

# 論文概要

論文題目

Tet2 と Tet3 の二重欠損マウスは脱メチル化薬感受性の急性骨髄性白血病を発症する

指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 千葉 滋 教授

(所属)

筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名)

真家 紘一郎

## 目的：

TET 蛋白は DNA 上のメチル化シトシン (mC) をヒドロキシメチル化シトシン (hmC) に変換する脱メチル化反応を触媒する酵素である。これまで、急性骨髄性白血病 (AML) をはじめとする様々な骨髄性造血器腫瘍で *TET2* 遺伝子の機能喪失型変異が高頻度に見いだされてきた。*TET3* も血液細胞において *TET2* と同等程度に発現しており、血液細胞における脱メチル化の一端を担っていると推測されてきたが、*TET3* 遺伝子の変異は骨髄性造血器腫瘍において極めて稀であることから、*TET3* 遺伝子の機能喪失と腫瘍発生の関連は不明であった。近年、血液細胞の *TET3* 発現は加齢によって低下することが分かってきた。そこで我々は、*TET2* の機能喪失型変異と *TET3* の発現低下による mC から hmC への変換障害と骨髄性造血器腫瘍発症の関連を追求するため、*Tet2* と *Tet3* の Cre 発現依存的二重欠損マウスモデルを樹立し解析を行った。

## 対象と方法：

*Tet2* と *Tet3* の酵素活性領域をコードするエクソンの両端にそれぞれ Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP を挿入したマウス (*Tet2<sup>lox</sup>*, *Tet3<sup>lox</sup>* マウス) と、*Mx1* プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する *Mx1-Cre* トランスジェニックマウスを交配し、*Tet2<sup>lox</sup> Tet3<sup>lox</sup> Mx1-Cre* マウスを作成した。新生仔マウスにポリイノシン-ポリシチジン酸を投与し loxP 挿入部位を欠失させた。

## 結果：

全ての *Tet2/Tet3* 二重欠損マウスが 3 ヶ月以内に AML を発症し死亡した。一方、*Tet2* または *Tet3* の単独欠損マウスは観察期間内に造血器腫瘍を発症しなかった。この AML 細胞に全エクソン解析を行ったところ、この細胞には *Tet2* および *Tet3* の欠失以外の新たな変異を認めなかった。*Tet2/Tet3* 二重欠損マウスの白血病細胞は顆粒球マクロファージ前駆細胞 (GMP) 様の表面マーカー (c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>FcR $\gamma$ <sup>+</sup>) を有していた。そこで、生後 4-6 週の *Tet2/Tet3* 二重欠損マウスの GMP (*Tet2/Tet3*-null GMP) におけるメチル化プロファイルおよび発現プロファイルを、reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) および RNA-sequencing で網羅的に解析した。RRBS では *Tet2/Tet3*-null GMP において高メチル化領域の顕著な増加を認め、特にエンハンサー領域で高メチル化領域の割合が増加した。*Tet2/Tet3*-null GMP において、エンハンサー領域の DNA メチル化が上昇した遺伝子群の mRNA 発現は野生型 GMP と比し、有意に mRNA 発現量が低下していた。Gene set enrichment analysis (GSEA) では、*Tet2/Tet3*-null GMP においてインターフェロン、NF- $\kappa$ B、および Stat3 の標的遺伝子群の有意な enrichment を認めた。*Tet2/Tet3*-null の AML 細胞は、IL-3 添加液体培地で培養可能であり、継代培養を繰り返して細胞株を樹立した。この細胞株を致死量放射線照射したマウスに移植すると、マウスは親細胞と同様に、GMP 様の表面マーカーを有する AML を発症した。この細胞株にレトロウイルスを用いて *Tet2* の酵素活性領域を導入したのち致死量放射線照射したマウスに移植したところ、移植したマウスにおける AML 発症が有意に抑制された。*Tet2/Tet3*-null の AML 細胞を致死量放射線照射したマウスに移植したのち脱メチル化薬のアザシチジン酸を投与したところ、移植したマウスにおける AML

発症の遅延と生存期間の延長がみられた。

考察：

*Tet2/Tet3*-null の AML 細胞は、*Tet2* と *Tet3* の欠失以外のアミノ酸変化を伴うゲノム変化を伴っていないと考えられた。*Tet2/Tet3*-null 細胞では野生型、*Tet2*-null, ないし *Tet3*-null 細胞のいずれとも異なる DNA メチル化および遺伝子発現プロファイルを呈していると考えられた。また、この *Tet2/Tet3*-null AML は、*Tet2* の酵素活性を回復させる、あるいは脱メチル化薬を投与することにより抑制されたことから、この AML は DNA メチル化の異常集積というエピゲノム変化に依存して発症していることが示唆された。

結論：

我々が樹立したマウス AML モデルは、*Tet2/Tet3* の酵素活性欠失による DNA メチル化の異常集積により発症し、脱メチル化薬に感受性を有していた。