

氏 名 真家 紘一郎
学位の種類 博士 (医学)
学位記番号 博甲第 8851 号
学位授与年月 平成 30年 9月 25日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
審査研究科 人間総合科学研究科
学位論文題目 *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

主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	渋谷和子
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	松本 功
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	小島崇宏

論文の内容の要旨

真家紘一郎氏の博士学位論文は、骨髄性造血器腫瘍発症の発症における DNA 脱メチル化酵素 *Tet2* と *Tet3* の意義を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

【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ていた。著者は、これらを背景として、*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明らかにすることを目的として、*Tet2* と *Tet3* の二重欠損マウスモデルを樹立して解析を行ったものである。

【対象と方法】

本研究では、*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^{lox}*, *Tet3^{lox}* 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の交配により、*Tet2^{lox} Tet3^{lox} Mx1-Cre* マウスが作製されている。さらに新生仔マウスにポリイノシン-ポリシチジン酸を投与することで loxP 挿入部位を欠失させている。

【結果】

著者は、作製した全ての *Tet2/Tet3* 二重欠損マウスが 3 ヶ月以内に AML を発症して死亡したことを明らかにしている。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 細胞を用いて全エクソン解析が行われたところ、この細胞には *Tet2* および *Tet3* の欠失以外の新たな変異は認められなかった。*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⁺Sca-1⁺CD34⁺FcR γ ⁺) を有していた。そこで著者は、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 によって網羅的に解析している。RRBS では *Tet2/Tet3*-null GMP において高メチル化領域の顕著な増加が認められ、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ていた。*Tet2/Tet3*-null GMP においては、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- κ B、および Stat3 の標的遺伝子群の有意な enrichment が認められている。*Tet2/Tet3*-null の AML 細胞は、IL-3 添加液体培地で培養可能であり、著者は、継代培養を繰り返して細胞株を樹立している。さらに、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、親細胞と同様に、GMP 様の表面マーカーを有する AML を発症することを明らかにされている。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に致死量放射線照射したマウスに移植を行った場合には、移植したマウスにおける AML 発症が有意に抑制されることも明らかにされている。*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に脱メチル化薬のアザシチジン投与した実験では、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ことから、本モデルで発症する AML が DNA メチル化阻害薬に感受性であることも示されている。

【考察】

著者は、*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共通のゲノム変化を伴っていないことを明らかにすることで、両遺伝子の欠失が AML の発症を起こす十分条件になっていることを示している。*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、あるいはメチル化阻害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を示している。

【結論】

著者らが樹立したマウスモデルにおける AML 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ることが示された。

審査の結果の要旨

(批評)

DNA のメチル化修飾の異常が、がんの発症に関与することは知られており、DNA 脱メチル化酵素 *TET2* 遺伝子の変異は多くのがん症例で報告されているが、マウスの骨髄系では、*Tet2* と *Tet3* には相補性があるが、両者の機能が失われると、全てのマウスに骨髄性白血病が発症することを明らかにしたことは学術的意義が高い。今後、メチル化異常によって骨髄性白血病の発症原因となる遺伝子の探索を行うことを可能にする実験系が確立されたという意味でも高く評価される。

平成 30 年 6 月 4 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。