

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19512

研究課題名(和文) 数的染色体異常による造血幹細胞制御とMDS発症機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of hematopoietic stem cell regulation by numerical chromosome anomaly and the mechanism of MDS pathogenesis

研究代表者

指田 吾郎 (Sashida, Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は、造血幹細胞より発生して造血不全となり、一部が急性骨髄性白血病に移行する高齢者に好発する予後不良ながんである。数的染色体異常が、MDS発症に関与することは古くから知られていたが、その病態基盤は不明のままである。本研究では、世界にも類を見ないトリソミー8キメラマウスを作成して、クロマチン制御破綻の観点から、MDS発症の病態基盤を解析した。トリソミー8幹細胞の自己複製能は野生型と比較して低下しており、その分化能は障害されたが、MDS発症に十分ではなかった。RUNX1遺伝子の変異を導入することで、トリソミー8との協調によるMDS発症が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリソミー8に限らず、ダウン症を含めたトリソミーによって、年齢依存的にMDSや急性白血病が発症するが、余剰染色体の遺伝子発現だけから、がん化と白血病幹細胞発生の機序や、MDSで観察される全身性炎症の原因は説明できていない。本研究において、トリソミー8造血幹細胞のオミックス解析を実施したところ、トリソミー以外の染色体上の遺伝子発現異常、炎症応答の亢進やクロマチン構造制御の異常が確認できた。今後の解析によって、MDSの病態基盤の理解が進むとともに、新たな標的治療法の開発への進展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a poor prognosis cancer predominantly affecting the elderly that arises from hematopoietic stem cells, leads to hematopoietic failure, and partially transforms into acute myelogenous leukemia. Although it has long been known that numerical chromosome aberrations are involved in the pathogenesis of MDS, the pathogenetic basis of MDS remains unclear. In this study, we generated trisomy 8 chimeric mice, which are unique in the world, and analyzed the pathological basis of MDS development from the viewpoint of chromatin dysregulation. The self-renewal capacity of Trisomy 8 stem cells was reduced compared to the wild type, and their differentiation ability was impaired but not sufficient for MDS development; introduction of a mutation in the RUNX1 gene confirmed the development of MDS in cooperation with Trisomy 8.

研究分野：血液内科学

キーワード：トリソミー8 造血幹細胞 骨髄異形成症候群 クロマチン 数的染色体異常 白血病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は、造血幹細胞より発生して分化障害・造血不全状態になり、一部は急性骨髄性白血病(AML)に進展する高齢者に好発する予後不良ながんである。近年、70歳以上の健常高齢者にも、MDSと同様のドライバー遺伝子変異を持つクローン造血が報告され注目されている。こうしたクローン造血の一部が、MDS幹細胞の発生を経てMDS発症に至るが、その病態進展の仕組みは依然として不明である。

一方、染色体異常ががんの発生と進展に深く関与することは古くから知られていた。MDSにおいても、トリソミー8 (+8 MDS) やモノソミー7 (-7/7q-) といった数的染色体異常が、MDSの発症や予後と密接に関連しており、診断・治療法選択のための重要な判断基準でもある。また、先天性のトリソミー8モザイク (T8M) は、Warkany症候群としても知られ、発達障害に加えて、MDSや白血病を高率に発症する。このようにトリソミー8はMDSを発症させるが、その病態は8番染色体上の責任領域・遺伝子を含めて、MDS細胞のゲノム変異・遺伝子発現変動のみの解析では、MDS幹細胞の不均一性もあり明白ではなかった。元来、MDS細胞は生体内と異なり培養系では増殖活性が低い。また、MDS患者由来iPS細胞は報告されているが、iPS作製過程でエピゲノム変化は一度消失しており、分化誘導後に形質を再現できる保証はない。また、ヒトMDS幹細胞は免疫不全マウスに維持できず、異種移植による解析は極めて困難であった。このように、数的染色体異常を持ったMDSの病態解析は非常に困難な状況であった。

### 2. 研究の目的

こうしたMDS研究の困難を打破するために、申請者は、人工染色体技術によりヒト8番染色体を導入したマウスES細胞から、+8キメラマウスの作製を試み成功した。本研究では、トリソミー8による造血幹細胞制御とMDS発症機序の解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

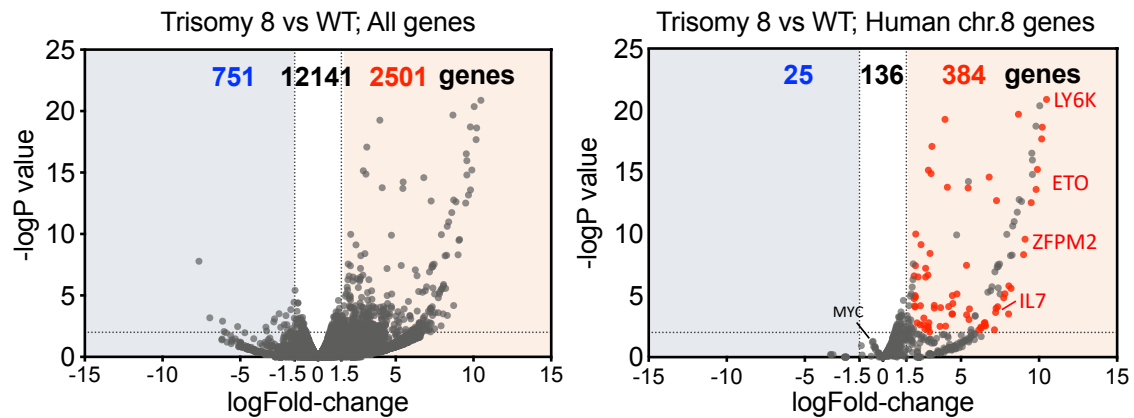
本研究では、鳥取大学・押村博士、香月博士らが開発・実用化した人工染色体技術によって、ヒト8番染色体を“丸ごと”マウスES細胞に新たに導入し、熊本大学・生命資源研究・支援センターの荒木博士と協力して、+8キメラマウスの作製を試みた。世界にも類を見ない+8キメラマウスの作製に成功した。本研究では、このトリソミー8生体モデルを用いることで、+8造血幹細胞機能の分子基盤を解析した。トリソミー8幹細胞による造血障害が確認されたので、トリソミー8単独でMDSの発症に十分であるか検討した(研究計画1)。さらに、ヒトの+8MDSとしばしば共存するRUNX1遺伝子の変異を導入した+8幹細胞を作成することで、クロマチン・染色体制御破綻の観点から、MDS発症の病態基盤を解析した(研究計画2)。

### 4. 研究成果

#### 研究計画1：ヒト8番染色体導入マウスES細胞・キメラマウスの作製と+8造血幹細胞の解析

+8キメラマウスでの造血発生を確認したので、+8幹細胞の表現型と機能解析を実施した。OP9ストローマ細胞を用いたES細胞の培養系の分化誘導実験では、+8ES細胞は血管内皮細胞と血球細胞への分化が障害された。OP9ストローマ細胞を用いたES細胞の培養系の分化誘導実験では、+8ES細胞は血管内皮細胞と血球細胞への分化が障害された。さらに、Runx1をゲノム編集

で欠損した+8; Runx1+/-ES細胞は、Bリンパ球よりも顆粒球への分化がより障害された。さらに、胎児肝（造血細胞）を移植した+8生体モデルでも、+8造血幹細胞は、その自己複製能は野生型と比較して大きく変わらないが、その分化は有意に障害された。一方で、移植後の長期間の観察あるいは連続移植を実施した後に、+8細胞の造血表現型を解析したが、明らかなMDSを含めた血液がんの発症は認めなかった。

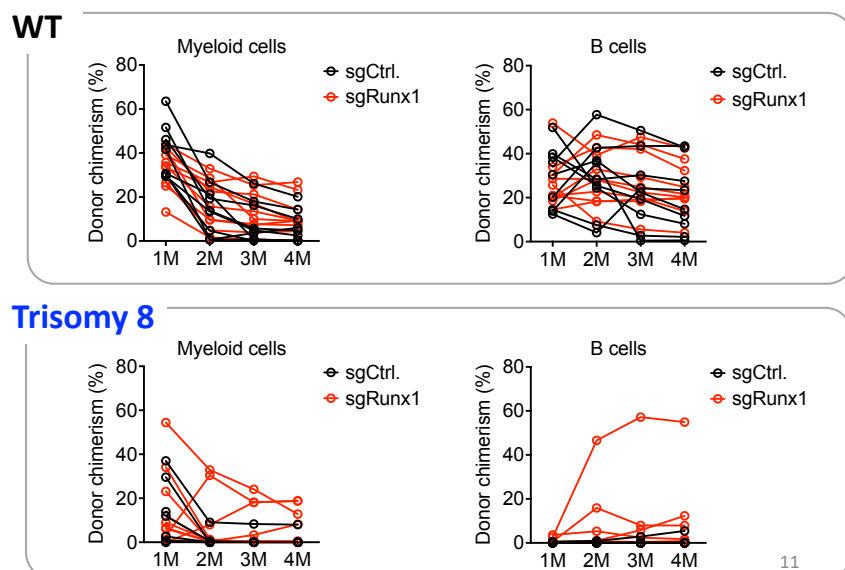


この+8幹細胞制御の分子メカニズムを理解するために、+8ES細胞、胎児・成体幹細胞のRNA-seqとATAC-seqを実施した。8番染色体だけでなく、8番染色体以外にある遺伝子の発現変動と、エンハンサー領域を含むクロマチン構造の変動が確認できた（上図参照・未発表データ）。RUNX1、PU.1、NF- $\kappa$ Bといった造血に不可欠な転写因子の過剰な活性化をみとめた。また、一部の変動群は領域特異的に形成され、高次構造・染色体間の関連も推測される。こうした構造変化はChromosome conformation captureにて解析する。今後、トリソミー8の幹細胞での時空間的制御と細胞機能との関連を検証したい。

## 研究計画2：トリソミー8によるクロマチン構造・染色体制御の異常を介したMDSの病態解明

続けて、生体におけるMDS病態を解明するために、+8造血幹細胞にゲノム編集法（あるいはレトロウイルスベクター）を用いてドライバー遺伝子変異（候補遺伝子：Runx1, Asx11, Stag2）を導入し、+8MDS・AML生体モデルの作製を試みた。上記したように、Runx1+/-欠損+8幹細胞のOP9培養系での血球分化障害を確認していたので、生体におけるMDS病態を解明するために、+8造血幹細胞にRunx1遺伝子変異を導入した。現在まで、ゲノム編集にて作成したRunx1

欠損+8幹細胞の増殖能の亢進が確認できた（右図参照・未発表データ）。一方で、レトロウイルスベクターによってRUNX1変異体を強発現した場合には、MDSの発症に十分ではあったが、トリソミー8の有無で明らかな生存期間の差は認めなかった。ト



トリソミー8のMDS発症過程における時期特異的な必要性を示唆した結果と考えられる。ただし、造血幹細胞分画の遺伝子発現解析を実施すると、一部の生物学的経路の違いを認めた。引き続き、生体におけるトリソミー8とドライバー遺伝子変異の協調によるMDS発症を確認するとともに、MDS発症の分子メカニズムを解析して、標的治療法の開発につなげたい。

以上、本研究では、8番染色体に限らないクロマチン・染色体制御の破綻を見出し、+8 MDS幹細胞の発生と病態進展の機序を検証した。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sun Yuqi, Kubota Sho, Iimori Mihoko, Hamashima Ai, Murakami Haruka, Bai Jie, Morii Mariko, Yokomizo-Nakano Takako, Osato Motomi, Araki Kimi, Sashida Goro	4. 巻 115
2. 論文標題 The acidic domain of Hmga2 and the domain's linker region are critical for driving self-renewal of hematopoietic stem cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 553 ~ 562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03274-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abdallah Mohamed Gaber, Niibori-Nambu Akiko, Morii Mariko, Yokomizo Takako, Yokomizo Tomomasa, at al.	4. 巻 35
2. 論文標題 RUNX1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) induces myeloid leukemia in mice in an age-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2983 ~ 2988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01268-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bai Jie, Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Sun Yuqi, Kanai Akinori, Iimori Mihoko, Harada Hironori, Iwama Atsushi, Sashida Goro	4. 巻 40
2. 論文標題 Overexpression of Hmga2 activates Igf2bp2 and remodels transcriptional program of Tet2-deficient stem cells in myeloid transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-01629-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Goro Sashida
2. 発表標題 Earlier infection stresses and a driver genetic mutation facilitate myeloid transformation
3. 学会等名 第94回生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goro Sashida
2. 発表標題 Genetics/epigenetics-mediated enhancer activation in myeloid transformation.
3. 学会等名 80回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jie Bai, Kimi Araki, Sho Kubota, Takako Yokomizo-Nakano, Minetaro Ogawa, Narumi Uno, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, Goro Sashida
2. 発表標題 Understanding of Trisomy 8 hematopoietic stem cell function and transformation by generating a new Trisomy 8 model.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goro Sashida
2. 発表標題 Impaired hematopoiesis and transformation of Trisomy 8 hematopoietic stem cell examined by an in vivo Trisomy 8 model
3. 学会等名 81回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究協力者	白 潔  (Bai Jie)		

6. 研究組織（つづき）

	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	香月 康宏  (Kazuki Yasuhiro)		
研究協力者	押村 光雄  (Oshimura Mitsuo)		
研究協力者	荒木 喜美  (Araki Kimi)		

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			
シンガポール	シンガポール国立大学			