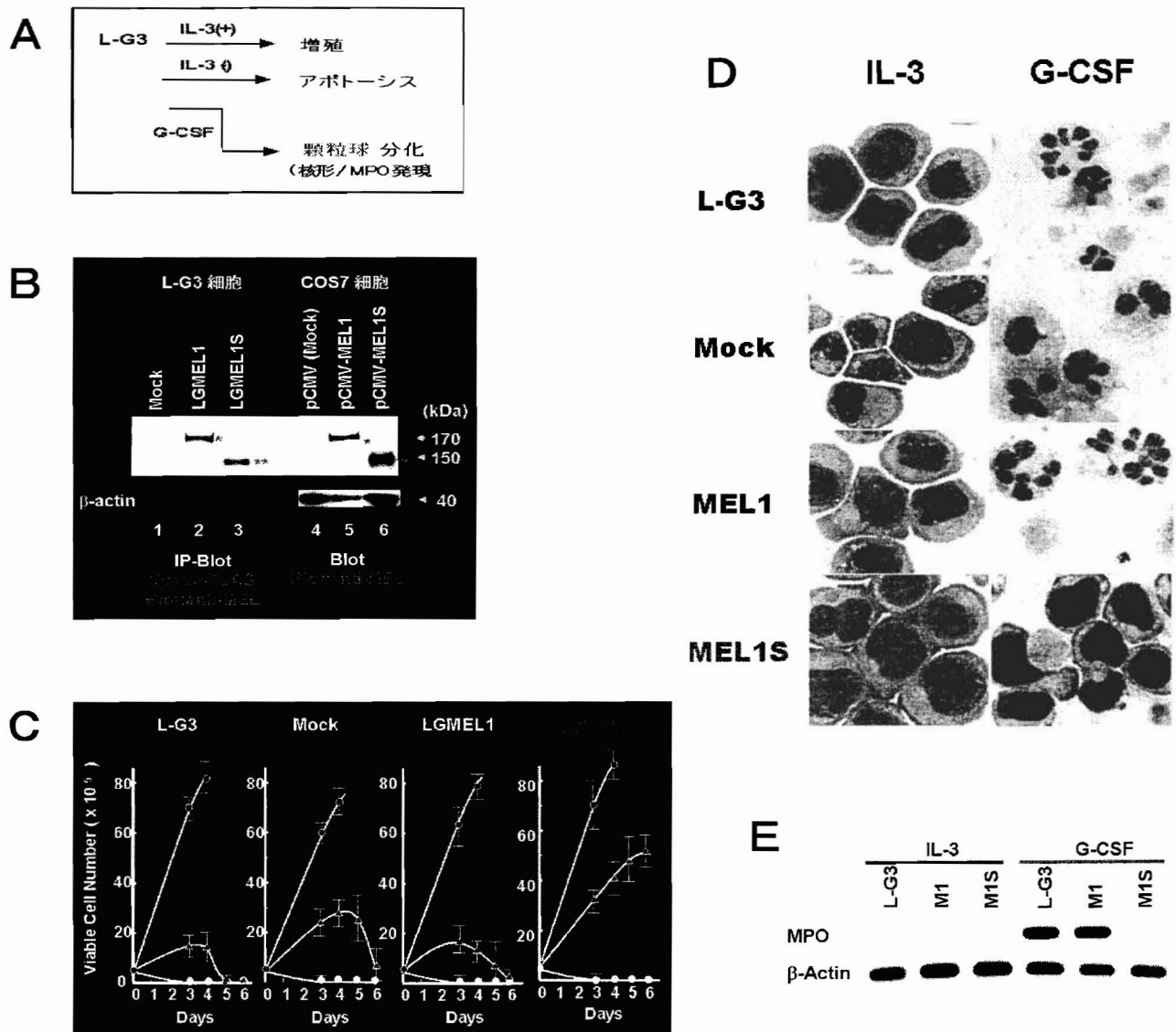


図 13 MEL1Sは、その導入により、IL-3依存性骨髄細胞株 L-G3 に対して分化抑制能を示した。

- A : IL-3依存性骨髄細胞L-G3はG-CSF依存性に顆粒球へ分化する。
 B : MEL1/MEL1S導入L-G3骨髄細胞株では蛋白質発現が認められた。
 C : G-CSF存在下でのMEL1S導入L-G3骨髄細胞株の増殖パターン。
 D : G-CSF存在下でのMEL1S導入L-G3骨髄細胞株の核染色パターン。
 E : MEL1S導入L-G3骨髄細胞株ではMPO遺伝子の発現を認められなかった。

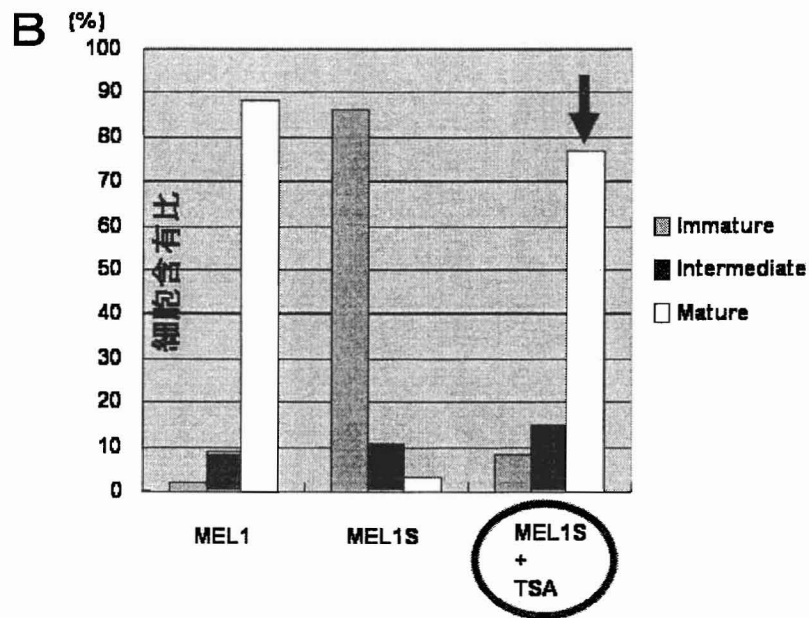
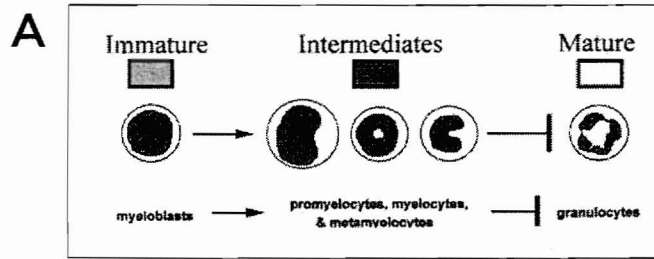


図 1 4 MEL1Sを導入したL-G3骨髓細胞株ではTSA存在下でG-CSFにより誘導される細胞分化を回復し、MEL1S による分化抑制能に脱アセチル化が関与することが示唆された。

A : 核形の違いからMEL1/MEL1S導入L-G3骨髓細胞株の分化度を分類した。

B : TSA添加によりMEL1S導入L-G3骨髓細胞株はG-CSF依存性の顆粒球分化を回復した。

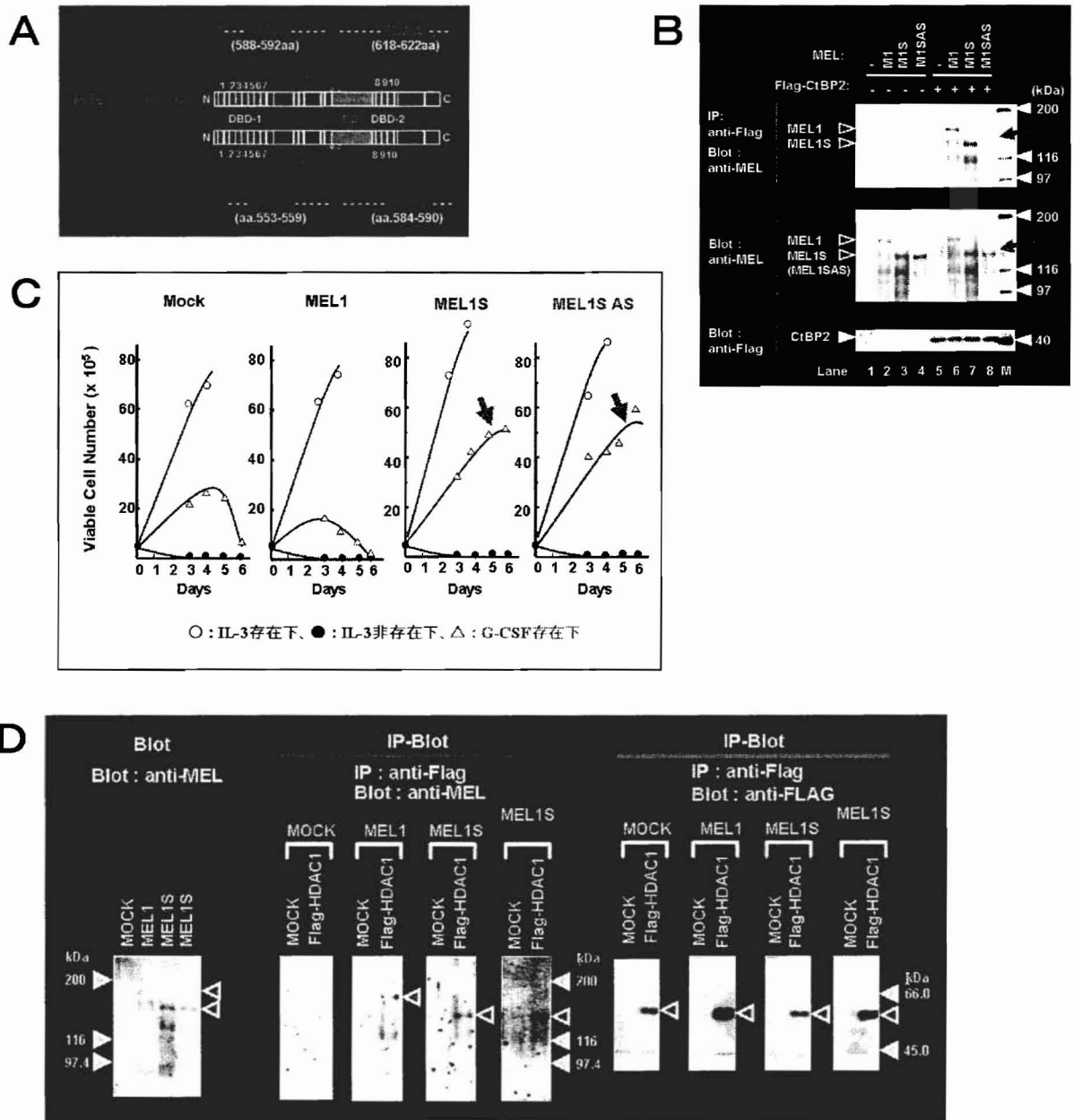


図 15 MEL1S導入細胞株と同様、MEL1S AS変異体導入骨髄細胞株はG-CSF存在下で増殖を続けた。CtBPとの相互作用はMEL1Sの分化抑制能に必須ではなかった。

- A : EVI1およびMEL1S遺伝子産物にはCtBP結合配列が2つ存在する。
- B : MEL1ScTBP結合配列AS変異体<PLASS>はCtBP2と結合できない。
- C : MEL1S AS変異体導入骨髄細胞株はG-CSF存在下で増殖を続けた。
- D : CtBPに結合しなかったMEL1S CtBP結合配列AS変異体もHDAC1に結合した。またHDAC2、HDAC3も同様に結合した。

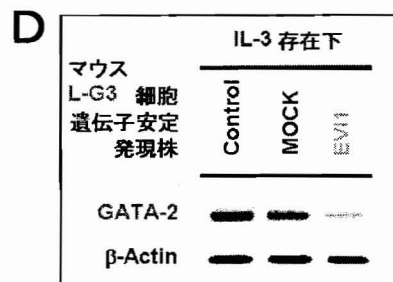
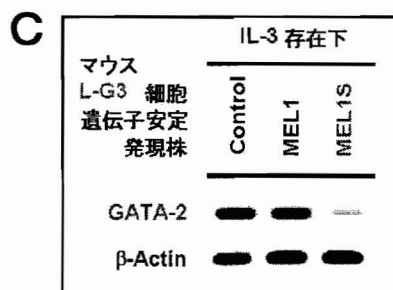
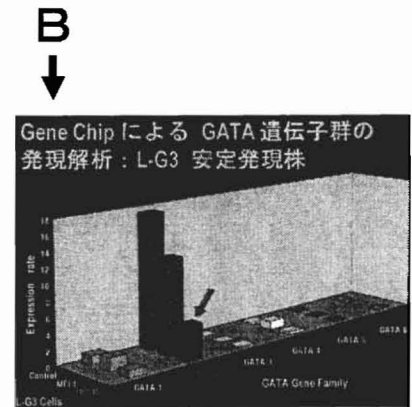
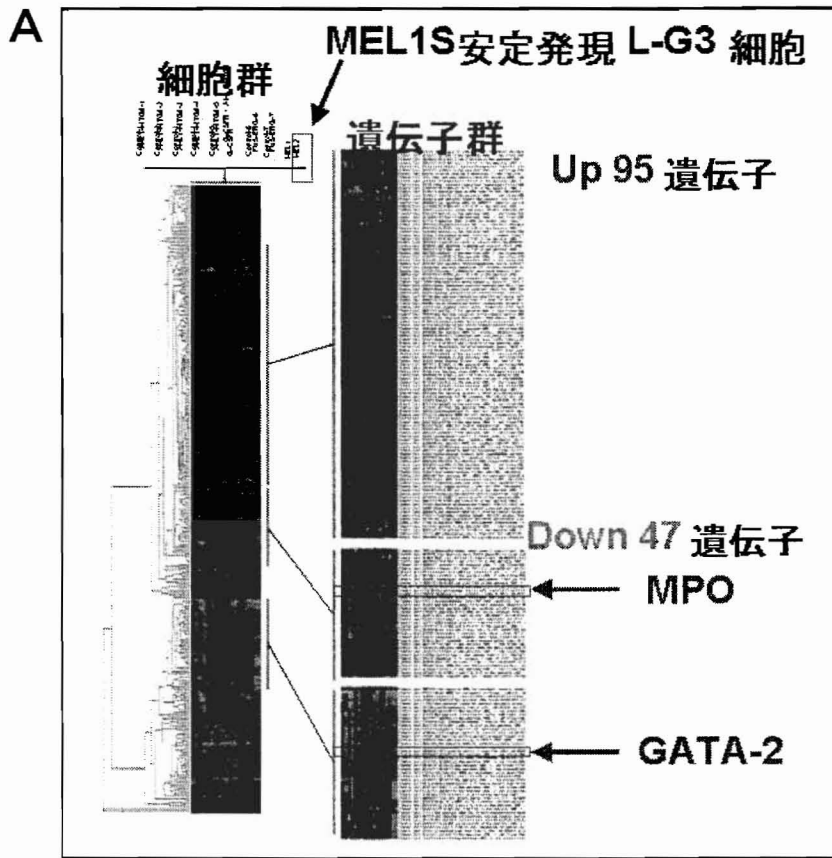


図 16 MEL1S導入により、L-G3細胞ではGATA-2遺伝子の発現が低下した。

- A : MEL1S導入L-G3細胞の発現解析の結果、GATA-2やMPOの遺伝子発現が低下していた。
 B : GATA遺伝子群(1-6)の発現解析のまとめ。
 C, D : EVI1およびMEL1S導入L-G3細胞株のRT-PCR解析により、GATA-2の発現低下を確認した。