

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	田中 智之
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 802 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies (内部欠失による変異 BCOR により T 細胞腫瘍における BCOR のがん抑制遺伝子としての機能が明らかとなった)
論文審査委員	主査 教授 藤井 雅寛 副査 准教授 今井 千速 副査 教授 曾根 博仁

博士論文の要旨

[背景と目的]

*Bcor* (*Bcl-6* corepressor) は X 染色体上に位置し, *BCL-6* と結合するドメインとポリコーム群複合体と結合するドメインを有し, *Bcor* 蛋白はこれらの分子と複合体を形成して転写抑制に機能すると考えられている. これまで, 急性骨髄性白血病などの骨髄系腫瘍, 節外性 NK/T 細胞性リンパ腫などのリンパ性腫瘍, また再生不良性貧血や骨髄異形成症候といった造血不全の一部症例に機能喪失型の遺伝子変異が明らかになった. しかし, 生体の造血における役割はほとんど不明であった. そこで本研究では, *BCL-6* と結合するドメインの欠損した *Bcor* 変異マウスの移植実験により, *BCOR* の造血への影響を検討した.

[方法と結果]

*Bcl6* と結合するドメインを有するエキソン 4 を欠失するコンディショナルな *Bcor* 変異マウス (*Bcor<sup>fl/y</sup>;Cre-ERT*) を作成し, 骨髄移植後にタモキシフェン投与により *Bcor* 変異を誘導して (*Bcor<sup>AE4y</sup>*), 競合的骨髄再構築法や非競合的骨髄再構築法を行い, 造血についてフローサイトメトリを用いて野生型マウスと比較して解析した. また造血幹細胞分画や前駆細胞分画を *in vitro* で培養して細胞増殖について野生型マウスと比較して解析した. 競合的骨髄再構築法を行ったところ, *Bcor<sup>AE4y</sup>* で野生型マウス群と比較して骨髄再構築能の低下が認められた. また造血幹細胞分画を *in vitro* で培養すると, 同様に細胞増殖能の低下が認められたが, 一方で, 造血前駆細胞分画や T 細胞分画を *in vitro* で培養すると野生型マウスと比較して増殖能の亢進が認められた. なお, *Bcor<sup>AE4y</sup>* を長期観察するとタモキシフェン投与後 300 日以内に T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) を発症し死亡した. メカニズムを解明するために *Bcor<sup>AE4y</sup>* T-ALL 細胞や胸腺細胞における RNA-seq や抗 *Bcor* 抗体などによるクロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-seq) を用いて T 細胞における *BCOR* や *BCL-6* のゲノム上での挙動や転写への影響を解析した. まず RNA-seq の結果を Gene set enrichment analysis (GSEA) 解析したところ, *Bcor<sup>AE4y</sup>* T-ALL 細胞群で *MYC* ターゲット遺伝子群の発現が野生型に比して亢進していた. *Myc* は T-ALL のがん遺伝子の一つで, 未成熟

な T 細胞の段階で NOTCH1 の下流で細胞増殖に関わるがん遺伝子である。そこで、MYC の活性化にその上流の NOTCH1 シグナルの活性化が関わっているかを検討した。*Bcor*<sup>AE4y</sup> では NOTCH1 ターゲット遺伝子群は GSEA 解析では活性化は認められなかったが、*Myc* 以外にも *Hes1*、*Ptca*、*Ccdn1*、*Skp2*、*Il7r* といった NOTCH1 の直接的なターゲット遺伝子群の活性が見られたことから、NOTCH1 シグナルの活性化が起こっていることが示唆された。*Bcor*<sup>AE4y</sup> T-ALL 細胞の *Notch1* 変異解析をサンガーシーケンス法で解析したところ、解析できた 5 例中 3 例で活性化型変異を有していた。なお、Western blotting 解析により 2 例で活性化した NOTCH1 発現が認められた。さらに *Bcor*<sup>AE4y</sup> DP 細胞を  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤入りの培地で培養すると、細胞増殖が低下することから *Bcor*<sup>AE4y</sup> DP 細胞の増殖に NOTCH1 シグナルの活性化が重要であることが示唆された。

次に、BCOR 抗体による ChIP seq では *Myc* など NOTCH1 ターゲット遺伝子のプロモーター領域に BCOR が動員されていることが示された。DP 胸腺細胞における BCOR と NOTCH1 の結合部位の比較により、多数の遺伝子プロモーターにおいて BCOR および NOTCH1 両方のピークが近接していることが明らかになった。これらの結果により、NOTCH1 により調整される T-ALL のがん遺伝子群の活性化を BCOR は抑制していることが示唆された。なお、今回の *Bcor*<sup>AE4y</sup> は BCL-6 と結合せるドメインを欠損させていることから、*Bcl-6* ノックアウトマウスを用いて、胸腺細胞の分画の表現型や遺伝子発現を比較した。*Bcor*<sup>AE4y</sup> や *Bcl-6* ノックアウトマウスの Double-negative (DN) 1/2 分画細胞を培養したところ、WT 群に対して有意に増殖能が高かった。また、*Bcor*<sup>AE4y</sup>、*Bcl-6* ノックアウトマウスのいずれの胸腺においても CD8 陽性 T 細胞の比率が高いという細胞分化の特徴が共通していた。また DP 細胞の遺伝子発現を RNA-seq で比較したところ、WT に対して遺伝子発現が亢進している遺伝子が有意に重複しており、遺伝子発現パターンは *Bcor*<sup>AE4y</sup> と類似していた。

#### [考察]

本研究によって得られた重要な知見は、*Bcor*<sup>AE4y</sup> により T-ALL が発症する点と、T 細胞において *Bcl-6*、*Bcor*、ポリコム群複合体の集合体が NOTCH1 ターゲット遺伝子の過剰な活性化を抑制し、癌抑制遺伝子として働く点であり、T 細胞における *Bcor* のがん抑制遺伝子としての役割を初めて証明することができた。ただし、*Bcl-6* ノックアウトマウス単独の長期観察や欠損ドメインを変えた他の *Bcor* 変異マウスが T-ALL を発症させるかなどの観察は行うことができなかったため、今後検討すべき課題である。

#### 審査結果の要旨

*Bcor* (Bcl-6 corepressor) は、*Bcl-6* およびポリコム群複合体と複合体を形成し、ヒストン修飾を介して転写抑制に機能すると考えられている。また、*Bcor* 遺伝子の機能喪失型変異が種々の造血器疾患に関与することが明らかになった。しかし、造血における *Bcor* の役割はほとんど不明である。申請者らは、*Bcl-6* に結合するドメインを欠損した *Bcor* 変異マウスを樹立し、*Bcor* 変異の造血への影響を検討した。*Bcor* 変異マウスの胸腺を移植したマウスを長期間観察すると、T 細胞性の急性リンパ性白血病 (T-ALL) を発症した。*Bcor* 変異マウスの T-ALL 細胞では *Myc* などの NOTCH1 ターゲット遺伝子の発現が亢進していた。クロマチン免疫沈降シーケンス法により、BCOR が *Myc* をはじめとした多くの NOTCH1 ターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合し、NOTCH1 ターゲット遺

伝子の発現を抑制することが示された。

本研究によって得られた重要な知見は、*Bcor*変異を持ったマウスがT-ALLが発症すること、およびT細胞において*Bcl-6*、*Bcor*およびポリコム群複合体の集合体がNOTCH1ターゲット遺伝子の発現を抑制し、癌抑制遺伝子として働くことを明らかにした点である。T細胞における*Bcor*のがん抑制遺伝子としての役割を証明した点に博士論文としての価値を認めた。