

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09947

研究課題名(和文)自己免疫性造血不全におけるdel(13q)クローン活性化機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms underlying preferential commitment of hematopoietic stem cells with del(13q) in patients with autoimmune hematopoietic failure

研究代表者

石山 謙 (Ishiyama, Ken)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60377380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性造血不全において、13番染色体長腕の部分欠失(del(13q))を持つ造血幹細胞が優先的に活性化されるメカニズムに、この欠失領域に位置するOLFM4の変異が関与しているか否かを明らかにするために、TF-1細胞及びヒトCD34陽性細胞におけるOLFM4 KOまたはノックダウンの影響を検討した。その結果OLFM4は、TGF- $\beta$ による造血幹細胞の赤血球分化を抑制しており、その発現低下は、GPIアンカー膜蛋白であるCD109の欠失と同様に、TGF- $\beta$ 存在下での造血幹細胞の赤血球分化を促進させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

del(13q)という染色体異常を持つ再生不良性貧血患者では、なぜ例外なくPNH型血球が検出されるのは不明であった。今回の検討により、del(13q)により生じたOLFM4遺伝子のハプロ不全が、PIGA変異と同様に、造血幹細胞のTGF- $\beta$ に対する感受性を高め、その結果として、del(13q)陽性血球とPNH形質の血球が検出されやすくなることが、初めて示唆された。その結果として、PNH型血球の増加に、PIGA変異造血幹細胞のTGF- $\beta$ に対する感受性の低下が関与していることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify a role of OLFM4, a gene located in the commonly deleted region of 13q, in the preferential commitment of hematopoietic stem cells (HSCs) with del(13q) in patients with autoimmune hematopoietic failure, we examined the effects of OLFM4 knockout or knockdown in a leukemia cell line TF-1 and CD34+ cells derived from iPS cells or from cord blood. The OLFM4 gene downregulation promoted erythroid differentiation of both TF-1 and CD34+ cells induced by TGF- $\beta$ . Similarly augmented erythroid differentiation was observed in HSCs that underwent the knockout of a GPI-anchored protein CD109. Haploinsufficiency of OLFM4 as a result of del(13q) may thus explain the preferential commitment of HSCs with del(13q) in bone marrow failure patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-phenotype cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：自己免疫性造血不全 13番染色体長腕の部分欠失(del(13q)) OLFM4 TGF- $\beta$  赤血球分化 CD109

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血 (aplastic anemia: AA) は末梢血の汎血球減少と骨髄の低形成を特徴とする症候群である。特発性 AA では、ほとんどの例が免疫学的機序による造血幹/前駆細胞 (hematopoietic stem/progenitor cells: HSPCs) の抑制によって発症すると考えられている。このような HSPCs に対する免疫学的な攻撃の結果、治療により改善した AA 患者の末梢血では、自己免疫により選択された遺伝子変異 HSPCs によるクローン性造血がしばしば検出される。その代表的なものが、glyco-sylphosphatidylinositol (GPI) アンカー膜蛋白を欠失した、発作性夜間血色素尿症 (PNH) にみられる血球 (PNH 型血球) である。しかし、免疫病態による AA において *PIGA* 変異 HSPCs がどのようにして選択されるのかは分かっていない。

*PIGA* 変異 HSPCs と同様に、免疫病態の結果、選択を受けて増殖すると考えられている異常 HSPCs に del(13q) がある。del(13q) を持つ骨髄不全は、WHO 分類では骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) の中の unclassifiable (MDS-U) に分類されるが、骨髄に形態異常を伴うことはほとんどなく、免疫抑制療法によって改善しやすい良性の骨髄不全である (Ishiyama, et al. *Br J Haematol* 2002)。その後の我々の検討により、del(13q) を持つ MDS の長期予後は、PNH 型血球陽性の AA と同等であることが明らかになった (Hosokawa, Ishiyama, et al. *Haematologica* 2012)。興味深いことに、del(13q) を持つ骨髄不全では、全例が PNH 型血球の増加を伴っていた。PNH 型顆粒球をソーティングして del(13q) の有無を FISH 法で検討したところ、del(13q) は非 PNH 形質の顆粒球にのみ認められた。この所見は、免疫病態による骨髄不全において del(13q) HSPCs が選択されて増殖するのは、*PIGA* 変異 HSPCs が選択されるのと同じメカニズムによることを示唆している。すなわち、del(13q) HSPCs が他の正常 HSPCs よりも優先的に活性化される機序が分かれば、*PIGA* 変異 HSPCs 選択のメカニズムも明らかにすることができる可能性がある。

そこで del(13q) 陽性 HSPCs の「優先的な活性化」に關与する遺伝子を同定するため、7 例の AA における 13q の切断点を調べたところ、全例で *SMAD9* や *RB1* を含む q13.3-q14.3 領域を欠失していた。しかし、この領域に位置する遺伝子の中に、その産物の量的減少が HSPCs の活性化に關与することが知られているものは同定できなかった。

次に、del(13q) は認めないが、免疫抑制療法によって改善した AA 患者の顆粒球では 13q13.3-q14.3 領域に、del(13q) に相当する何らかの遺伝子変異が存在するのではないかと、という仮説を立てた。免疫抑制療法が奏効し、安定した造血を長期間維持している del(13q) 異常のない AA 患者 8 例 (PNH 型血球陽性 5 例、陰性 3 例) を対象として顆粒球 DNA の全エクソシーケンシングを行ったところ、そのうち 6 例に、各例で重複のない計 27 種類の遺伝子変異が同定された。そのほとんどは、AA や MDS では報告のない意義不明の遺伝子であったが、それぞれ 1 例に検出された *LRCH1* (leucine-rich repeats and calponin homology domain containing 1) と *OLFM4* (olfactomedin 4) は、13 番染色体長腕の共通欠失領域に位置する遺伝子であった。*LRCH1* は細胞骨格の足場蛋白をエンコードしている蛋白であり、ショウジョウバエを用いた研究で、細胞のアクチン重合を負に制御していることが示されている (*Plos One* 2010)。一方、*OLFM4* はカドヘリンを介して細胞内の重合アクチンと相互作用し、また *OLFM4* 自身を介して細胞同士の結合を果すことが報告されている。ただし、これらの遺伝子変異が造血幹細胞の活性化に關与しているか否かは不明であった。

金沢大学がん進展制御研究所の田所・平尾らは、造血幹細胞の自己複製に關わる *Spred1* の変異がアクチン重合の促進を介して造血幹細胞の自己複製を誘導することを、*Spred1* ノックアウト (KO) マウスを用いた研究で明らかにした (*Cell Stem Cell* 2018)。*LRCH1*・*OLFM4* はともにアクチン重合を調節している可能性があることから、*LRCH1*・*OLFM4* のハプロ不全を起こした造血幹細胞は、*Spred1* 変異を起こした造血幹細胞と同様に、アクチン重合促進の結果として活性化されやすくなっている可能性がある。さらに、造血幹細胞上にはアクチン重合を調節する何らかの GPI アンカー膜蛋白が存在しており、*PIGA* 変異幹細胞ではその GPI アンカー膜蛋白が欠失するため、炎症性サイトカインの存在下では、del(13q) 造血幹細胞と同時に活性化されやすくなっている可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

自己免疫性造血不全において、del(13q) 造血幹細胞が優先的に活性化されるメカニズムへの *LRCH1* と *OLFM4* の変異の關与の有無を明らかにするために、以下の検討を行う。

- 1) *LRCH1*・*OLFM4* 変異が造血幹細胞のアクチン重合に実際に影響を及ぼすか否かを、CRISPR-Cas9 による KO 白血病細胞株及び患者 iPS 細胞由来の造血幹細胞を用いて明らかにする。
- 2) *PIGA* 変異についても同様の検討を行い、造血幹細胞のアクチン重合を抑制する GPI アンカー型レセプターのリガンドを同定する。
- 3) *LRCH1*・*OLFM4* 変異導入及び *PIGA* 変異導入 iPS 細胞を作製し、それぞれにおける HSPCs 誘導効率と、免疫不全マウスの造血再構築能を正常 iPS 細胞由来 HSPCs との間で比較する。

### 3. 研究の方法

#### 1) *LRCH1* および *PIGA* 遺伝子の KO がアクチン重合に及ぼす影響

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株の K562 を対象として、レンチウイルスベクターを用いた CRISPR-Cas9 システムにより *LRCH1* を KO し、種々のサイトカインで刺激した野生型 K562 と KO 細胞株との間で、アクチン重合および細胞形態の変化を観察する。アクチン重合は、細胞浮遊液をスライドガラスに乗せ、各サイトカインを含む溶液と混合して接着させたのち、重合アクチンを特異的に染色するファロイジンで染色することにより、共焦点顕微鏡を用いて観察する。

#### 2) *LRCH1* によるアクチン重合抑制メカニズムの解明

造血抑制に関与しうる種々のサイトカイン刺激が、ERM を含めた細胞内シグナル伝達経路のどの分子をリン酸化し、*LRCH1* がこのリン酸化にどのような影響を及ぼすのかを、*LRCH1* KO 細胞と野生型細胞とを比較することにより明らかにする。

#### 3) *OLFM4* 欠失がアクチン重合に及ぼす影響の検討

*LRCH1* と同様に、*OLFM4* および *PIGA* の KO 細胞株を作製し、アクチン重合との関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

自己免疫性造血不全において、13 番染色体長腕の部分欠失 (del(13q)) を持つ造血幹細胞が優先的に活性化されるメカニズムへの *LRCH1* と *OLFM4* 変異の関与の有無を明らかにするために、13 番染色体長腕に位置する *LRCH1*、*OLFM4*、*PIGA* の 3 遺伝子に対し、CRISPR-Cas9 系を用いて K562 細胞株からの KO を試みた。*OLFM4* を KO した K562 細胞および TF-1 細胞は、いずれも赤血球分化を示した。これは、TGF- $\beta$  のシグナリングを抑制する「TGF- $\beta$  の co-receptor」CD109 を KO した TF-1 と同様の現象であった。*OLFM4* は、大腸がん細胞において、TGF- $\beta$  のシグナリングを抑制していることが報告されている。牛胎児血清 10% を含む RPMI1640 中には、造血前駆細胞を赤血球に分化させる低濃度の TGF- $\beta$  が含まれることから、*OLFM4* は、造血前駆細胞においても TGF- $\beta$  のシグナリングを抑制しており、*OLFM4* が KO された K562 細胞や TF-1 細胞では、TGF- $\beta$  シグナリングが促進される結果、赤血球分化が誘導されることが示唆された。Primary 細胞における *OLFM4* の役割を明らかにするため、AA 患者の単球から作製した iPS 細胞から、OP9 細胞と WEHI 3B 細胞の培養上清を用いて CD34 陽性細胞を誘導したところ、誘導された CD34 陽性細胞は *OLFM4* を強発現していた。この CD34 陽性細胞を、siRNA を用いてノックダウンしたところ、*OLFM4* を KO した細胞株と同様に、コントロールと比較して赤血球系への分化がみられた。また、臍帯血由来の CD34 陽性を同じ siRNA でノックダウンしたところ、やはり同様に赤血球系への分化傾向が見られた。同様の現象は、CD109 をノックダウンした臍帯血由来 CD34 細胞でも観察された。一方、*OLFM4*-KO 細胞株では *GATA-1* 発現の亢進がみられた。これらの結果から、*OLFM4* は、TGF- $\beta$  による造血幹細胞の赤血球分化を抑制しており、その変異は、CD109 の欠失と同様に、TGF- $\beta$  存在下における造血幹細胞の赤血球分化を促進することが示唆された。

抗 *LRCH1*、*OLFM4* 抗体を使用し、ウエスタンブロッティングおよびフローサイトメトリーにより両遺伝子の KO 細胞株を評価したところ、*LRCH1* の KO 株は得られなかったが、*OLFM4* と *PIGA* の KO 株を樹立することができた。そこで野生型 K562 と、*OLFM4*-KO および *PIGA*-KO K562 との間でウシ胎児血清下でのアクチン重合誘導を比較したが、アクチン重合を定量的に評価することは困難であった。一方、一部の顆粒球は細胞内の *OLFM4* をフローサイトメトリーで検出することができることが報告されていたことから、抗 *OLFM4* 抗体を用いて *OLFM4* 陽性顆粒球を検出する系を確立し、健常者と del(13q)陽性者との間で陽性細胞に差がみられるかを検討した。これによって del(13q)顆粒球が検出されることを期待したが、del(13q)顆粒球の有無によらず AA 患者では *OLFM4* 陽性顆粒球割合が高い傾向がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 中尾 眞二<br><br>(Nakao Shinji)<br><br>(70217660) | 金沢大学・医学系・教授<br><br><br><br>(13301)       |    |
| 連携研究者 | 平尾 敦<br><br>(Hirao Atsushi)<br><br>(90343350) | 金沢大学・がん進展制御研究所・教授<br><br><br><br>(13301) |    |