

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 3 0 年 6 月 1 日現在

機関番号： 1 2 6 0 1

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2016 ~ 2017

課題番号： 1 6 H 0 6 7 4 4

研究課題名（和文）慢性骨髄単球性白血病の病態解明と治療標的の探索

研究課題名（英文）Investigation into the pathogenesis and therapy targets of chronic myelomonocytic leukemia

研究代表者

山崎 翔（Yamazaki, Sho）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 0 0 7 7 9 4 0 7

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：慢性骨髄単球性白血病（CMML）は血液がんの一種であり、極めて予後が悪い疾患である。疾患特異的な人工多能性幹細胞（iPS細胞）化技術を用いたCMMLの新規疾患モデルを用いて、網羅的遺伝子解析から病態形成に関わる候補遺伝子SLITRK4を同定し、ノックアウト・転写抑制実験を通して治療標的となりうることを示した。また、Gene Set Enrichment Analysisを用いた解析から、CMML細胞が健常細胞と比較して細胞骨格に関わる遺伝子群を高発現していることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a refractory and recurrent hematopoietic malignancy. We identified SLITRK4 as a causative gene of CMML by using induced pluripotent stem cells (iPSC) from CMML patient-derived leukemic cells. We disrupted SLITRK4 gene in CMML iPSC via CRISPR/Cas9 system, and the production of hematopoietic progenitor cells (HPC) from CMML-iPSC was dramatically attenuated in SLITRK4 dose-dependent manner. In addition, SLITRK4 was knocked down after hematopoietic differentiation from CMML-iPSC and Normal-iPSC, and the number of CMML-HPC-derived colonies was reduced by knockdown of SLITRK4, although Normal-HPC-derived colonies did not change. Next, we performed Gene Ontology Enrichment Analysis and found genes related to cytoskeleton and cell cortex such as SPTA1 and SPTBN1 were highly expressed in CMML-HPC compared to Normal-HPC.

研究分野： 造血器腫瘍

キーワード： 慢性骨髄単球性白血病 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄単球性白血病 (Chronic myelomonocytic leukemia; CMML) は病態が未解明の予後不良な造血器腫瘍である。CMML 患者に対する根治的治療は同種造血幹細胞移植であるが、発症が 65~75 歳前後と高齢である本疾患では適応となることが少なく、分子標的治療薬などによる副作用の少ない新規治療法が強く求められている。これまで適切な CMML の疾患モデルは存在せず病態解明が進んでこなかったが、当研究室では人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) 化技術を用いて革新的な疾患モデルを作製することに成功しており、in vitro および in vivo での病態反映を示してきている。さらに、網羅的遺伝子発現解析とメチル化解析を併せて病態形成に関わる鍵分子の候補を同定することができた。

2. 研究の目的

本研究では候補遺伝子の CMML 発症に関わる役割や正常造血の分化能障害への影響の検証を行う。また、下流シグナル伝達経路を同定して新規の治療ターゲットを発見し、画期的な治療薬開発につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス骨髄の造血前駆細胞にレトロウイルスベクターで SLITRK4 (SLIT and NTRK like family member 4) を過剰発現させ、半固形培地で培養した。コロニー形成能や長期間増殖能のほか細胞形態の観察、表面抗原の解析などを行った。

(2) CMML-iPS 細胞において SLITRK4 をノックダウンさせると血球分化能が落ちることを確認したが、Normal-iPS 細胞においては SLITRK4 をノックダウンした iPS 細胞を得ることができなかった。そこで、RNA 干渉による転写抑制実験を通じて血球分化に及ぼす影響を解析することとした。まず、sh RNA を 3 種類設計し、CMML-iPS 細胞と Normal-iPS 細胞にそれぞれ導入したところ細胞障害性が強く出てしまったため、それぞれの細胞を血球分化させて造血前駆細胞を得たのちにベクターを導入することとした。その後、半固形培地で培養を行いリプレーティング能について評価した。

(3) ヒト CMML 検体を用いて CD34 陽性細胞における SLITRK4 の発現量を定量 PCR 法を用いて調べ、正常骨髄の CD34 陽性細胞における発現量と比較した。

(4) CMML-iPS 細胞由来造血前駆細胞において、Normal-iPS 細胞由来造血前駆細胞と比

較して高発現している遺伝子群について GSEA を用いて解析した。

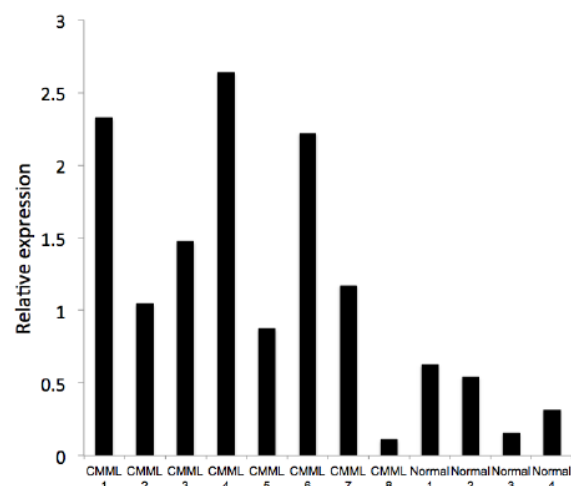
(5) SLITRK4 のノックダウンにより OCI-AML3 (白血病細胞株) は細胞増殖能が低下するため、MAPK 経路、PI3K/Akt 経路などのリン酸化シグナル経路の活性度について違いがないかをウエスタンブロット法により評価した。また、SLITRK4 の発現量の低いヒト白血病細胞株 (HEL、HL-60) を用いて SLITRK4 を過剰発現させ増殖能が変化するかどうか、リン酸化シグナル経路の活性度が変化するかどうかについて評価した。

4. 研究成果

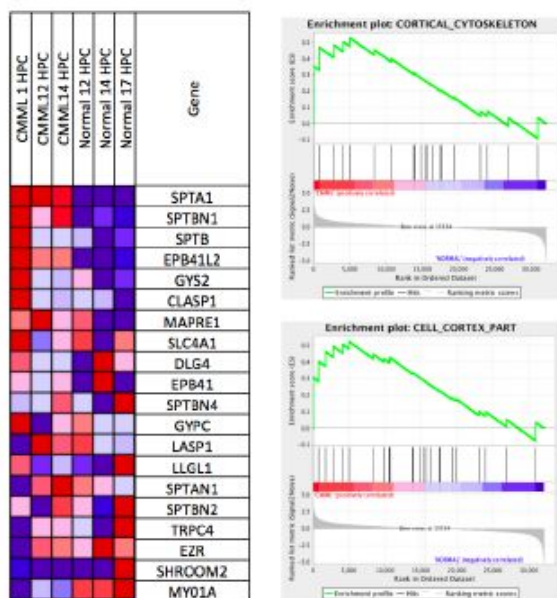
(1) 正常マウス骨髄において SLITRK4 を過剰発現したが、細胞増殖能、半固形培地でのコロニー形成能、分化形態、細胞表面抗原について変化は見られなかった。骨髄異形成症候群のマウスモデルである NHD13 マウスを用いた白血病への促進効果についてはいまだ評価中である。

(2) CMML-iPS 細胞由来造血前駆細胞、Normal-iPS 細胞由来造血前駆細胞それぞれにおいて、SLITRK4 の発現を抑制してコロニー形成能を調べたところ、CMML においてのみ、コントロールベクターを導入した場合と比較してコロニー形成能が落ちていくことをリプレーティングの実験で確認した。

(3) CMML 8 例、正常骨髄 4 例について SLITRK4 の発現量を調べ、CMML においてより発現量が高いことを確認した (下図)。



(4) CMML 細胞では健常細胞と比較して、SPTA1 や SPTBN1 のような細胞骨格に関わる遺伝子群を高発現していることを確認した (次ページ図)。今後、この細胞骨格に関わる遺伝子群が CMML においてどのように病態形成に寄与しているかを明らかにし、治療標的となりうるかを調べることとする。



(5) ヒト白血病細胞株 OCI-AML3 において SLITRK4 の発現を抑制させ、MAPK 経路、Akt 経路の活性度について評価したが、いずれも変化は見られなかった。また、SLITRK4 の発現量の低い HEL 細胞を用いて SLITRK4 を過剰発現させたが、増殖能に違いは見られなかった。同様に主要なリン酸化経路の活性度に違いは見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identified SLITRK4 as a Causative Gene of Chronic Myelomonocytic Leukemia

Sho Yamazaki, Masashi Miyauchi, Mineo Kurokawa

日本がん分子標的治療学会

2018 年

Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identified SLITRK4 as a Causative Gene of Chronic Myelomonocytic Leukemia

Sho Yamazaki, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Masashi Miyauchi, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Mineo Kurokawa

生命科学学会合同年次大会

2017 年

Patient-Derived Induced Pluripotent

Stem Cells Identified SLITRK4 as a Causative Gene of Chronic Myelomonocytic Leukemia

Sho Yamazaki, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Masashi Miyauchi, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Mineo Kurokawa

アメリカ血液学会学術集会

2016 年

Investigation of causative genes in CMML through patient-derived induced pluripotent stem cells

Sho Yamazaki, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Masashi Miyauchi, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Mineo Kurokawa

日本血液学会学術集会

2016 年

Investigation of causative genes in CMML through patient-derived induced pluripotent stem cells

Sho Yamazaki, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Masashi Miyauchi, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Mineo Kurokawa

日本癌学会学術集会

2016 年

〔図書〕(計 2 件)

慢性骨髄単球性白血病の診断におけるフローサイトメトリー法の活用

山崎翔

血液内科

第 73 巻第 3 号 2016 年 p337-339

スプライソソームを標的にした造血器腫瘍の治療の可能性

山崎翔、黒川峰夫

血液内科

第 73 巻第 6 号 2016 年 p809-812

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別：

6．研究組織

(1)研究代表者

山崎 翔 (YAMAZAKI, Sho)

東京大学医学部附属病院・助教

研究者番号：00779407