

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16858

研究課題名（和文）免疫不全マウスを用いた異種移植によるTAM芽球のhomingに関わる解析

研究課題名（英文）The analysis of blast homing by xenotransplantation of transient abnormal myelopoiesis blast into immunodeficient mice

研究代表者

早川 誠一（Seiichi, Hayakawa）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：60815314

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）：本研究では、ダウン症に合併する一過性骨髄異常増殖症（TAM）の胎児肝での発症、骨髄での再発にTAM芽球のhomingに関わる分子の関与について検討した。

末梢血よりTAM芽球を分離し、in vitroの培養により、胎児肝との相互作用に関与している分子としてEPCR、骨髄への異動に関わるCXCR4の誘導を行った。EPCRはUM729濃度依存的に発現が増加し、CXCR4は低酸素培養にて発現が増加することが確認された。未刺激、EPCR発現誘導、CXCR4発現誘導したTAM芽球をそれぞれ、新生仔および成体免疫不全マウスに異種移植を行ったが、芽球の生着は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の主たる目的である一過性骨髄異常増殖症（TAM）の発症と再発にTAM芽球のhomingに関わる分子の発現の違いが関与していることを証明することができなかった。しかし、homingに関わる分子の発現が関与していないというネガティブデータを示したことで、TAM芽球のhomingに関わる分子を誘導する培養条件を確認できたことは本研究の成果と考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the involvement of the molecules associated with homing of TAM blasts in the development of transient abnormal myelopoiesis (TAM) associated with Down syndrome in the fetal liver or its recurrence in the bone marrow.

TAM blasts were isolated from peripheral blood of the baby diagnosed with TAM and cultured in vitro to induce EPCR as a molecule involved in interaction with fetal liver and CXCR4 as a molecule involved in homing into bone marrow. EPCR expression increased in a UM729 concentration-dependent manner, and CXCR4 expression increased in hypoxic culture.

TAM blasts unstimulated and induced to express EPCR or CXCR4 were xenotransplanted into neonatal and adult immunodeficient mice, but no TAM blast detected, respectively.

研究分野：新生児

キーワード：一過性骨髄異常増殖症 急性巨核芽急性白血病 ダウン症 異種移植

## 1. 研究開始当初の背景

一過性骨髄異常増殖症 (TAM : transient abnormal myelopoiesis) は、5~10%に発症するダウン症候群の合併症の一つで、一過性に末梢血中に白血病細胞が出現する疾患である。大部分の TAM は自然寛解する予後良好な疾患であるが、10~20%は重症化し早期死亡に至ることや、自然寛解した症例の約 20%が骨髄性白血病 (ML-DS : myeloid leukemia associated with down syndrome) を発症することが TAM の治療管理における問題点である (文献 1)。ML-DS を発症した場合は自然寛解することはない、長期間の化学療法が必要とされるため、ML-DS 発症が予防できればダウン症患者の QOL の向上ならびに医療経済利益につながると考えられる。重症 TAM の治療として、少量シタラピン療法による予後の改善が示されているが、ML-DS 発症予防への効果はないとされており、現時点で ML-DS 発症予防に効果的な治療は確立されておらず、さらなる研究が必要とされている (文献 2)。

胎児において、造血幹細胞は AGM 領域から開始される二次造血より産生される。胎児造血環境は AGM 領域から胎児肝へ、そして出生前には骨髄へ移行する。胎児肝 niche との相互作用に関与している分子として EPCR (Endothelial protein C receptor) が報告されている (文献 3)。また、出生直前に造血幹細胞は成体での造血がおこる骨髄へ移動するが、この過程に重要な分子の代表として CXCR4 と SDF-1 の相互作用が知られている。このことから、胎児肝にて発症する TAM と、骨髄にて再発する ML-DS において造血環境への homing にかかわる分子が関与している可能性を推測した。さらに、TAM の研究において、TAM から ML-DS への移行に関連する研究は、腫瘍細胞としての増殖に関わる付加的遺伝子変異の検索が主体で、胎児肝から骨髄への homing に関する検討は報告されていないことから、本研究の発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、造血環境への造血幹細胞の移動に関与する分子の発現が TAM 芽球においても同様に変化し、TAM と ML-DS 発症に影響していると仮説を立て検証を行うことを目的とした。TAM を発症する肝臓へ homing する芽球と、ML-DS を発症する骨髄へ homing する芽球それぞれにおいて、EPCR や CXCR4 など homing に関連する分子の発現に違いがないかを検証する。TAM 芽球を *in vitro* で処置し、CXCR4、EPCR それぞれの発現を誘導し、前処置を行った TAM 芽球の免疫不全マウスへの異種移植により homing する臓器や生着率に違いがないかについて解析することで、TAM、ML-DS 発症の病態解明につながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

広島大学病院新生児集中治療室へ入院となり、21 トリソミー、TAM と診断された児を対象とした。児の御両親より同意を取得後に、診療にて採取した末梢血より単核球を分離し、液体窒素にて凍結保存した細胞を研究に用いた。フローサイトメトリー法を用いて表面抗原が TAM 芽球に矛盾しない事を確認した。さらに、分離した単核球を細胞表面抗原によりリンパ球、TAM 芽球に分類し、TAM 芽球の純度を確認した。

TAM 芽球の *in vitro* での培養条件は、コントロール : DMEM+10%ウシ胎児血清+rIL-3(50ng/ml)、EPCR 誘導条件 1 : DMEM+10%ウシ胎児血清+rIL-3(50ng/ml)+UM729(pyrimido- [4,5-b]-indole derivative) 500nM/ml、EPCR 誘導条件 2 : DMEM+10%ウシ胎児血清+rIL-3(50ng/ml)+UM729 5  $\mu$  M/ml、CXCR4 誘導条件 : DMEM+10%ウシ胎児血清+rIL-3(50ng/ml)+低酸素(0.1% $O_2$ , 5% $CO_2$ )の4つの条件で行った。

～ の条件では 24 時間培養後に細胞を回収した。 低酸素培養は 6 時間培養後に細胞を回収した。フローサイトメトリーを用いて、それぞれの培養した細胞における EPCR (CD201) と CXCR4 (CD184) の発現を解析した。

使用抗体は anti-CD45-FITC (BD)、anti-CD3-FITC, PE(BD)、anti-CD19-PE (BD)、anti-CD184-PE (BD)、anti-CD201-APC (BD) anti-CD34-FITC (BD) anti-CD33-PE (BD) , anti-CD117-APC (BD) を用いた。染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。解析は FACSVerse (BD Biosciences)、BD FACSuite™ software を用いた。

低酸素培養を除いた上記 ～ それぞれの培養条件における in vitro での細胞増殖の評価を行った。96well 丸底プレートに、1well あたり、 $1 \times 10^4$  の単核球を播種し 5%CO<sub>2</sub>. 37 ° で培養を行った。3 日毎に培養液を交換し、細胞数を評価した。

異種移植は、遺伝子改変により IL-2 受容体  $\gamma$  鎖の完全欠損させた NSG マウス (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) を用いて、新生仔マウスは生後 24 時間以内、成体マウスは 8 ~ 12 週齢のマウスの異種移植を行った。成体マウスは 2.4Gray、新生仔マウスは 1.0Gray の照射により移植前処置を行い、成体マウスは 500 $\mu$ l ( $5 \times 10^6$  個) を tail vein より、新生仔マウスは 100 $\mu$ l ( $1 \times 10^6$  個) を facial vein より輸注を行った。成体マウスは移植後 2 か月後に安楽死させ、骨髄を採取し芽球の生着をフローサイトメトリーにて確認した。新生仔マウスは移植後 1 週間で安楽死させ、肝臓、骨髄を採取し芽球の生着をフローサイトメトリーにて確認した。

統計解析は Bonferroni 補正 Mann-Whitney 検定を用い、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

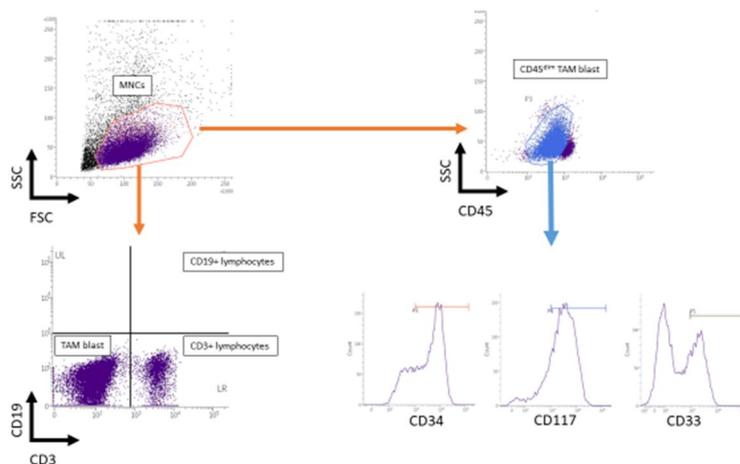
研究は広島大学疫学研究倫理審査委員会の承認を受けている (免疫不全マウスを用いた異種移植による TAM 芽球の homing に関わる解析、E2020-2043)

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) TAM 芽球の採取

末梢白血球の染色体 G 分染法にて 47,XX,+21、芽球の遺伝子解析にて *GATA1* Exon2 にフレームシフト変異 (c.183\_187 del CTACT, p.Tyr62Glnfs\*4) を認め、21 トリソミー、一過性骨髄異常増殖症と診断した症例を対象とした。液体窒素で凍結保存した単核球を解凍して実験に用いた。回収した単核球を、フローサイトメトリー法により FSC, SSC にて展開した細胞分画ならびに CD45dim 分画から TAM 芽球として同定し、TAM 芽球分画において CD33, CD34, CD117 の発現を確認した。CD33, CD34, CD117 の発現は TAM 芽球と矛盾しなかった。フローサイトメトリー法にて単核球中の TAM 芽球の純度は  $83.6 \pm 3.7\%$  であり、全ての実験で用いた細胞は計画書に記載された 50%以上の純度であることを確認した ( Fig1 )

Fig.1



##### ( 2 ) TAM 芽球の in

vitro での培養

それぞれの条件による in vitro での培養後に CD184 (CXCR4) と CD201 (EPCR) の発現をフロ

ーサイトメトリーにて解析した ( Fig.2-1 )。TAM 芽球において、CXCR4 の発現は低酸素培養において増加する傾向であった。EPCR の発現は UM729 濃度依存性に増加した ( Fig.2-2 )。

Fig.2-1

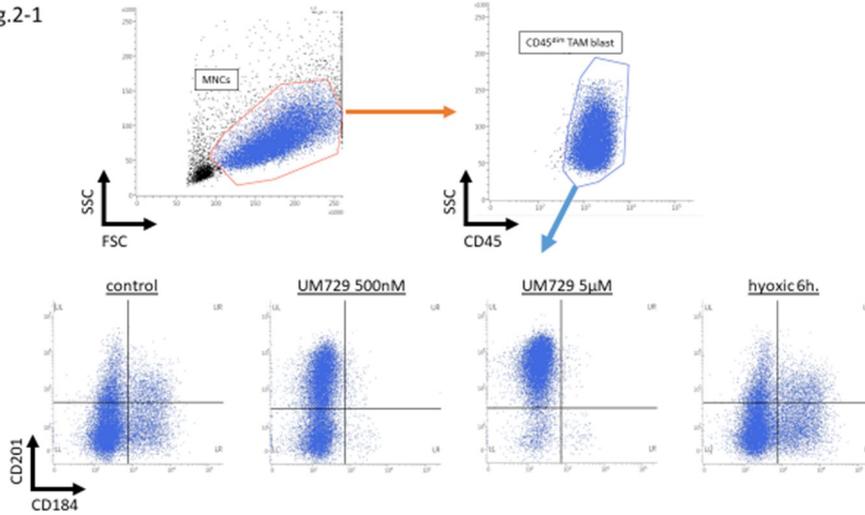
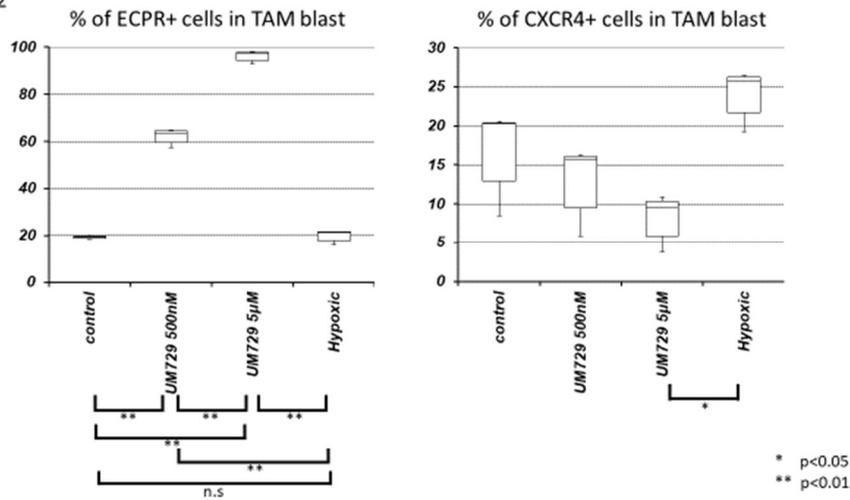
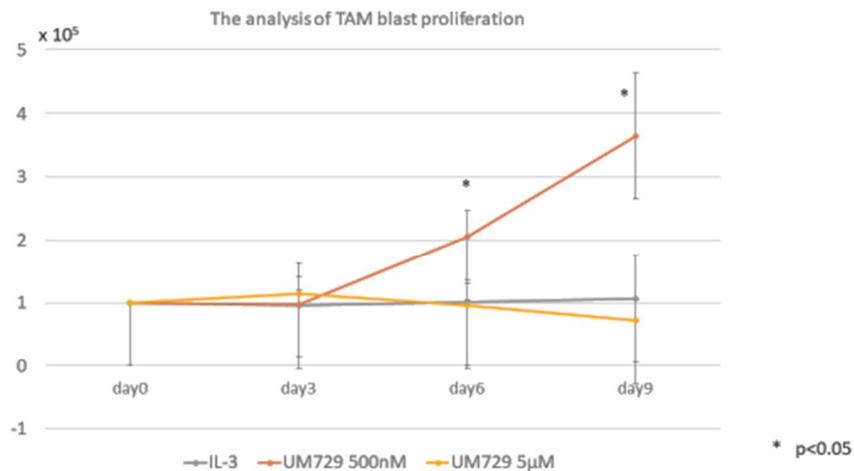


Fig.2-2



コントロール、EPCR 誘導条件 ( UM729 500nM/ml、UM729 5 μ M/ml ) の 3 つの条件での in vitro の培養で、TAM 芽球の細胞増殖能を解析した。コントロール、UM729 5μM/ml の条件では細胞増殖は認めなかったが、UM729 500nM/ml の培養では培養 6 日目より有意な細胞増殖を認めた ( Fig.3 )

Fig.3



### (3) TAM 芽球の免疫不全マウスへの異種移植

コントロール、EPCR 誘導条件 1 (UM729 500nM/ml)、EPCR 誘導条件 2 (UM729 5  $\mu$ M/ml)、CXCR4 誘導条件にて培養した TAM 芽球を成体マウス 16 匹 (それぞれの条件で 4 匹ずつ)、新生仔マウス 8 匹 (それぞれの条件で 2 匹ずつ) に異種移植を行った。成体マウスは異種移植後 2 ヶ月で生存していたコントロールの 2 匹、EPCR 誘導条件 1 の 2 匹、EPCR 誘導条件 2 の 1 匹、CXCR4 誘導条件の 2 匹で解析を行ったが、骨髄における TAM 芽球の生着は確認できなかった。新生仔マウスでは異種移植後 72 時間以内に全例死亡のため、長期的な生着の評価は不可能であったが、死亡時の解析においても TAM 芽球は同定されなかった。

これまでの報告で、ML-DS の発症には TAM 芽球の中で白血病発症する能力をもつサブクローンが関わっており、ML-DS を再発した患者の TAM 芽球において免疫不全マウスへの異種移植で TAM 芽球の生着が報告されている (文献 5)。今回の症例では現時点で ML-DS 発症は確認されておらず、白血病を再発するサブクローン存在しない場合は homing に関わる分子の発現調整では、異種移植において TAM 芽球の生着は得られない可能性が考えられた。今後は症例数を増やして更なる検討を行う必要がある。

#### 【参考文献】

- 1) Watanabe K. *Pediatr Int.*, 61: 222-229, 2019
- 2) Flasiński M. et al. *Blood Adv.*, 10: 1532-1540, 2018
- 3) Iwasaki H. et al. *Blood*, 116: 544-53, 2010
- 4) Fares I. et al. *Blood*. 129: 3344-3351, 2017
- 5) Satoshi Saida et al. *Blood*. 121: 4377-87, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fumiaki Sakura et al. Seiichi Hayakawa (23人中15番目)	4. 巻 2
2. 論文標題 A complementary approach for genetic diagnosis of inborn errors of immunity using proteogenomic analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad104.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akari Nakamura-Utsunomiya et al. Seiichi Hayakawa (31人中3番目)	4. 巻 97
2. 論文標題 Identification of clinical factors related to antibody-mediated immune response to the subfornical organ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Endocrinol (Oxf).	6. 最初と最後の頁 72-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14737.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyuki Tsumura, Mizuka Miki, Yoko Mizoguchi, Osamu Hirata, Shiho Nishimura, Moe Tamaura, Reiko Kagawa, Seiichi Hayakawa, Masao Kobayashi, Satoshi Okada	4. 巻 149
2. 論文標題 Enhanced osteoclastogenesis in patients with MSMD due to impaired response to IFN-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 252-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.05.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 David Egg et al. Seiichi Hayakawa (76人中13番目)	4. 巻 149
2. 論文標題 Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 736-746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.04.039.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 S Goda, S Hayakawa, S Karakawa, S Okada, H Kawaguchi, M Kobayashi	4. 巻 204
2. 論文標題 Possible involvement of regulatory T cell abnormalities and variational usage of TCR repertoire in children with autoimmune neutropenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13559.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

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

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------