

氏 名	やなぎ だ まさ とし 柳 田 匡 俊
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2932 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	RUNX1 遺伝子量増加と骨髄性白血病原性の検討：Down 症候群にみられる白血病との関与

論文調査委員	(主 査) 教 授 大 野 睦 人	教 授 森 和 俊	助教授 重 定 勝 哉
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物における遺伝子の発現は、発生の各段階により、また異なる組織ごとに多様かつ特異的な調整を受ける。遺伝子の発現調節は、非常に多くの場合、基本的に転写段階でなされていることが分かっている。一方、転写制御の破綻は、癌などの遺伝子病を発症する原因になることが明らかとなってきた。こうした背景の中で、申請者は、血液細胞において分化決定に重要な働きをもつ転写因子 PEBP2 の白血病発症における役割を、分子レベルから個体レベルにわたる系統的な解析を通して解明することを目指した。

転写因子 PEBP2/CBF は DNA 結合を担う α サブユニットと非 DNA 結合性の β サブユニットからなるヘテロ 2 量体として機能する。 α サブユニットは DNA 結合と β サブユニットとの結合を担う Runt ドメインを持つ。哺乳類では 3 種類ある α サブユニットのうち一つをコードする *RUNX1/AML1* は、造血細胞の発生分化に深く関与しており、その反映としてヒト白血病の染色体転座、点突然変異を通じて受けて白血病を標的となっている。ファミリー遺伝子間に共通の特徴として遺伝子量効果を持つことが知られているが、*RUNX1* のハプロ不全で家族性白血病 FPD/AML (familial platelet disorder predisposed to acute myelogenous leukemia) が起こる。これらの白血病はいずれも *RUNX1* の機能消失より引き起こされると考えられるが、これとは全く逆に *RUNX1* の遺伝子量増加・過発現も白血病化に関わるのではないかと疑われていた。最も興味深い例として、21 番染色体トリソミーによって発症するダウン症候群では、高頻度に急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) を伴うことが知られている。これらの白血病における *RUNX1* 遺伝子量増加の関与を検証するために、申請者は骨髄系細胞（特に赤血球・巨核球）特異的 *GATA-1* プロモーターにより *Runx1* を発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスは、新生仔期においてのみ、巨核球特異的細胞表面マーカー CD61 抗原陽性骨髄細胞の軽度増加を示すが、白血病発症には至らなかった。このマウスを、レトロウイルスを個体内に持ち random insertion によって骨髄性白血病を自然発症する BXH2 マウスと交配したところ、*Runx1* の過剰な発現は、BXH2 マウスの骨髄性白血病発症を促進し、より早期に白血病を発症した。また BXH2-*Runx1*-Tg マウスは、高頻度に AMKL を呈した。次いで、これらマウス中の Retrovirus integration site の配列を決定することにより、*Runx1* 遺伝子量増加と協調して白血病化に働く遺伝子の候補が多数同定された。これらの遺伝子いくつかは STAT3 を介するシグナル伝達経路に含まれ、最終的に *Ccnd3* の発現を誘導することで、巨核球分化異常をきたす可能性が示唆された。さらに、実際に cyclin D3 のプロモーター上で、*RUNX1* と STAT3 が協調的に転写を活性化することが確認された。これまで、リンパ系腫瘍における *Runx1* 遺伝子量増加についての報告は散見されているが、骨髄性白血病に関する病原性はいまだ不明であった。したがって、本研究は *Runx1* の遺伝子量増加が骨髄性白血病発症を促進することを示した最初の報告といえる。ヒトにおいて最も高頻度に見られる先天性染色体異常、Down 症候群における白血病 DS-AMKL の発症機序を考える上で、その意義は非常に大きいと思われる。

参考論文 1-2 はヒトの骨形成異常症 CCD に関連する *RUNX2* の点突然変異体について、また参考論文 3-6 は同じくヒ

トの白血病に関連する RUNX1 の点突然変異 1 の点突然変異体について、それぞれ機能解析を行いその病原性の分子的基盤を考究したものである

論文審査の結果の要旨

申請者は本研究で、RUNX1 の遺伝子増加が骨髄性白血病発症を引き起こす可能性を *in vivo* で検証するために、*Runx1*-Tg マウスと retrovirus insertional mutagenesis を用いたモデル動物系を構築し、それを活用することにより白血病化において *Runx1* と協調して白血病化を促す遺伝子群を網羅的に同定することを目指した。

この研究の背景をなす *RUNX1* はヘテロ 2 量体転写因子 PEBP2/CBF の DNA 結合サブユニットをコードする RUNX ファミリー遺伝子の一つであり、血液細胞の発生分化に必須な役割を果たすことが示されている。同時に、その役割と呼应して、*RUNX1* はヒト白血病に最も高頻度に関わる原因遺伝子となっている。そうした白血病の多くは、*RUNX1* の染色体転座あるいは点突然変異による機能消失に起因することが示唆されていた。しかし、これとは逆に *RUNX1* の遺伝子量増加あるいは過発現に起因すると疑われる白血病の例も知られていた。その最も興味深い例として、21 番染色体トリソミーによって発症するダウン症候群では、高頻度に急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) を併発する。申請者はこの現象に注目し、DS-AMKL の発症メカニズムを探るためのモデルとして、骨髄系細胞（特に赤血球・巨核球）特異的 *GATA-1* プロモーターにより *Runx1* を過剰発現するトランスジェニックマウス (*Runx1*-Tg) を作成した。このマウスは、新生仔期において過渡的に巨核球細胞の軽度増加を示し、ダウン症患者で見られる病態が一部再現されたものの、白血病発症までには至らなかった。多段階発ガン説によれば、発ガンには複数の遺伝子異常が関与すると考えられるのに対し、マウスでは生存期間が短いために、そのような遺伝子異常の重複が起こりにくいものと考えられた。そこで、申請者は次に、内在性レトロウイルスの random insertion を介して骨髄性白血病を好発する BXH2 マウスに *Runx1*-Tg マウスを交配することにより、協調遺伝子の変異を加速させることを試みた。その結果、実際に *Runx1* の過剰発現により、白血病発症が時間的にも頻度的にも有意に促進され、また高頻度に AMKL 様症状を呈することが確認された。さらに、Retrovirus integration site の配列を決定することにより、*Runx1* 遺伝子量増加と協調して白血病化に働く遺伝子の候補が多数同定された。これらの遺伝子の一部は STAT3 を介するシグナル伝達経路に含まれ、最終的に *Ccnd3* の発現を誘導することで、巨核球分化異常をきたす可能性が示唆された。実際に、申請者は *cyclin D3* のプロモーター上で、*RUNX1* と STAT3 が協調的に転写を活性化することを確認した。これまで、リンパ系腫瘍における *Runx1* 遺伝子量増加については報告されていたが、骨髄性白血病に関する病原性はいまだ不明であった。したがって、本研究は *Runx1* の遺伝子量増加が骨髄性白血病発症を促進し得ることを示した最初の例といえる。ヒトにおいて最も高頻度にみられる先天性染色体異常、Down 症候群における白血病 DS-AMKL と *RUNX1* の機構的連関を探るための糸口を開いた点で、医学のみならず基礎生物学の観点からその意義は非常に大きいと思われる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。