

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16109

研究課題名（和文）慢性骨髄単球性白血病の分子病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular pathogenesis 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：00779407

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）：慢性骨髄単球性白血病（CMML）は予後が悪い血液がんの一つであり、画期的な標的治療薬の開発が求められている。CMML細胞においては、健康者の骨髄細胞と比較して細胞骨格に関わる遺伝子群の発現レベルが高いことに着目し、治療標的となりうるか調べることにした。これらの遺伝子群の転写調節のみでは白血病発症能や血球分化能などの機能に変化を及ぼさなかったため、ノックアウト細胞を用いた実験やメタボローム解析に関して準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性骨髄単球性白血病（CMML）は予後不良の血液がんの一つであり、根治治療は同種造血幹細胞移植のみである。より副作用の少ない標的治療が求められており、CMML細胞において発現レベルの高い、細胞骨格に関わる遺伝子群に注目している。本研究では、これらの遺伝子の発現レベルの調節により白血病発症能や血球分化能に明らかな影響を与えることは示されなかったが、今後遺伝子のノックアウト実験やタンパク質レベルの代謝に注目した解析を行うことで治療標的となりうるかを示せる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a hematopoietic malignancy with a poor prognosis, and the development of targeted therapies is required. The expression level of cytoskeleton-related genes in CMML cells is higher than that of healthy bone marrow cells, so we investigated whether these genes could be a potential therapeutic target. Regulation of the transcription level of these genes did not alter functions such as leukemogenesis or hematopoietic differentiation, and we are making preparations for experiments using knockout cells and metabolome analysis.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：慢性骨髄単球性白血病 細胞骨格

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1．研究開始当初の背景

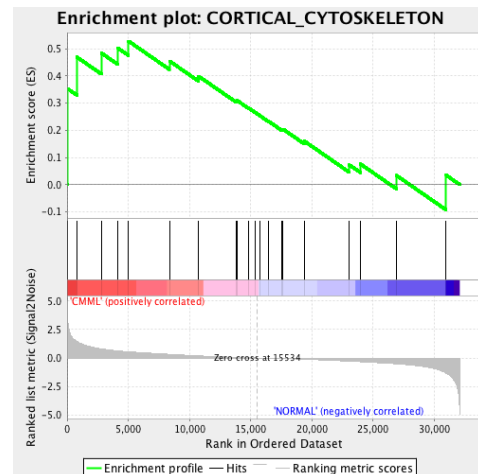
（１）慢性骨髄単球性白血病（CMML）は、極めて予後が悪い血液がんの一つである。根治的療法は同種造血幹細胞移植のみであるが、発症年齢が高齢であるため適応とならないことが多く、分子標的療法などの副作用の少ない画期的な治療法が求められている。

（２）CMML には適切な疾患モデルがなく、患者検体において染色体異常や遺伝子変異が解析されているくらいである。これまで申請者らは、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作製し、マルチオミクス解析から病態形成に関わる候補遺伝子 *SLITRK4* を同定し治療標的となりうることを示してきた。また同時に、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ている。

2．研究の目的

（１）細胞骨格に関わる *SPTA1* や *SPTBN1* などの遺伝子が CMML においてどのように病態形成に寄与しているかを正常マウス骨髄、骨髄異形成症候群モデルマウス骨髄、iPS 細胞などを用いた機能解析により明らかにし、治療標的となりうるか調べる。

（２）上記の機能解析で治療標的が定まらなかった時のために、代謝経路・産物に着目したメタボローム解析を行うために試料を準備しておく、また治療標的の候補を決めた後の検証のために CMML 患者の臨床検体を収集しておく。



3．研究の方法

（１）骨髄異形成症候群マウスモデルの骨髄より採取した幼若造血細胞に対象となる遺伝子を導入し、メソカルト上で培養し、コロニー形成能や長期間増殖能の変化を調べる。さらに、遺伝子導入した細胞の一部は別のマウスへ移植する。遺伝子の強制発現を併せることで、骨髄異形成症候群の発症や死亡までの期間や発症に必要な移植細胞数の変化が起こるか、また発症する造血器腫瘍の性質について解析する。

（２）CMML 細胞由来 iPS 細胞（CMML-iPS 細胞）において RNA 干渉による転写抑制実験を行い、血球分化に及ぼす影響を解析する。CMML-iPS 細胞と健常者の骨髄細胞由来 iPS 細胞に shRNA をそれぞれ導入し、C3H10T1/2 細胞と共培養することにより造血幹・前駆細胞（HSC）へ分化させる。また、テトラサイクリンで転写抑制のコントロールが可能なシステムを用いることで、既に血球まで分化した段階での発現抑制による影響を解析する。

（３）CMML 症例の骨髄・末梢血検体の収集を行い、単核球分離後、凍結保存しておく。CMML の治療標的候補が定まった時点で順次検証を行っていく予定である。

（４）CMML-HSC と正常骨髄細胞由来 iPS を血球分化させた造血幹・前駆細胞（Normal-HSC）との比較において細胞骨格と関わりを持つような代謝産物についてターゲットメタボロミクスを行うための試料を準備する。

4．研究成果

（１）細胞骨格に関わる遺伝子群の中で、CMML-HSC において正常骨髄細胞由来 iPS 細胞を血球分化させた HSC と比較して特に発現量の高かった遺伝子 *SPTA1*、*SPTBN1* に注目して機能解析を行った。骨髄異形成症候群モデルである NHD13 マウス、正常骨髄マウスモデルの骨髄より採取した幼若造血細胞に、これらの遺伝子を強制的に高発現させ、メソカルト上で培養し、コロニー形成能・細胞形態について調べたが、変化は見られなかった。

（２）CMML-iPS 細胞において RNA 干渉による転写抑制実験を行ったが、血球分化させた段階において、CD34 陽性 CD43 陽性細胞で定義される CMML-HSC の数や割合に変化は見られなかった。このため、CRISPR/Cas9 システムによるノックアウト実験を行うこととし、CMML-iPS 細胞に *SPTA1*、*SPTBN1* のターゲットサイト（PAM 配列）を組み込んだ pRGEN-U6 ベクターと pRGEN-Cas9-EF1a ベクターをエレクトロポレーションにより同時に

遺伝子導入した。シングルセルレベルで培養し増殖させたところでシーケンス解析を行いノックアウトできているクローンを得ることができたため、この細胞を用いて血球分化能や白血病発症能に変化が起こるか調べていく。

(3) CMML-HSC、Normal-HSC を用いたメタボローム解析について試料を準備中である。

(4) 別に、CMML 患者検体を 9 検体収集し、単核球分離後凍結保存している。

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 (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
--	---------------------------	-----------------------	----