

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16120

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍におけるドライバー変異クローンの腫瘍化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clonal development of hematopoietic progenitor cells with driver mutation in myeloproliferative neoplasms

研究代表者

宮脇 恒太 (Miyawaki, Kohta)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：50774709

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)：近年の研究から、健康人の末梢血中血液細胞には白血病などの造血器腫瘍の要因となるゲノム変異(ドライバー変異)が高頻度で存在すること(CHIP)が明らかになった。この事実は、造血器腫瘍発生のためには、ドライバー変異に加えて“何らかのメカニズム”が必要であることを示唆している。CHIPとしても同定され、かつ本態性血小板増多症(ET)のドライバー変異として知られるJAK2変異クローンが、造血幹細胞からの分化の過程において、どのように増殖能力を獲得するのか、そのメカニズムを探求する研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHIPの存在は昨今の血液学の発見の中でも極めてインパクトの大きいものであり、CHIPからの腫瘍化のメカニズムの解明は現在重要な課題となっている。すなわち、CHIPの獲得は加齢現象として避けることは難しいが、腫瘍化のメカニズムが解明されれば、CHIPの他にどのような因子を有している人間が腫瘍化しやすいのか、というリスク因子が明らかになり、腫瘍化に必要な因子を標的にすることで効果的な新規治療戦略開発が可能になる。このように、本研究内容は、腫瘍の病態メカニズムの解明にとどまらず、予防医学・治療医学など造血器腫瘍に対して多面的に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies revealed that driver mutations of hematologic malignancies could be found in white blood cells in healthy individuals, what we call “CHIP.” The existence of CHIP suggested that driver mutation itself is not sufficient, and some additional factors should be required for leukemogenesis. To address the background mechanisms of this, we analyzed JAK2 mutation clones in bone marrow from essential thrombocythemia patients and healthy individuals. We first identified prospectively-isolatable and functionally homogeneous human megakaryocyte progenitor. By performing comparative analysis in hematopoietic stem/progenitor populations, including MegP, we identified several key factors that potentially contribute to the acquisition of growth advantage for JAK2 mutant clones.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：巨核球前駆細胞 本態性血小板増多症 骨髄増殖性腫瘍 CHIP ドライバー変異 シングルセル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、健常人の末梢血中血液細胞には、白血病などの造血器腫瘍の要因となるゲノム変異（ドライバー変異）が、想定以上に高頻度で存在すること（Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis, CHIP）が明らかになった。CHIPは加齢とともに、より多くの健常人に、そして個人の中ではより多くの頻度で、認められるようになる。このことはすなわち、ドライバー変異自体は、造血器腫瘍発生のための必要条件ではあっても十分条件ではなく、発症のためには“他の何らかのメカニズム”が必要、ということの意味している。CHIPが加齢変化として不可避である以上、この“何らかのメカニズム”こそが、腫瘍発生機序の解明や新たな造血器腫瘍発症予防や新規治療戦略構築の鍵となる。

また、CHIPとしても同定されているJAK2変異は、本態性血小板増多症（ET）のドライバー変異として知られており、骨髄中の巨核球や末梢血中の血小板の増多をもたらす。一方、真性多血症（PV）は同じJAK2変異をドライバー変異とするにもかかわらず、赤血球系細胞の著明な増加を認める。このように同じドライバー変異であっても、異なる細胞系統に影響を及ぼし、異なった臨床像をもたらす事実もまた、CHIPの獲得から造血器腫瘍発症に至るまでの過程において、ドライバー変異の獲得プラスアルファの“他の何らかのメカニズム”の重要性を物語っている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ドライバー変異を有するクローンがCHIPとして存在している段階から造血器腫瘍を発症するまでのメカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

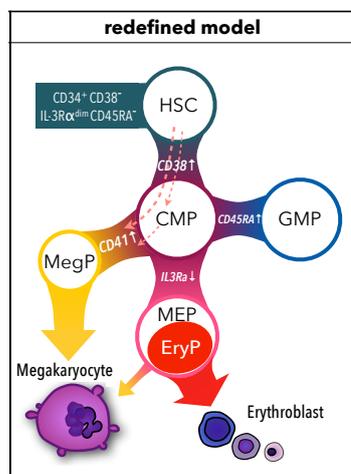
我々はCHIPから造血器腫瘍を発症するモデルとして、ETの発症について研究を行った。

一般に、腫瘍の形成は、組織幹細胞から成熟細胞へ分化する経路において、分化が停止し（または偏り）、増殖能力を獲得することによって起こると考えられている。すなわち、このような腫瘍化のメカニズムを理解する上で、正常の分化経路を理解することは不可欠なことである。そこで、我々は、造血幹細胞から巨核球や血小板に分化する分化経路を明らかにすることにした。

その上で、明らかにした分化経路のどの段階でJAK2変異を有するクローン（腫瘍クローン）が増殖能力を獲得するのかを、デジタルPCRの手法を用いて各分化段階の細胞を単一細胞、単一アレルレベルでJAK2変異を検出することで、探索した。さらに、（一般的にCHIPを獲得している頻度が極めて低いと考えられる）若年健常人の骨髄における各分化段階の細胞と、網羅的遺伝子発現パターンを比較することで、JAK2変異クローンがどのようなメカニズムで腫瘍化をするのかを検討した。

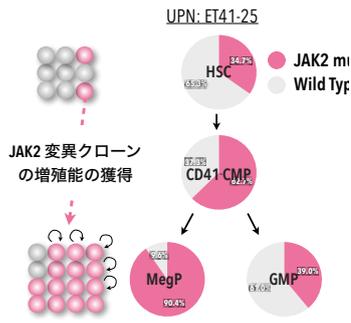
## 4. 研究成果

### (1) 正常造血システムの分化経路の解明



これまで、ヒトでは造血幹細胞から巨核球への分化経路はその実験系の難しさなどから、解明が遅れていた。特に、造血幹細胞からの分化過程における巨核球系造血の起源、すなわち巨核球・血小板系への分化が運命づけられた細胞、すなわち巨核球前駆細胞（MegP）の明確な定義はなされてこなかった。我々の研究グループでは、ヒト骨髄中の赤芽球系前駆細胞を同定した（Proc Natl Acad Sci USA.2015;112:9638）に続き、MegPの同定を行った。単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行うことで、骨髄球系共通前駆細胞（CMP）の中に巨核球系統の遺伝子を特異的（赤芽球系や顆粒球・単球系の遺伝子発現を認めない）に発現している細胞集団を発見した。さらにこの細胞集団に特異的に発現している細胞表面蛋白（CD41）を同定することで、MegPを汎用性の高い細胞集団として定義し、セルソーター等で前方視的に分取することを可能にした。

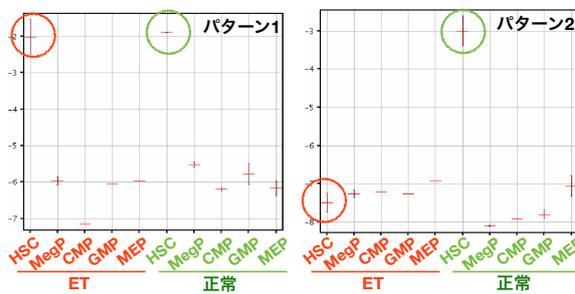
## (2) 腫瘍クローンの増殖する分化段階の同定



ET のドライバー変異であり、かつ CHIP の一つである JAK2 変異を有するクローンは、造血幹細胞 (HSC) のレベルでも確かに存在している。しかしながら、この段階ではまだ増殖能力は低いために正常の HSC よりも少ない頻度で骨髄中に存在している。しかしながら、HSC から分化して前駆細胞、特に MegP の段階になると、増殖能力を獲得し、正常クローンを遙かに凌ぐ数となり、MegP 中の殆どの細胞は JAK2 変異クローンで占められることが明らかになった。一方、顆粒球・単球系前駆細胞 (GMP) では造血幹細胞レベルと同等の頻度で同クローンが存在することから、JAK2 変異クローンは顆粒球・単球系細胞にも存在するが、

巨核球・血小板系統への分化の過程において、特に強い増殖能力を獲得することが示唆され、結果として血小板数の増加という ET の臨床的特徴を獲得すると考えられる。

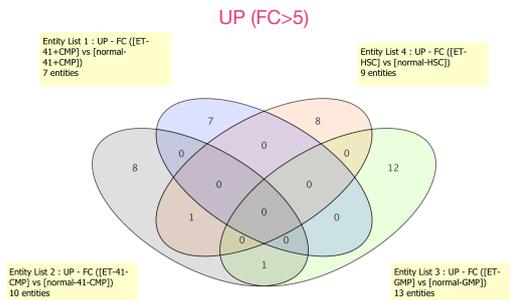
## (3) JAK2 変異クローンが増殖能力を獲得するメカニズムの検討



JAK2 変異クローンが増殖能力を獲得する背景を理解するために、ET 患者および若年正常骨髄の造血幹・前駆細胞分画ごとに、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その発現パターンを検討した。その結果をもとに、HSC レベルでは発現差を認めず、JAK2 変異クローンが増殖能力を獲得するステップ (MegP) において特異的に、かつ ET 患者特異的に (左図、パターン2) 発現が亢進している (抑制されている) 遺伝子を探索した。

統計学的処理を用いた解析を用いた遺伝子の絞り込みを行った結果、該当する遺伝子は左のベン図の通り同定した (左図は発現が亢進している遺伝子)。

現在これらの遺伝子がどのようにして、JAK2 変異クローンが系統特異的に増殖能力を獲得する過程に関与しているのか、そのメカニズムを探索している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮脇恒太
2. 発表標題 Identification and characterization of human unipotent megakaryocyte progenitor
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----