

氏名(本籍)	飯嶋良味(東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1930号		
学位授与年月日	平成15年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	新規白血病関連融合遺伝子 ETV6/ARG の同定とその機能		
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士	長澤俊郎
副査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之
副査	筑波大学助教授	医学博士	有波忠雄

## 論文の内容の要旨

### (目的)

TEL/ETV6 遺伝子 (以下 ETV6 遺伝子) は 1994 年 Golob らにより, 5;12 転座をもつ慢性骨髄単球性白血病症例由来の骨髄細胞から,  $\alpha$ -型血小板由来増殖因子受容体遺伝子のパートナー遺伝子として, 染色体 12p13 領域からクローニングされた。ETV6 遺伝子は N 末端側に HLH ドメイン, C 末端側に Ets-DNA バインディングドメイン持ち, Ets ファミリーに属する転写調節制御因子と考えられている。ETV6 遺伝子異常はリンパ性, 骨髄性を問わず血液腫瘍性疾患全般に広く認められ, これまで 11 種類の遺伝子との融合が確認されている。これら融合相手遺伝子は多種多様であり, 様々な融合タンパク質を形成しガン化に関与している。さらには同じ ETV6 融合遺伝子 (ETV6/TRKC) が白血病と固形腫瘍の両方から見いだされるなど, 他の転座型白血病とは違った特異な性質を持つ。本研究で用いた HT93A 細胞株は急性前骨髄球性白血病 (APL) 症例より樹立された細胞株で, これまで ETV6 遺伝子との転座報告例のない 1;12 転座を有している。この 1;12 転座に ETV6 遺伝子に関与しているのかを確認し, 新たな ETV6 遺伝子のパートナー遺伝子の同定を目的として本研究を開始した。さらのクローニングされた新しい融合遺伝子について, ガン遺伝子としての活性を持つのかどうか, さらにガン化を起こしている細胞内でどのようにシグナル伝達系分子に関与しているのかを解明するために本研究をおこなった。

### (対象と方法)

本研究で用いた HT93A 細胞株は, AML-M3 (APL) 症例より樹立され, 非常に特徴的な分化能を持ち, 種々のサイトカインに反応して好中球, 好酸球, 好塩基球へと分化する。樹立時の核型は 46, XT, t(1;12)(q25;p13), der(2)1(1;2)(q25;q33), t(4;6)(q12;q13), t(15;17)(q22;q11.1) であり, これまで ETV6 遺伝子との転座報告例のない t(1;12)(q25;p13) 転座を有している。この HT93A 細胞株の 1;12 転座に ETV6 遺伝子に関与しているのかを確認するため, FISH 法, サザンブロット法をおこなった。異常転写産物の発現はノーザンブロット法にて確認した。新しい融合パートナー遺伝子の同定は 3'-RACE 法, RT-PCR 法, DNA シークエンス法にておこなった。同定した融合遺伝子の機能解析については, 細胞株への融合遺伝子導入をエレクトロポレーション法, リポフェクション法にておこなった。形質転換能の確認は MTT アッセイ, 軟寒天コロニー形成法にておこなった。融合タンパクの同定, 細胞内シグナル伝達分子との共役, チロシンリン酸化の確認は免疫沈降法, ウエ

スタンプロッキング法にておこなった。

#### (結果)

ETV6遺伝子の新しい融合パートナーとしてARG (*ABL* related geneまたは*ABL2*) 遺伝子の同定に成功した。ARGは細胞内チロシンキナーゼであるABLと機能ドメインにおいて高い相同性を持つ。ETV6/ARG融合タンパクはETV6のHLHドメインとARGのチロシンキナーゼドメインを含むすべての機能ドメインを含んでいた。ETV6/ARGは成長因子依存性増殖であったマウス血球系細胞株Ba/F3を非依存性増殖に、ラット繊維芽細胞株Rat-1を足場非依存性増殖へと導き形質転換能を示した。またETV6/ARG融合遺伝子の活性化には、ETV6-HLHドメインが完全でなくてはならないことがわかった。さらにETV6/ARGタンパクが細胞内シグナル伝達系分子PI3K, SHC, ras-GAP, CRK-Lと共役し、チロシンリン酸化を起こして活性化することを示した。

#### (考察)

ARGはガン遺伝子として活性化するABLと構造上非常に高い相同性を持つにもかかわらず、これまでヒトにおいて腫瘍形成に関与したという報告はなく、実験的にも腫瘍原性が示されたことはなかった。今回同定したETV6/ARG融合遺伝子はARGが腫瘍形成に関与した初めての報告であり、ARGのガン遺伝子としての活性を証明した最初の研究である。ETV6/ABL融合遺伝子は既に同定されており、HLHドメインを介した二量体化により構造的自己リン酸化が起こり、細胞内シグナル伝達分子をチロシンリン酸化して活性化することが知られている。ETV6/ARGはETV6/ABLと機能ドメインにおいて相同性が高いこと、活性化にはHLHドメインが必須であったことから、ETV6/ABLと同様の分子メカニズムによって活性化されることが示唆された。今回用いたHT93A細胞株はガン化の主要因と考えられるPML/RARA融合タンパクを発現しており、ETV6/ARG単独でヒト血球細胞を*in vivo*形成転換できうるかどうかは不明である。しかしHT93A細胞株は特徴的な分化能を有することから、ETV6/ARGはガン細胞の表現型を修飾していると考えられる。治療抵抗性など複雑な白血病の病態に対し新しい治療の分子標的を提示したものであり、分子標的療法への応用も期待できる。

#### (結論)

本研究はARGが腫瘍形成に関与した初めての報告であり、ARGのガン遺伝子としての活性を証明した最初の研究である。ARGはETV6遺伝子と融合することによりガン遺伝子として活性化され、ヒトの腫瘍形成に関与しうること、またETV6/ARG融合遺伝子はABLガン遺伝子が活性化するシグナル伝達系路のいくつかを同様に活性化しうるということがわかった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、t(1;12)(q25;p13)転座を持つ急性前骨髄球性白血病症例由来細胞株:HT93Aから、ETV6(TEL)/ARG融合遺伝子を単離し、さらに機能解析の結果、ETV6/ARG融合遺伝子が形質転換能を持つことを証明した。ETV6遺伝子は他の転座型白血病関連遺伝子には見られない特異な性質を有することや、単離された新しいパートナー遺伝子ARGは、ABLと相同性が高いにもかかわらず、その特性においてはABLと非常に異なる興味深い遺伝子であることを明らかにしたものである。本研究はARG遺伝子がヒトの腫瘍形成に関与した初めての報告であり、ARG遺伝子のガン遺伝子としての活性を証明した研究として高く評価される。今後、分子標的療法への応用も期待されるものであり博士(医学)論文として優れたものである。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。