

## 幸 宏道 氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

PU.1 は classical Hodgkin lymphoma において細胞増殖停止と細胞死を誘導する  
(PU.1 induces cell growth arrest and apoptosis in classical Hodgkin lymphoma)

B細胞分化に必須の転写因子であるPU.1は、classical Hodgkin lymphomaにおいて、そのプロモーター領域のメチル化の為、その発現の低下が報告されている。申請者らは、bisulfite sequenceを行い、PU.1 プロモーター領域のメチル化を確認すると同時に、PU.1遺伝子の-17kb上流のUREにおいても高度にメチル化されていることを発見し、classical Hodgkin lymphomaにおけるPU.1の発現低下が、そのプロモーターのみならずエンハンサー領域のメチル化の影響もあることを見出した。PU.1の発現低下が、classical Hodgkin lymphomaの増殖に必須かどうか検証するために、その細胞株であるL428とKM-H2に、tet-offの系で、PU.1をテトラサイクリンにて発現制御可能な系を作成し、発現させた場合の増殖の変化を評価した。PU.1を、L428とKM-H2細胞に発現させた場合、完全な細胞増殖停止とアポトーシスが誘導された。更に、テトラサイクリンで発現調節可能にしたL428とKM-H2細胞を免疫不全マウスの皮下に異種移植し、PU.1を発現調節可能な状態で発現させた場合とそうでない場合で増殖の変化を検証すると、PU.1を発現させた場合の細胞株では、有意な腫瘍の増殖停止あるいは腫瘍の縮小が認められ、PU.1を発現させていない場合と比較して有意な生存期間の延長が認められた。同様に、レンチウイルスベクターを用いて、患者検体から純化したHRS細胞にPU.1を発現させた場合も、ベクターのみ導入した場合と比較して、有意なアポトーシスの増加が認められた。classical Hodgkin lymphomaにおけるPU.1発現による細胞増殖停止のメカニズムを解明するために、L428細胞において、PU.1発現前後でDNA マイクロアレイを行い、発現分子を網羅的に解析すると、細胞周期やアポトーシスに関係する遺伝子群の中で、*p21 (CDKN1A)* の有意な上昇が認められた。また、L428細胞において、*p21*に対するsiRNAを用いて、*p21*の発現を抑制すると、PU.1発現後の増殖停止が回避されたことから、L428細胞におけるPU.1発現による増殖停止には、少なくとも部分的に*p21*の発現上昇が関与している可能性が示唆された。これらの結果により、classical Hodgkin lymphomaにおいては、PU.1は、強力な腫瘍抑制因子であることが示され、脱メチル化剤やHDAC阻害剤などによるPU.1の発現誘導が、新たな治療戦略になりうることが示唆された。

審査では、1) PU.1のメチル化のメカニズムや正常細胞での状態について、2) PU.1の強制発現による細胞分化誘導について、3) 正常Bリンパ球では、なぜアポトーシスを起こさないのか、4) 正常Bリンパ球でのPU.1の上昇と癌化の関係、5) *p21*以外の発現が上昇する分子について、6) Non-Hodgkin lymphomaでは、PU.1が発現していてもアポトーシスを起こさないのはなぜか、7) オートファジーとアポトーシスの関係について、9) 腫瘍の年齢依存性やステージの進行とPU.1との関連についてなど、様々な質疑がなされたが、申請者より概ね適切な説明がなされた。本研究は、PU.1の発現とclassical Hodgkin lymphomaとの関係、特にPU.1が発現すれば悪性細胞がアポトーシスを引き起こす点、またPU.1の誘導が、脱メチル化剤、HDAC阻害剤にて誘導できることの発見は、今後この疾患の治療戦略を考える上で非常に重要な知見となり得る。以上より、学位に値すると判断された。

審査委員長 幹細胞誘導学担当教授

江良 扱実