

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790909

研究課題名（和文）骨髄増殖性腫瘍の発症ならびに病型選択における分子機序の解明

研究課題名（英文）Molecular Pathogenesis of Primary Myelofibrosis Mouse

研究代表者

金子 新 (KANEKO SHIN)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40361331

研究成果の概要（和文）：慢性的な血液腫瘍である骨髄増殖性腫瘍の一病型としての原発性骨髄線維症モデルマウスを新たに開発した。このマウスは安定して骨髄の線維化をきたし、その分子病態はヒトで観察される原発性骨髄線維症にきわめて類似している。また本疾患においては異常造血と線維化の亢進のみならず、正常造血幹細胞の疲弊も同時に起こすことが明らかになった。本マウスを駆使した新たな分子標的治療の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a model mouse of primary myelofibrosis using genetically modified hematopoietic stem cell transplantation. Progression manner and molecular pathogenesis of bone marrow fibrosis in the mouse have closely resembled to those of the human disease. Using the mouse model, we have demonstrated that normal HSCs also can be affected to lose stem cell potentials in fibrotic marrow. The newly established mouse model would be useful for developing new molecular therapies against primary myelofibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学、癌幹細胞生物学、骨髄増殖性腫瘍、原発性骨髄線維症、造血幹細胞、疾患モデル動物、STAT5A

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍（MPN；Myeloproliferative neoplasm）は造血幹細胞（HSC；Hematopoietic stem cell）の異常に起因し、多様な病型を示す疾患である。近年 Janus kinase 2（JAK2）の V617F 活性型変異（JAK2V617F）が真性多血症（PV）の90%以上、本態性血小板血症（ET）の50%、骨髄線維症（MF）の30%にみられる主要な原因

遺伝子異常として同定された。JAK2V617F 陰性 MPN における遺伝子異常も幾つか知られるが、最終的には JAK2-STAT5 経路の異常活性化を惹起することから、ほとんどの MPN において STAT5 の恒常的リン酸化が病因の本質なのではないかと推測されている。

以前に当研究室では、恒常的活性化 STAT5A をコードする STAT5A(1\*6)遺伝子を導入した CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性

lineage 抗原陰性 (CD34-KSL) の表現形を持つマウス HSC が MPN 病態を引き起こすことと、CD34 陽性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 lineage 抗原陰性 (CD34+KSL) 造血前駆細胞(HPC)はその能力を持たないことをマウス骨髄移植モデルを用いて示した (Kato et al, *J Exp Med*, 2005)。つまり最も純化された HSC レベルにおける STAT5 の異常活性化が MPN を惹起し得ること、そして長期骨髄再建能を持たない HPC に於いては少なくとも STAT5 の活性化のみでは腫瘍化を惹起できないことが明らかになった。言い換えれば、疾患の持続に必要な MPN 幹細胞 (増殖している MPN 腫瘍細胞とは異なる) は STAT5 が異常活性化する HSC 分画に存在することを示した。

その後我々は、STAT5A(1\*6)遺伝子を 40 個の 34-KSL 幹細胞にレトロウイルスベクターで導入したマウス骨髄移植モデルの作製と解析を進め、本モデルが高い確率で末梢血中の血球成分の増加を伴わない高度な骨髄線維化を 2 ヶ月程度で発症することを見出した。その間に、線維化の進行に先立つ異形巨核球と顆粒球の増加、赤芽球の減少、進行性の脾腫を認めることから、いわゆる primary myelofibrosis (PMF) の前線維化期から線維化期の病態を良く模していると考えた。本モデルは MPN/PMF 病態解析のツールとして有用であるのみならず、異常活性化 STAT5 を標的とした薬物療法や分子療法など治療法の評価にも有用であると考えられた。

一方、JAK2V617F を骨髄細胞へ遺伝子導入する方法、もしくはトランスジェニック (TG) 法を用いることで PV や ET などの MPN を発症する疾患モデルマウスが報告されている。特に TG モデル (Tiedt et al, *Blood*, 2008、Shide et al, *Leukemia*, 2008、Xing et al, *Blood*, 2008、Akada et al, *Blood*, 2010、Marty et al, *Blood*, 2010) では単一の JAK2V617F 変異を導入することで PV、ET、MF-like を呈するマウスが産出され、JAK2V617F の発現量によって少なくとも PV と ET の両病型が規定されることが推察されている。しかしこれらの報告では、我々の STAT5A(1\*6)/HSC 移植マウスほどヒトの PMF に類似した臨床像を作り出せていない印象がある。JAK2V617F においてもエフェクター分子が STAT5 であることはノックアウトマウスを用いた実験から明らかにされており、モデル間の MF 像の差を生じさせる要因は、報告モデルと我々のモデルにおける MPN 幹細胞において過剰リン酸化させ得た STAT5 量の差と推測している。

## 2. 研究の目的

以上の背景から我々は、①疾患の持続に必要な MPN 幹細胞は STAT5 が恒常的に過剰

リン酸化した HSC 分画に存在することに加え、②MPN の各病型は、病型に対応する分化段階の造血細胞において対応する量のリン酸化 STAT5 が過剰に存在するときに、その分画の細胞が MPN 腫瘍細胞活性を得て成立する (つまりクローンにおける過剰リン酸化 STAT5 の量により腫瘍化する造血細胞分画が異なる)、③PMF の発症には最も多い過剰リン酸化 STAT5 を必要とする、との考えに至った。

本研究ではこの仮説を JAK2-STAT5 系活性化 (STAT5A(1\*6)、JAK2V617F) CD34-KSL 移植マウスモデルを用いて実験的に証明し、造血分化段階における STAT5 過剰リン酸化の程度の組み合わせが MPN 発症と病型選択に与える影響を明らかにすることを試みた。また過剰リン酸化 STAT5 の制御が、MPN の普遍的な治療となりうることを示すことを試みた。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 : STAT5 経路活性化遺伝子

#### (STAT5A(1\*6)、JAK2V617F) 導入 HSC 移植による PMF 発症マウスの分子病態解析と腫瘍幹細胞造血

##### (1) 異形小型巨核球への分化様式と線維化エフェクター活性の評価

PMF においては主として症例検体と TPO-Tg の実験から、JAK2-STAT5 経路の異常活性化→巨核球に代表される造血細胞における細胞周期亢進とアポトーシス抑制による異常細胞の増殖→異常巨核球や異常造血細胞が産生するサイトカイン

(TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , b-FGF, VEGF など) による線維芽細胞・血管内皮細胞刺激→polyclonal な線維芽細胞・間質細胞増生、細胞間マトリックス蛋白の増加→骨髄線維化 (TGF- $\beta$ , PDGF, b-FGF)、血管新生

(VEGF, b-FGF)、骨新生 (osteoprotegerin : OPG) というプロセスを経ることが知られている。我々の作製した STAT5A(1\*6)/HSC 移植マウスでも同様の分子機構が成立していることを確認するために、PMF で増加する小型異形巨核球の分化に関わる因子 (c-Myc など) の発現を中心に、STAT5A(1\*6)発現との関係性を評価する。また本マウスにおける線維化や血管新生、骨新生について、小型異形巨核球の産生する因子との関係性を評価する。

##### (2) PMF 幹細胞活性の評価

STAT5A(1\*6)/HSC 移植マウスより得た骨髄細胞について、骨髄二次移植を用いて PMF 幹細胞としての活性を評価する。

##### (3) JAK2V617F/HSC 移植マウスにおける検討

JAK2V617F 遺伝子導入 HSC をマウスに移植し、どの MPN 病変を起こしうるかどうかを検討する。また各 MPN で STAT5A(1\*6)発現

との関係の評価する。

### 実験 2：リン酸化 STAT5 蛋白量調節システムによる MPN 病型選択モデルの開発

Destabilizing domain(DD)を標的蛋白遺伝子の上流に組み込んで発現させることで、定常状態においては DD 依存性の蛋白分解が起こり、shield-1 と呼ばれる DD antagonist compound の存在下では compound 濃度依存性に蛋白発現が維持されるシステムが近年報告された (Banasynski et al, Nat.Med. 2008)。

- (1) DD を STAT5A(1\*6)上流に組み込んだウイルスベクターを用いて前記同様にモデルマウスを作製し、shield-1 濃度依存性に発現蛋白量に対応した病型が臨床的・組織学的に観察されるか否かを検討する。
- (2) また、STAT5A(1\*6)発現量の変化による病型選択の評価のため DD-STAT5A(1\*6)を持つ Tg マウスを作製する。

### 実験 3：MPN に対する分子治療モデルの開発

PMF における根治的治療として同種造血幹細胞移植が選択されることがあるが、発症年齢の高さや移植関連死亡率の高さから適応となる症例は限られている。より安全で適用範囲の広い治療法の一つとして STAT5 の機能を阻害する低分子治療薬が考えうる。既報 (Nelson EA et al, *Blood*. 2011) に基づき、PMF マウスモデルでの疾患の進行阻止や可逆的な正常造血回復を指標とした治療実験を pimozide を用いて行う。

#### 4. 研究成果

### 実験 1：STAT5 経路活性化遺伝子 (STAT5A(1\*6)、JAK2V617F) 導入 HSC 移植による PMF 発症マウスの分子病態解析と腫瘍幹細胞造血

- (1) JAK2V617F/HSC 移植マウスの約半数は MPN を発症し、ほぼ全てのマウスが PV あるいは ET 様の病像を呈した。一方 STAT5A(1\*6)/HSC の移植によって 90%以上のマウスが MPN を発症し、うち 93%のマウスは 6 週程度のうちに PMF の病像を呈した。具体的には白血球数の有意な増加を伴わない顆粒球分画比率の上昇、末梢血中への赤芽球と破碎赤血球の出現、臓器出血を伴う血小板減少が末梢で認められ、骨髓有核細胞数の著しい減少と著明な線維化、髄外造血を伴う巨脾も認められた。

- (2) PMF マウスは線維化の進行に先立つ移植後 4 週頃に、骨髓における小型異形巨核球の著しい増加を示すが (前線維化期)、それらは線維芽細胞や血管新生を促進する

TGF- $\beta$ 、VEGF、OSM などを強く発現していた。また FCM 解析では STAT5A(1\*6)の発現レベルが中等度の分画に赤芽球、発現レベルが高い分画に小型異形巨核球が集中しており、PMF においてリン酸化 STAT5A 発現の強度が赤芽球と巨核球の分化方向決定に関与していることが示唆された。またこれらの小型異形巨核球は c-Myc を強く発現していることが明らかになった。c-Myc は巨核球方向への分化促進と巨核球成熟抑制の側面を持つことが知られており、PMF における小型異形巨核球出現メカニズムの一端が明らかになった。

- (3) STAT5A(1\*6)/HSC 移植によって得られた線維化初期の PMF マウスの全骨髓を野生型マウスに移植しても、当初の予測に反して PMF は再現されなかった。一次移植マウスと異なり二次移植マウスでは STAT5A(1\*6)遺伝子導入血液細胞の比率が著しく減少しており、リプレATING による CFU-C アッセイの所見と併せて、STAT5A(1\*6)/HSC は長期にその異常造血活性を保てずに疲弊していくことが示唆された。また同マウスから得られた骨髓細胞を用いた CFU-C アッセイでは遺伝子導入/非導入を問わず、造血コロニー数の著しい低下と線維芽細胞コロニーの増加を認めた。PMF マウス内で線維化環境に暴露された正常造血幹細胞の機能低下が推測されたため、PMF 骨髓の二次移植マウスを作製し解析したところ、遺伝子導入/非導入を問わず HSC の減少を認めた。遺伝子非導入の HSC を分離し、single cell colony assay を行ったところ造血活性の高い HPP コロニーの形成能が失われていることが明らかになった。

### 実験 2：リン酸化 STAT5 蛋白量調節システムによる MPN 病型選択モデルの開発

- (1) DD を STAT5A(1\*6)上流に組み込んだウイルスベクターを作製し、HSC へ遺伝子導入の後に CFU-C アッセイを行った。DD-STAT5A(1\*6)/HSC は shield-1 濃度依存性にコロニー形成数を有意に増加させた。続いて DD-STAT5A(1\*6)/HSC 移植マウスを作製し、shield-1 によって MPN が誘導されるかどうかを検討している。
- (2) 上記の予備実験において shield-1 誘導以前の遺伝子導入細胞のキメリズム形成が全般的に不良であるため、DD-STAT5A(1\*6)を持つ Tg マウスの作製にも同時に着手している。現時点で 2 ラインを作出し、shield-1 による STAT5A(1\*6)誘導効果について検討している。

### 実験 3: MPN に対する分子治療モデルの開発

(1) in vitro における治療効果について報告のある pimozide に PMF モデルマウスに対する治療効果があるかを検討するために、移植後 2 週目より 4 週間にわたり、pimozide の経口投与を行った。しかし検査所見、病理所見の改善や生存期間の延長を認めず、投与量や時期の最適化が必要と考えている。

(2) PMF マウスの病態解析からは、間葉系幹細胞の量的変化と血管内皮細胞への分化過剰が線維化病態形成に関与することが示唆されている。間葉系幹細胞ならびにそこからの分化経路を対象にした治療法開発を試みている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Shimizu T, Sano S, Takayama N, Kaneko S (corresponding author), Eto K, Takeuchi Y, and Nakauchi H. Constitutive STAT5A activation enables erythropoiesis from human embryonic stem cell-derived primitive hematopoietic cells in the absence of erythropoietin, *The Kitasato Medical Journal*, 査読有, 41:2011,42-49

[学会発表] (計 5 件)

1. Kaneko S, Developing Mouse Model of Myeloproliferative Neoplasms by Genetically Modified Highly Purified Hematopoietic Stem Cell Transplantation, USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, Feb 25, 2011, Hayama, Japan

2. Shimizu T, Kaneko S, et al, STAT5A over-expression induces hematopoietic exhaustion not only in transduced hematopoietic stem cells but also to non-transduced normal hematopoietic stem cells, European School of Hematology, International Conference: Myeloproliferative Neoplasms, Oct 2, 2010, Albufeira, Portugal

3. Shimizu T, Kaneko S, et al, Analysis of hematopoiesis in advanced PMF mice generated by STAT5A(1\*6) HSC transplantation, 第 72 回日本血液学会, 2010 年 9 月 26 日, 横浜

4. Shimizu T, Kaneko S, et al, Establishment of mouse PMF model by

introduction of constitutive STAT5a into purified hematopoietic stem cells, Annual meeting of American Society of Hematology, Dec 6, 2009, New Orleans, USA

5. 清水 崇史, 金子 新ら, STAT5a 活性化造血幹細胞に起因する原発性骨髄線維症モデルマウスの作製および解析, 第 71 回日本血液学会, 2009 年 10 月 24 日, 京都

[その他]

ホームページ

<http://stemcell-u-tokyo.org/sct/project/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 新 (KANEKO SHIN)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 40361331