

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15781

研究課題名（和文）GATA2変異による遺伝性MDS由来iPS細胞を用いた分子発症機序の解明

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of MDS using GATA2-mutated iPS cells.

研究代表者

西尾 美和子（Nishio, Miwako）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30623318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：GATA2変異による遺伝性MDS患者の末梢血リンパ球から樹立したヒトiPS細胞を用いてMDSの分子発症機序の解明を目的として研究を行った。  
2019年の異動とともに、引き続き他造血器腫瘍の発症機序の解明へ応用させるべくEBウイルス関連疾患の患者由来iPS細胞の樹立を試み、日本ワックスマン財団研究助成金獲得へつながった。今後さらに研究を発展させるため競争的資金への応募を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者由来iPS細胞を用いて造血器腫瘍の発症機序の解明を行うことで、発症機序が明らかになっていない造血器腫瘍の新規分子標的治療の開発につなげることが可能となる。  
本研究により作製したiPS細胞を再分化させることによって、患者から直接採取することのできない量の疾患細胞を用いた各種解析が可能となった。生理学的条件に近い状態で検討できる他にはない新たな手法であり、造血器腫瘍の発症機序を解明するうえで有用である。

研究成果の概要（英文）：We established GATA2-mutated induced pluripotent stem (iPS) cells derived from familial myelodysplastic syndromes (MDS) pedigrees.  
After relocation in 2019, we challenged to elucidate the pathogenesis of other hematopoietic tumors.  
We established iPS cells derived from EB virus-associated disorders patients. We have obtained new competitive funds and further develop our research in the future.

研究分野：再生医療学

キーワード：GATA2 骨髄異形成症候群（MDS） EBウイルス 慢性活動性EBウイルス感染症（CAEBV） iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) 多発家系の遺伝子解析から、germline 変異による MDS/AML が同定されている。これまでに常染色体優性遺伝の家族性 MDS/AML の原因として、GATA2、RUNX1、CEBPA や DDX41 の体細胞遺伝子変異を同定し、単独遺伝子変異による若年発症家族性 MDS 家系を明らかにしている (Watanabe-Okochi et al., Blood 111; 4297-4308, 2008. Harada et al., Blood 121; 3434-3446, 2013. Inoue et al., Leukemia 29; 847-857, 2015)。これらの germline 変異だけでは MDS/AML 発症には至らないが、遺伝子異常の積み重ね、あるいは何らかの抑制機構の破綻など、発症に至るまでにはいくつかの段階を経ることがわかってきている。

一方、GATA2 の germline 変異は、家族性 MDS/AML の原因となるだけでなく、孤発性・家族性に発生する原発性リンパ浮腫「Emberger 症候群」、単球減少により Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症を繰り返す「MonoMAC 症候群」、あるいは樹状細胞 (dendritic cell)、単球 (monocyte)、B-およびNK-リンパ球 (lymphocyte) の減少により MAC・真菌・ウイルス易感染症を示す「DCML 欠損症」といった免疫不全症候群を呈する。GATA2 半数体不全では、10代から易感染性症状が出現し、MDS/AML の発症年齢中央値は15歳 (7~35歳) と若年であり、30歳での生存率は62%と極めて予後不良である。骨髄は低形成で線維化を合併しやすく、染色体異常として第7染色体異常を伴うことが多い。

GATA2 は造血幹細胞の発生・維持に重要な転写因子であることはすでに知られているが、これらの臨床像から血球分化の初期のみならず、造血幹細胞以降の血球分化、あるいは成熟血球の機能発現においても重要な役割を担っていると考えられる。GATA2 変異による造血分化機構の破綻が MDS 発症に関連していると考えられている。よって、GATA2 変異造血幹細胞を様々な環境下で長期間培養し、生化学的・生物学的機能解析を行うことによって MDS の分子発症機序を解明できると考えられた。

### 2. 研究の目的

多段階の遺伝子異常蓄積を経て発症すると考えられる骨髄異形成症候群 (MDS) では、これまでに様々な遺伝子異常が同定されてきた。GATA2 変異は、常染色体優性遺伝を呈する家族性 MDS の原因遺伝子異常であり、MDS 発症の中心的役割を担うマスター遺伝子異常である。GATA2 変異にどのような多段階の分子異常の蓄積がおこって MDS の発症に至るのか、未発症家族性 MDS 患者の末梢血リンパ球から樹立したヒト iPS 細胞を用いて、「GATA2 変異による遺伝性 MDS 由来 iPS 細胞を用いた分子発症機序の解明」を目的とする。

異動に伴い、引き続き他造血器腫瘍の病態解明を目指すべく、慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) の発症機序の解明を目的とし、研究を進展させることとした。

CAEBV はごくありふれた EB ウイルスが T もしくは NK 細胞に感染し、活性化、腫瘍化するリンパ増殖性疾患である。希少かつ難治性であり、唯一の根治療法は造血幹細胞移植のみであり、移植に至らない場合、極めて予後不良である。本疾患の問題点は、発症機序が解明されていないこと、化学療法抵抗性を示し至適薬物治療法は未確立であること、の2点である。症例の集中する本邦でこれら2点を含めた解析を行い、世界に情報を発信する必要がある。CAEBV 患者検体から iPS 細胞を作製し、CAEBV 発症を実証し、分子発症機序の解明を目指す。この研究によって、CAEBV 分子発症機序が明らかになり、分子発症機序に基づいた適切な治療選択、さらには新規の分子標的治療法の開発に役立てると確信している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 家族性 MDS 由来 iPS 細胞の樹立

GATA2 変異を有する2家系の家族性 MDS の MDS 患者から末梢血リンパ球を無菌的に単離し、確立されている方法により2種類の GATA2 変異 iPS 細胞 (R396W と P250A) を樹立した。

#### (2) 家族性 MDS 由来 iPS 細胞から造血幹細胞への再分化

GATA2 変異 iPS 細胞を iPS-SAC 法で造血前駆細胞まで分化させた。CD34 陽性細胞の解析を行った。

#### (3) 骨髄移植モデルマウスの作製

GATA2 変異をマウス造血幹細胞に過剰発現させた。

#### (4) MDS 発症家族性 GATA2 変異患者検体の全エクソン解析

MDS 発症家族性 GATA2 変異患者の骨髄 DNA と類粘膜 DNA を用いて全エクソン解析を行った。

#### (5) 慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 患者由来 iPS 細胞の樹立

CAEBV 患者から末梢血リンパ球を無菌的に単離し、センダイウイルスベクターを使用して初期化因子を導入し、確立されている方法により、iPS 細胞を樹立した。なるべく多数の患者からの樹立を試みている。

### 4. 研究成果

GATA2 変異を有する2家系の家族性 MDS の MDS 患者から末梢血リンパ球を無菌的に単離し、確立されている方法により2種類の GATA2 変異 iPS 細胞 (R396W と P250A) を樹立した。GATA2 変異 iPS 細胞を iPS-SAC 法で造血前駆細胞まで分化させたところ、正常 iPS 細胞と比較して有意に CD34 陽性細胞が減少していた。また、骨髄移植モデルマウスを作製し、GATA2 変異をマウス造血

幹細胞に過剰発現させると、分化した顆粒球系細胞が著減していた。このことから GATA2 変異単独ですでに造血幹細胞の分化障害が生じていることが明らかとなった。

次に、先天的な GATA2 変異に後天的な付加的遺伝子変異が加わって MDS が発症すると考え、MDS 発症家族性 GATA2 変異患者の骨髄 DNA と頬粘膜 DNA を用いて全エクソン解析を行った。その結果、MDS の進展に関わる複数の遺伝子変異を同定した。その中に一つである Gene X について、付加異常としての機能解析を開始した。GATA2 変異 iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞に Gene X を遺伝子導入し、OP9 細胞上で長期培養を行い、MDS の血液学的特徴を獲得するかを検討している。同時に両遺伝子をマウス造血幹細胞に導入した骨髄移植モデルマウス作成に着手した。異動に伴い、他造血器腫瘍の発症機序の解明へと応用させるべく EB ウイルス関連疾患の患者由来 iPS 細胞の樹立を試み、日本ワックスマン財団研究助成金の獲得へつながった。慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) は全身の持続する炎症と EBV に感染した T 細胞、NK 細胞のクローナルな増殖を認める希少難治性リンパ腫である。唯一の根治療法は造血幹細胞移植で、CAEBV 発症機序の解明とそれに基づいた有効な薬剤の開発は喫緊の課題である。また本疾患は本邦を始めとする東アジアからの報告がほとんどで欧米からの報告は極端に少ない。症例の集中している本邦で解析し世界に有用な情報を発信する必要がある。

なぜ、通常は疾患の原因となることはない EB ウイルスが、一部のヒトでのみ T もしくは NK 細胞に感染し、活性化、腫瘍化して CAEBV に至るのか、その問いを明らかにすべく、CAEBV 患者由来 iPS 細胞を用いた CAEBV の分子発症機序の解明を目指し、研究を遂行することとした。今後さらに研究を進展させるため競争的資金への応募を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊木 優喜、大橋 彩香、吉森 真由美、西尾 美和子、新井 文子
2. 発表標題 Epstein-Barr (EB) ウイルス陽性T細胞株におけるエクソソーム分泌の検討
3. 学会等名 第14回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中家 瞳、澤田 めぐみ、富田 知里、吉森 真由美、大橋 彩香、呉 詩星、立石 萌、西尾 美和子、新井 文子
2. 発表標題 健常若年成人におけEpstein-Barrウイルス感染実態の検討
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新谷直樹、西尾美和子、原田結花、原田浩徳
2. 発表標題 造血器腫瘍における抗がん剤、G-CSF製剤が与える影響の解明
3. 学会等名 第21回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Harada H, Shingai N, Nishio M, Komatsu N, Harada Y,
2. 発表標題 Molecular mechanisms to development myeloid neoplasms by RUNK1 or MLL chimeras in human CD34+ cells
3. 学会等名 ISEH 46th Annual Scientific Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新谷直樹、原田結花、櫻井弘子、尾形洋輔、赤羽浩太、西尾美和子、土岐典子、大橋一輝、萩原政夫、小松則夫、原田浩徳
2. 発表標題 スプライシング関連遺伝子異常が運命づけるMDS表現型の解析
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾形洋輔、新谷直樹、赤羽浩太、西尾美和子、土岐典子、香西康司、萩原政夫、大橋一輝、小松則夫、原田結花、原田浩徳
2. 発表標題 環状鉄芽球を伴う骨髄異形成症候群におけるスプライシング関連遺伝子異常
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学 先端血液検査学 / 血液疾患治療開発学  <a href="https://labohematology.jimdo.com/">https://labohematology.jimdo.com/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 結花  (Harada Yuka)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 浩徳  (Harada Hironori)		
研究協力者	新井 文子  (Arai Ayako)		