

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15500

研究課題名(和文)白血病化を完成させるエピジェネティック・マークの探索

研究課題名(英文)detection of essential epigenetic marks for leukemogenesis

研究代表者

黒川 峰夫(Kurokawa, Mineo)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRunx1条件的欠失マウスにNRasG12D遺伝子変異を導入して、急性骨髄性白血病(AML)を発症させた後に変異型NRasをサイレンシングし、前後の白血病幹細胞のエピジェネティックな状態を比較し、AMLの病態形成に必須のエピジェネティックな機序を同定することを試みた。レンチウイルスを用いてRunx1条件的欠失造血幹細胞に様々な感染多重度でNRasを導入することで発現量を様々に調節し、レシピエントマウスに移植した。4か月の観察期間を経てもAMLの発症が見られず、ウイルスによる細胞毒性、発現量不足などの要因が考えられた。現在レトロウイルスやその他の遺伝子異常を用いたモデルを構築中である。

研究成果の概要(英文)：We introduced NRasG12D mutation to hematopoietic stem cells (HSCs) from Runx1 conditional null mice and tried to shut off the expression of mutant NRas after developing acute myeloid leukemia (AML) to compare epigenetic status of leukemia stem cells before and after NRas silencing. Our goal was to elucidate an essential epigenetic mechanism for pathogenesis of AML. We lentivirally transduced NRasG12D into Runx1 flox/flox HSCs with various multiplicity of infection to titrate the expression levels, followed by transplantation into lethally irradiated recipient mice. After four-month observation period, they didn't develop AML, possibly due to cytotoxicity by lentivirus and low expression levels of ectopic NRas G12D. Now we are developing new inducible AML models using retroviral gene transduction and other gene abnormalities.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：epigenetics Runx1 Nras G12D

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)が単一の遺伝子異常で発症するケースは稀であり、通常は2個またはそれ以上の遺伝子変異が、造血幹細胞(HSC)、造血前駆細胞などの未分化な細胞に蓄積することで発症する。個々の遺伝子変異の機能に関する理解が進み、分子によっては標的療法も可能になっているが、それぞれの異常がどの程度AMLの発症に寄与するか、また複数の異常を有するAMLの治療に際して、どの分子を標的とするべきかについては、未知のままである。

これまでの研究は、AMLはジェネティックな疾患であるという前提のもとに進められ、AMLの発症や、骨髄異形成症候群(MDS)などの前白血病状態からAMLへの病態進行は、遺伝子異常の出現が決定的に重要であると考えられている。しかし以下のような事実から、我々はAMLの病態形成にエピジェネティックな因子も重要な役割を果たしているという仮説に至った。

- ・MDSを経てAMLに進展する場合、変異遺伝子数の増加はわずかであり、病態進展の決定打となる遺伝子変異が見つからないことも多い。

- ・AML発症に十分な遺伝子変異が出現してもすぐにAMLを発症するわけではなく、完全なAMLとしての性質を獲得するためには一定の期間が必要である。

- ・AMLの進行はクローンの多様化を伴うことが多いが、AML患者で経時的に造血細胞をサンプリングし、遺伝子変異からジェネティックなクローン構成の多様性を、CpG部位のメチル化の細胞間差からエピジェネティックなクローンの多様性を算出して比較すると、新たな遺伝子変異の出現よりも先に、異なるDNAメチル化パターンを有する多彩なクローンが出現する。

- ・エピジェネティック調節遺伝子の異常が重なると、単独効果の和では説明できない相乗的なエピジェネティックな異常が出現し、その相乗的な異常がAMLの病態形成に深く関与している。

さらにAMLにおいて2個の遺伝子異常が重なった時に、片方の、例えば増殖シグナル伝達異常を薬剤で治療しても、耐性獲得は不可避であり、これは複数の異常のうち片方のみを是正しても、治療としては不十分である場合が多いことを示唆している。また膵癌のp53ハプロ欠失+Kras変異マウスモデルのようにより直接的に、膵癌発症後にKras遺伝子の発現をoffにしても腫瘍が残存するという事実も知られている。これらの現象は、単独では腫瘍化しない遺伝子異常でも、複数有する状態が続いて一度腫瘍化が起こると、いずれかの異常を正常に戻しても、腫瘍性の状態が固定することにより、腫瘍の病態が戻らないという可能性を示唆する。

そこで本研究では、2種類の遺伝子異常が合併することで初めてAMLを発症するよう

なマウスモデルを用いて、様々なタイミングでそれぞれの遺伝子異常を取り除いて、HSCの性質の変化を分化能・増殖能などの側面からモニターする。原因となる遺伝子異常を取り除いてもAMLとしての性質が固定する、あるいはHSCの正常の分化能が失われるようなモデルを用いて、AMLとしての性質を固定化させるエピジェネティックな基盤を明らかにし、さらにその基盤の形成に関わる因子を探索し、治療法探索に向けた端緒とする。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病(AML)は様々な遺伝子異常を蓄積し前白血病状態を経て進行するジェネティックな疾患と理解されているが、前白血病状態とAMLの間には分化ブロックの有無という決定的な違いがあるにも関わらず、その進行を決定付けるジェネティックな因子(遺伝子変異)が見つからない場合も多い。本研究では前白血病状態からAMLへの移行にエピジェネティックな因子が重要な役割を果たしているという仮説の下、2個の遺伝子異常で初めてAMLを発症し、原因となる遺伝子異常を取り除いてもAMLとしての性質が固定する、あるいはHSCの正常の分化能が失われるようなマウスAMLモデルを用いて、AMLとしての性質を固定化させるエピジェネティックな基盤を明らかにし、治療開発の端緒にすることを目的とする。

急性骨髄性白血病(AML)が単一の遺伝子異常で発症するケースは稀であり、通常は2個またはそれ以上の遺伝子変異が、造血幹細胞(HSC)、造血前駆細胞などの未分化な細胞に蓄積することで発症する。個々の遺伝子変異の機能に関する理解が進み、分子によっては標的療法も可能になっているが、それぞれの異常がどの程度AMLの発症に寄与するか、また複数の異常を有するAMLの治療に際して、どの分子を標的とするべきかについては、未知のままである。

これまでの研究は、AMLはジェネティックな疾患であるという前提のもとに進められ、AMLの発症や、骨髄異形成症候群(MDS)などの前白血病状態からAMLへの病態進行は、遺伝子異常の出現が決定的に重要であると考えられている。しかし以下のような事実から、我々はAMLの病態形成にエピジェネティックな因子も重要な役割を果たしているという仮説に至った。

- ・MDSを経てAMLに進展する場合、変異遺伝子数の増加はわずかであり、病態進展の決定打となる遺伝子変異が見つからないことも多い。

- ・AML発症に十分な遺伝子変異が出現してもすぐにAMLを発症するわけではなく、完全なAMLとしての性質を獲得するためには一定の期間が必要である。

- ・AMLの進行はクローンの多様化を伴うこ

とが多いが、AML 患者で経時的に造血細胞をサンプリングし、遺伝子変異からジェネティックなクローン構成の多様性を、CpG 部位のメチル化の細胞間差からエピジェネティックなクローンの多様性を算出して比較すると、新たな遺伝子変異の出現よりも先に、異なる DNA メチル化パターンを有する多彩なクローンが出現する。

・エピジェネティック調節遺伝子の異常が重なると、単独効果の和では説明できない相乗的なエピジェネティックな異常が出現し、その相乗的な異常が AML の病態形成に深く関与している。

さらに AML において 2 個の遺伝子異常が重なった時に、片方の、例えば増殖シグナル伝達異常を薬剤で治療しても、耐性獲得は不可避であり、これは複数の異常のうち片方のみを是正しても、治療としては不十分である場合が多いことを示唆している。また膀胱癌の p53 ハプロ欠失+Kras 変異マウスモデルのように直接的に、膀胱癌発症後に Kras 遺伝子の発現を off にしても腫瘍が残存するという事実も知られている。これらの現象は、単独では腫瘍化しない遺伝子異常でも、複数有する状態が続いて一度腫瘍化が起こると、いずれかの異常を正常に戻しても、腫瘍性の状態が固定することにより、腫瘍の病態が戻らないという可能性を示唆する。

そこで本研究では、2 種類の遺伝子異常が合併することで初めて AML を発症するようなマウスモデルを用いて、様々なタイミングでそれぞれの遺伝子異常を取り除いて、HSC の性質の変化を分化能・増殖能などの側面からモニターする。原因となる遺伝子異常を取り除いても AML としての性質が固定する、あるいは HSC の正常の分化能が失われるようなモデルを用いて、AML としての性質を固定化させるエピジェネティックな基盤を明らかにし、さらにその基盤の形成に関わる因子を探索し、治療法探索に向けた端緒とする。

3. 研究の方法

単独では AML 発症能を持たないがエピジェネティックな影響を介して他因子と協調して AML を発症させるようなモデルの候補として、我々は Runx1^{flox}×Mx1-Cre マウスを樹立した。この poly(I:C) を投与して造血細胞特異的に転写因子 Runx1 をノックアウトしたマウス(Runx1Δ/Δ)の HSC は、単独では腫瘍化しないものの、前白血病性状態としての性質を有すると考えられ、ヒト AML でも RUNX1 の異常は高率に見出されるため、これらのマウスはいずれもヒト AML の高頻度病型の病態を反映したモデルになると考えられる。さらに、Runx1Δ/Δ の HSC は NrasG12D 変異が存在する場合に AML 様病態を起こすことが知られている。ヒト AML においても RUNX1 機能喪失型変異と RAS 変異は共存しやすい。

これらの知見から、1st ヒット遺伝子異常を

有するマウスの HSC に、協調して AML を引き起こす遺伝子異常(2nd ヒット)として、テトラサイクリン誘導性に発現する NrasG12D 遺伝子を導入し、経時的な AML 発症について検討する。この際、レトロウイルスを用いて NRasG12D を導入した AML モデルのように、発症後急速に死に至るような激烈な AML では今回のような経時的な解析に適さないと考えられた。そこで NRas 発現量が比較的強くコントロール可能であり、また正常造血幹細胞の白血化に至る過程を明らかにするためにも、造血幹細胞への遺伝子導入可能な、テトラサイクリン誘導性レンチウイルスを用いて NRasG12D を Runx1Δ/Δ の HSC に導入して白血病モデルを作製することを試みた。

まずはこのモデルマウスで 2nd ヒットにあたるがん遺伝子の発現をテトラサイクリンにより誘導して AML を発症させることを試みた。末梢血を経時的に観察し、AML 発症前、あるいは AML が発症したことを確認後に、2nd ヒット遺伝子の発現を off にすることで、遺伝子異常を修復し、修復後にマウスの末梢血を観察し、AML 細胞が消失するか残存するかを観察するとともに、経時的に骨髄から幹細胞を濃縮する未分化な細胞分画を採取して、同種マウスへの移植実験やメチルセルロース培地でのコロニー形成実験を行い、HSC、AML としての分化能・増殖能を評価する。このような尺度で評価した時に、遺伝子異常を修復しても AML 細胞が残存するモデルを見出し、そのモデルを用いて解析を行う予定とした。

4. 研究成果

単独では急性骨髄性白血病(AML)を発症しないような遺伝子異常を 2 つ導入してはじめて AML を発症するマウスモデルを作成し、AML を発症させた後に片方の遺伝子の発現をサイレンシングすることによって、AML が消失する場合としない場合とで白血病幹細胞(LSC)レベルで生じているエピジェネティックな状態を比較し、AML の病態形成に必須のエピジェネティックな機序を同定することを試みた。

Runx1 コンディショナルノックアウトマウスの造血前駆細胞に対して、テトラサイクリン誘導性レンチウイルスを用いて NRasG12D を導入し白血病モデルの作製を試みた。様々な MOI (multiplicity of infection) で造血幹細胞に NRas を導入することで NRas 発現量を様々な調節して、レシピエントマウスに移植した。4 か月の観察期間を経ても AML の発症が見られず、レンチウイルスによる細胞毒性、発現量の不足などの要因が考えられた。レトロウイルスを用いた Runx1 ノックアウト+誘導型 NRasG12D 導入白血病モデルの他、我々の研究室で確立した AML モデルを改変した p53 欠失誘導型 JAK2V617F 白血病モデルを準備したので、これらのマウスが AML を発症し次第、がん遺伝子のサイレンシングを行

いう、エピジェネティックな解析を行うことを予定している。

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 29 件)

Kurokawa M. (他 7 名, 8 番目) .
Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. *Blood*. 128:1614-24. 2016. 査読有、doi: 10.1182/blood-2015-12-684696.

Kurokawa M. (他 9 名, 10 番目) .
Adiponectin enhances antibacterial activity of hematopoietic cells by suppressing bone marrow inflammation. *Immunity*. 44:1422-33. 2016. 査読有、doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.010

Kurokawa M. (他 26 名, 21 番目) Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet*. 48:569-74. 2016. *Nature Genetics*. 査読有、doi: 10.1038/ng.3535.

Kurokawa M. (他 13 名, 9 番目) . miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. *Scientific Reports*. 6:19204. 2016. 査読有、doi: 10.1038/srep19204.

〔学会発表〕(計 31 件)

Kurokawa M. (他 6 名, 7 番目) .
Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identified SLITRK4 As a Causative Gene of Chronic Myelomonocytic Leukemia, 58th ASH Annual Meeting and Exposition, 2016 年 12 月 3 日～9 日, アメリカ

Kurokawa M. (他 9 名, 10 番目) ..
Pre-HPCs derived from CML-iPSCs represent a platform for analysis of TKI-resistant CML stem cells, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 13 日～15 日, 横浜

Kurokawa M. (他 5 名, 6 番目) .
Identification of somatic mutation contributing to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia, 58th ASH Annual Meeting and Exposition, 2016 年 12 月 3 日～9 日, アメリカ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://u-tokyo-hemat.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 峰夫 (KUROKAWA, Mineo)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80312320