

博士(医学) 平野 功

## 論文題目

The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia

(急性骨髄性白血病において FOXM1 転写因子は細胞周期進行の調節を介して白血病細胞の増殖を促進させる)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

Forkhead box M1 転写因子 (FOXM1) は Forkhead box family に属し、細胞周期調節因子として重要であり細胞増殖の調節に関与している。さらに FOXM1 は脳腫瘍、乳癌、大腸癌そして肝癌など様々な腫瘍において腫瘍形成に関与していると報告されている。しかし、急性骨髄性白血病においては FOXM1 がどのように関与しているかは明らかでない。この研究において我々は急性骨髄性白血病における FOXM1 の役割について解析を行った。

[材料および方法]

研究対象に急性骨髄性白血病細胞株である KG-1 株、U937 株、Kasumi-1 株、YRK2 株および急性骨髄性白血病臨床症例 127 例より分離した急性骨髄性白血病前駆細胞を用いた。急性骨髄性白血病細胞株および急性骨髄性白血病臨床検体由来造血前駆細胞について FOXM1 遺伝子および FOXM1 遺伝子アイソフォームの発現量を RT-PCR 法および定量的 RT-PCR 法で評価した。また、siRNA により FOXM1 遺伝子のノックダウンによる細胞増殖能への影響を細胞数計測およびトリパンブルー染色による生細胞率計測を行って評価した。次に急性骨髄性白血病細胞株について蛍光色素であるヨウ化プロピジウムを用いて細胞当りの DNA 含量をフローサイトメトリー法で測定し、各細胞周期 (G1、G2、および G2/M 期) にある細胞の割合を測定した。また、FOXM1 遺伝子のノックダウンによる各細胞周期への影響も検討した。次に急性骨髄性白血病細胞株について細胞周期に関連するタンパクの発現についてウエスタンブロット法を用いて測定した。FOXM1 遺伝子のノックダウンによる各細胞周期規定タンパク発現への影響も同様に検討した。次に急性骨髄性白血病臨床症例 127 検体 (French-American-British 分類 M1: 21 例、M2: 56 例、M4: 32 例および M5: 18 例) を用いて FOXM1 遺伝子の発現を RT-PCR 法および定量的 RT-PCR 法により評価した。また、FOXM1 タンパクの発現についても蛍光活性細胞分離法を用いて平均蛍光強度測定により評価した。次に急性骨髄性白血病症例からアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の測定により分離した造血前駆細胞を用いてコロニー形成能の評価および RT-PCR 法による FOXM1 遺伝子の発現を評価した。また、FOXM1 遺伝子のノックダウンによるコロニー形成能への影響も検討した。さらに FOXM1 の標的遺伝子であるサイクリン B1 遺伝子および Cdc25B 遺伝子の発現について評価し、FOXM1 遺伝子のノックダウンによるサイクリン B1 遺伝子

および Cdc25B 遺伝子の発現への影響も検討した。

[結果]

急性骨髄性白血病細胞株において健常者由来造血前駆細胞と比較し FOXM1 遺伝子の発現は亢進していたが発現量については各細胞株間で有意差を認めなかった。また、急性骨髄性白血病細胞株における各 FOXM1 アイソフォームの発現量の検討を行ったところ FOXM1B アイソフォームの発現が顕著であり、また、FOXM1C アイソフォームはわずかに発現しているのみであり FOXM1A アイソフォームについては発現を認めなかった。FOXM1 遺伝子のノックダウンにより各細胞周期の分画比率は G1 期および S 期では減少し G2/M 期においては増加していた。さらに、倍数体 DNA 量をもつ細胞の分画も軽度認められた。また、G2/M 期に機能する細胞周期関連タンパクであるサイクリン B1、Survivin、Cdc25B、Aurora-A、Aurora-B、KIS、Skp2、p21<sup>Cip1</sup> および p27<sup>Kip1</sup> の発現を検討したところ細胞周期促進因子である Survivin、Aurora-B、Cdc25B および Skp2 の発現は減弱し、細胞周期抑制因子である p21<sup>Cip1</sup> および p27<sup>Kip1</sup> の発現は減弱していた。次に急性骨髄性白血病症例 127 検体由来白血病前駆細胞において正常造血前駆細胞と比較検討を行ったところ FOXM1 遺伝子発現は 1.65-2.26 倍にわたって亢進しており、また、FOXM1 タンパクについても急性骨髄性白血病症例由来の白血病前駆細胞において発現が亢進していた。FAB 分類による急性骨髄性白血病の病型間においては FOXM1 発現量には有意差を認めなかった。さらに FOXM1 遺伝子のノックダウンにより急性骨髄性白血病症例における造血前駆細胞のコロニー形成能は減弱した。また、急性骨髄性白血病症例の由来白血病前駆細胞において FOXM1 の転写標的である Cdc25B 遺伝子およびサイクリン B1 遺伝子の発現は亢進していたが、FOXM1 遺伝子のノックダウンにより Cdc25B 遺伝子およびサイクリン B1 遺伝子の発現についても抑制された。

[結語]

我々は、この研究において急性骨髄性白血病細胞では FOXM1 の発現が亢進しており中でも FOXM1B アイソフォームの発現が主であることを示した。この FOXM1 発現の異常亢進は、主として細胞周期の全般に関与する細胞周期促進因子の遺伝子発現を促進することによる細胞周期促進を介して急性骨髄性白血病細胞の増殖をもたらすものと考えられた。これらのことから FOXM1 の発現を抑制することは急性骨髄性白血病の治療標的として有効であるものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

[申請者が取り組んだ研究の背景] FOXM1 という遺伝子は細胞周期の制御因子であり、細胞増殖も制御する。さらに多くの発がんに関与することが知られている。しかし、FOXM1 がヒト急性骨髄性白血病(AML)の病態においてどのような役割をしているかはわかっていない。申請者は、AML の細胞内で、FOXM1 がどのような細胞生物学的、分子生物学的働き

をしているのかを調べるためにその発現レベル、アイソフォームの解析、幹細胞に分画における発現、発現を抑制した場合の効果などについて検討したものである。

[実験結果・考察] AMLにおけるFOXM1のアイソフォームはFOXM1Bが主体であり幹細胞分画において高発現していた。また、FOXM1の発現をAML細胞株で抑制すると、G2/M arrestを起こすことで、Aurora kinase B, Survivin, Cyclin B1, S-Phase kinase associated protein 2, Cdc25Bなどのタンパク発現が下がり、逆に、p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>の増加をみた。急性白血病各種計127例の臨床例でもFOXM1の発現は高発現しており、ALDH<sup>hi</sup>の正常の幹細胞分画にくらべても1.65から2.26倍あった。タンパクレベルでは白血病のALDH<sup>hi</sup>分画で正常分画に比べてもつよく発現していた。FOXM1を押さえるとAML由来のALDH<sup>hi</sup>分画の細胞はコロニー形成能を失われた。

[申請者の結論] AMLではFOXM1B1アイソフォームが発現し、この異常な発現が、AMLの細胞増殖に細胞周期の進行を修飾することで寄与していると結論づけた。AMLの病態について新たな機構を提唱した研究である。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦  
副査 難波 宏樹 副査 間賀田 泰寛