京都大学	博士（医学）	氏名	田中　淳
論文題目	Aberrant *EVI1* splicing contributes to *EVI1*-rearranged leukemia （骨髄性腫瘍における *EVI1* 再構成と RNA スプライシング異常の協調機構）		

（論文内容の要旨）

急性骨髄性白血病（AML）は、分化が障害された幼弱な骨髄系細胞が自律性に増殖することで、臓器浸潤や造血不全から致死的となる血液悪性腫瘍である．とりわけ 3 番染色体の逆位または転座[inv(3)/t(3;3)]に代表される *EVI1* 遺伝子再構成(*EVI1*-r)を伴う AML は極めて予後不良な病型であることが知られている．近年、inv(3)/t(3;3)はエンハンサー領域の転位により *EVI1* 遺伝子の異常な発現亢進を呈すること、その *EVI1* 高発現が AML の発症・進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなるなど、本病型についての病態理解が進みつつある．しかし実際の *EVI1*-r を伴う AML 症例は種々の遺伝子異常を合併しており、こうした遺伝子異常と *EVI1*-r がどのように協調して AML の発症および進展に寄与しているのかについては未だよく知られていない．本研究では、予後不良な病型である inv(3)/t(3;3)を伴う AML の病態をより深く解明することを目的に、*EVI1*-r に合併する遺伝子異常の協調およびその分子機構についての解析を行った．

第一に、既存および新規に集積した症例データを用いて *EVI1*-r を伴う骨髄性腫瘍に合併する遺伝子変異について解析した．その結果、スプライソソームの構成因子をコードする *SF3B1* 遺伝子の変異が最も高頻度に、かつ AML 全体に比べても有意に高頻度であることを見出し、この *SF3B1* 遺伝子の変異に着目して更に解析を進めた．

第二に、*Sf3b1* 変異を造血細胞特異的に導入できるノックインマウスと、ヒト inv(3)の配列を挿入されたトランスジェニックマウス(inv(3)マウス)を交配して両異常合併マウスを作出し、両異常の *in vivo* での協調を確認した．inv(3)マウスは潜伏期間を経て白血病を誘導することが知られているが、両異常合併マウスでは inv(3)マウスに比べて白血病発症までの潜伏期間が有意に短縮し、造血不全や脾浸潤といった表現形質もより強まっていた．

第三に、前述のマウスモデルおよびヒト患者検体のトランスクリプトーム解析を行ったところ、inv(3)は主に遺伝子発現の変化に、一方で *SF3B1* 変異は主にスプライシングの変化にそれぞれ寄与していた．さらに興味深いことに、*EVI1* は inv(3)/t(3;3)による異常な発現促進を受けるだけではなく、SF3B1 変異体が惹起する異常なスプライシングの標的にもなっていることを見出した．これにより、EVI1 が転写因子として機能する為に必要な DNA 結合ドメイン(ジンクフィンガー)の近傍にインフレームに 6 アミノ酸が挿入された異常な蛋白をコードする転写産物(*EVI1+18*)が誘導されていた．*EVI1+18* はヒト AML 症例およびヒト細胞株において *SF3B1* 変異陽性例に特異的に誘導され、前述の両異常合併マウスにおいても誘導されていた．

第四に、前項で同定した EVI1+18 の機能解析を行った．マウスの造血幹細胞に野生型 EVI1 を過剰発現させると *in vitro* で不死化することが知られているが、EVI1+18 を過剰発現したマウス造血幹細胞は不死化に加えて野生型 EVI1 に比べ有意に増殖能・自己複製能が亢進しており、トランスクリプトーム解析においても白血病発症に関連する複数の遺伝子について野生型 EVI1 発現細胞に比べ有意な発現上昇を認めた．

最後に、*EVI1+18* の誘導にどのようなシスエレメントが介在しているのかを調べるために、ミニジーンを用いたスプライシングの解析を行った．その結果、SF3B1 変異体が *EVI1+18* を誘導する際には野生型 SF3B1 とは異なる分枝部位を認識していることや、*EVI1+18* で挿入される 18 塩基の配列には *EVI1+18* の誘導を促進するスプライシングエンハンサー配列が含まれることを明らかにした．

これらの結果から、*EVI1*-r に高頻度に合併する *SF3B1* 変異は *EVI1*-r による白血病発症に協調しており、その機序として *SF3B1* 変異体の存在下で特異的に誘導される EVI1 の異常なスプライシング産物が関与している可能性が示された．予後不良な AML の更なる病態理解および今後の治療開発に繋がる知見であると考えられる．

（論文審査の結果の要旨）

EVI1 再構成を伴う骨髄性腫瘍に *SF3B1* 変異が高頻度に合併することが知られているが、両異常の協調の有無や背景となる分子機構は明らかにされていない．

本研究ではまず *EVI1* 再構成を伴う骨髄性腫瘍の遺伝子解析を行い、既報と同様に *SF3B1* 変異が高頻度に合併し、その頻度が AML 症例全体に比べて有意に多いことを確認した．その上で *EVI1* 再構成と *Sf3b1* 変異の合併を再現するマウスモデルを作出し、骨髄移植モデルにおいて両異常合併マウス群が *EVI1* 再構成のみのマウス群に比して白血病発症までの期間が有意に短縮することを示した．

また本研究では、*EVI1* は *EVI1* 再構成による発現促進だけでなく、*SF3B1* 変異による異常スプライシングの標的となり、過去に報告の無い異常なスプライシングバリアントが誘導されていることを示した．この異常バリアントの発現は野生型 EVI1 の発現に比べて有意にマウス造血幹前駆細胞の自己複製能を亢進させたことから、*EVI1* 再構成と *SF3B1* 変異が協調して白血病発症を促進する機構にこの *EVI1* の異常バリアントが関与している可能性が示唆された．

以上の研究は予後不良な骨髄性腫瘍の分子機構の解明に貢献し、今後の更なる病態解明・治療応用への発展が期待されるものである．

したがって、本論文は博士（　医学　）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和５年２月６日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日以降