

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22640

研究課題名(和文)人工染色体とゲノム編集技術によるトリソミー8 骨髄異形成症候群の病態基盤解明

研究課題名(英文) Understanding of pathogenesis of Trisomy 8-induced myelodysplastic syndrome

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)：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。骨髄異形成症候群(MDS)においても、トリソミー8 やモノソミー7といった数的染色体異常が、MDS病態や予後と密接に関連しており、診断や治療法選択のための不可欠な判断基準でもある。トリソミー8は比較的予後不良であるが、8番染色体上の責任遺伝子や責任領域は、遺伝子発現変動のみの検証ではMDS細胞の不均一性もあって明白になっていなかった。こうした研究状況のなか、申請者は、人工染色体技術を用いて、ヒト8番染色体をマウスES細胞に導入し、+8キメラマウスを作製して新規MDSモデルを確立し、その造血幹細胞機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数的染色体異常によるMDS発症機構の分子メカニズムは未だ明らかでない。本研究によって、こうしたMDSの病態基盤が解明されることで、病態に応じた治療法開発のための知見が期待できる。さらに、申請者の新規がん生体モデルによって、全く未知であった数的染色体異常によるがん発症機構の一端が理解できる。

研究成果の概要(英文)：It has long been known that chromosomal abnormalities are deeply involved in the development and progression of cancer. In myelodysplastic syndrome (MDS), numerical chromosomal abnormalities such as trisomy 8 and monosomy 7 are closely related to the pathophysiology and prognosis of MDS, and are also essential criteria for diagnosis and treatment selection. Although trisomy 8 has a relatively poor prognosis, the responsible gene and responsible region on chromosome 8 were not clarified due to the heterogeneity of MDS cells by examining only alteration of expression of genes in Chromosome 8. Under these circumstances, we introduced human chromosome 8 into mouse ES cells using artificial chromosome technology, created a +8 chimeric mouse, established a new MDS model, and analyzed the function of +8 hematopoietic stem cell.

研究分野：医学

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

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨髓異形成症候群(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と同様の遺伝子変異を持つクローン造血・前がん状態が報告され注目されている。ただし、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発症に至るのであり、その病態進展の仕組みは依然として不明であった。

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。実際に、MDSにおいても、トリソミー8 (+8 MDS)やモノソミー7といった数的染色体異常が、MDS病態や予後と密接に関連しており、診断や治療法選択のための不可欠な判断基準でもある。トリソミー8は比較的予後不良であるが、8番染色体上の責任遺伝子・領域は、遺伝子発現変動のみの検証ではMDS細胞の不均一性もあって明白になっていなかった。一方、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子変異の解析によって、トリソミー8を有するMDSでは、ポリコム抑制複合体を制御するASXL1の変異、またはエピゲノム制御因子と機能的に関連するRUNX1の変異と有意に共存することが報告されていた。こうした知見から、遺伝子変異やエピゲノム変異と染色体異常の協調作用によるMDS幹細胞の発生と病態進展が推察された。一方で、MDS患者由来のMDS幹細胞は、がんで一般的に使われる免疫不全マウスには生着せず、異種移植モデルによるMDSの病態解析は極めて困難であった。

2. 研究の目的

こうしたヒトMDSの病態研究の困難を打破するために、申請者は、人工染色体とゲノム編集技術を融合して確立したヒト8番染色体導入・マウス変異ES細胞による新規+8 MDS生体モデルを活用して、数的染色体異常によるがん発症機構を解析することにした。

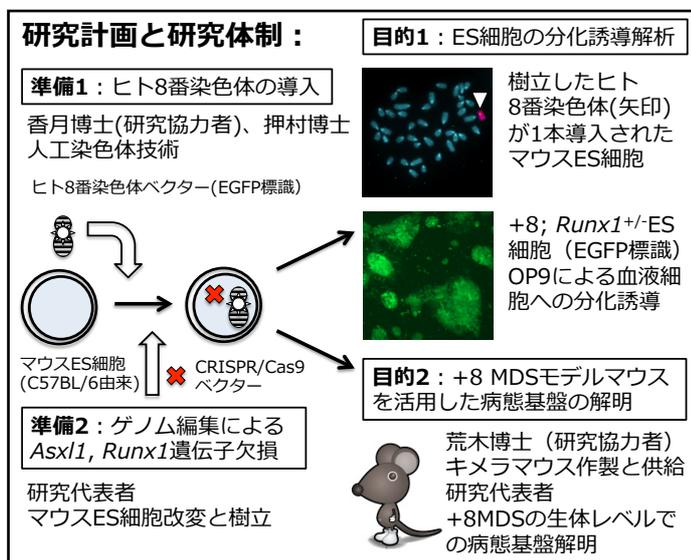
本研究では、始めに人工染色体技術を用いて、ヒト8番染色体をマウスES細胞に導入し、新規MDSモデルを確立し、その造血幹細胞機能を解析する(研究目的1)。また、+8マウスES細胞に対して、ヒト8番染色体のMDS責任候補領域を欠損させることで、MDS細胞機能を評価するとともに、キメラマウスを作製して、生体レベルでの+8によるMDS発症の病態基盤を解析する(研究目的2)。

3. 研究の方法

(1) 目的1: 人工染色体とゲノム編集技術によるヒト8番染色体導入マウスES細胞樹立

人工染色体技術によって、ヒト8番染色体(またコントロールベクター)をキメラマウス作製が可能な野生型C57BL/6マウスES細胞へ導入する(鳥取大学・香月博士との協力)(右図参照)。樹立されたヒト8番染色体導入ESクローンに対して、ゲノム編集によって、Runx1またはAsx11を欠損させた。染色体・遺伝子変異は、核型解析およびDNAシーケンスによって確認する。

作製した+8ES細胞をOP9支持細胞との共培養によって造血細胞へ分化誘導する。8番染色体の維持を確認しながら、+8ES細胞のCD31+CD41+血管内皮細胞への分化を解析する。さらにRunx1などMDSで見られる遺伝子変異を導入して解析する。Bリンパ球、顆粒球への分化障害が期待される。こうした解析によって、トリソミー8染色体異常の協調による血球分化障害とMDS表現型を再現する。



(2) 目的2: 新規モデルを活用した生体レベルにおけるトリソミー8 MDSの病態基盤解明

確立したヒト8番染色体導入・Runx1^{+/+}-マウスES細胞を用いて、トリソミー8の機能的役割を解明するために、+8キメラマウスを作成して病態解析を実施する。ヒトでは+8モザイク症候群が知られており、+8キメラマウスは胎生致死ではないことが予想された。

続けて、がん発症過程における染色体高次構造異常を明らかにするため、+8 MDS細胞のヒト8番染色体を含めたヒストン修飾・クロマチン構造制御の異常をChIP-seq、ATAC-seqなどによって統合的に解析する。こうして絞り込んだ8番染色体上のMDS病態の責任候補領域・遺伝子群をゲノム編集ベクターライブラリーにて欠損させた後に、MDS発症およびMDS幹細胞の機能を検

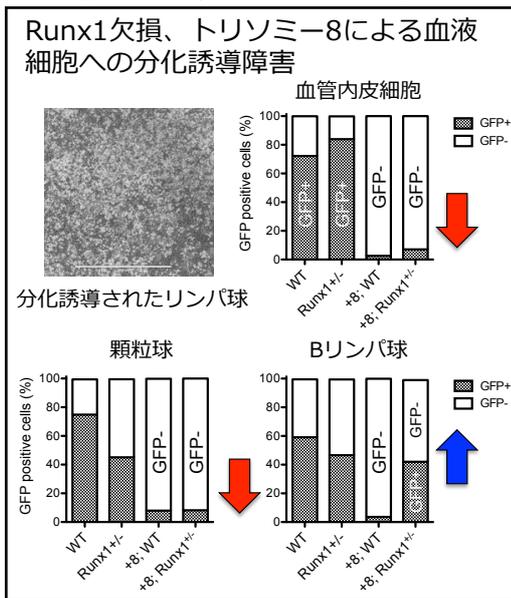
証する。以上、世界初の+8 MDS モデルを活用して、数的染色体異常による MDS 幹細胞の発生と病態進展の機序を検証する。

4. 研究成果

(1) 目的1: 人工染色体とゲノム編集技術によるヒト8番染色体導入マウス ES 細胞樹立

人工染色体技術によって、ヒト8番染色体(またコントロールベクター)をキメラマウス作製が可能な野生型 C57BL/6 マウス ES 細胞へ導入に無事に成功した。さらに、熊本大学・荒木喜美博士の協力のもと、+8 キメラマウスの作製にも成功した。GFP の発現と8番染色体が維持されているのを確認した。生体レベルにおける造血幹細胞・造血機能の解析を今後進める。

一方、樹立されたヒト8番染色体導入 ES クローンに対して、ゲノム編集によって、+8 MDS で認める遺伝子変異である Runx1 または Asx11 を欠損させた。染色体・遺伝子変異は、核型解析および DNA シークエンスによって確認した。OP9 支持細胞によって造血細胞へ分化誘導すると、8番染色体の脱落とともに(GFP 陰性化)、+8 ES (GFP+) は CD31+CD41+血管内皮細胞への分化が著しく障害された。さらに Runx1 を欠損すると、B リンパ球への分化に偏り、顆粒球の異形成と分化障害を認めた(右図参照)。従って、培養系ではあるが、Runx1 変異とトリソミー8染色体異常の協調による血球分化障害が示され、MDS の分化障害、細胞形態の異常が再現できた。今後、生体への移植実験によって、MDS の発症を確認して、その病態解析を実施する。



(2) 目的2: 新規モデルを活用した生体レベルにおけるトリソミー8 MDS の病態基盤解明

確立したヒト8番染色体導入マウス ES 細胞を用いて、トリソミー8の機能的役割を解明するために、+8 キメラマウスから+8 幹細胞を採取して、MDS 病態解析を実施する。ヒトでは+8 モザイク症候群が知られており、MDS 発症も報告されている。体細胞変異に加えて、生殖細胞レベルでの発症機構も実験的には困難が予想されるが、必要であれば検証する。

MDS の発症過程における染色体高次構造異常を明らかにするため、+8 MDS 細胞のヒト8番染色体を含めたヒストン修飾・クロマチン構造制御の異常を ChIP-seq、ATAC-seq などによって統合的に解析した(未発表データ)。今後は、絞り込んだ8番染色体上の MDS 病態の責任候補領域・遺伝子群をゲノム編集ベクターライブラリーにて欠損させた後に、MDS 発症および MDS 幹細胞の機能を検証する。確立した世界初の+8 MDS モデルを活用して、数的染色体異常による MDS 幹細胞の発生と病態進展機序を、今後も引き続き解析する。

(3) 総括: がんの病態基盤を理解するために用いられる基本的な分子生物学的技術として、遺伝子改変マウスがあるが、ヒトとマウスで異なる染色体をまたがった複数の広大な遺伝子・非遺伝子領域を含めた改変は極めて困難であった。たとえ遺伝子コピーレベルで成功しても染色体・核内高次構造の異常は再現できない。一方、疾患 iPS 細胞は造血器腫瘍でも樹立されているが、がん本来のエピゲノム異常は一度消失している。また、ヒト MDS 幹細胞は増殖活性が低く、免疫不全マウスへの生着と長期の造血維持は不可能である。実際、複数のサイトカインをヒト化した免疫不全マウスに加えて、ヒト間葉系細胞や人工骨環境があっても、MDS 幹細胞の維持は極めて難しい。このように、数的染色体異常による MDS 発症機構の分子メカニズムは未だ明らかでない。本研究によって、こうした MDS の病態基盤が解明されることで、病態に応じた治療法開発のための知見が期待できる。さらに、申請者の新規がん生体モデルによって、全く未知であった数的染色体異常によるがん発症機構の一端が理解できる。今後の研究の進展によって、成功裡になされれば造血と造血器腫瘍に限らない領域への学術的なインパクトも非常に高いものになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sashida Goro, Oshima Motohiko, Iwama Atsushi	4. 巻 110
2. 論文標題 Deregulated Polycomb functions in myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02600-6	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 -
1. 著者名 Kubota Sho, Tokunaga Kenji, Umezu Tomohiro, Yokomizo-Nakano Takako, Sun Yuqi, Oshima Motohiko, Tan Kar Tong, Yang Henry, Kanai Akinori, Iwanaga Eisaku, Asou Norio, Maeda Takahiro, Nakagata Naomi, Iwama Atsushi, Ohyashiki Kazuma, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 10
2. 論文標題 Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09710-z	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 Balogh Peter, Adelman Emmalee R., Pluvinage John V., Capaldo Brian J., Freeman Katie C., Singh Sandeep, Elagib Kamaleldin E., Nakamura Yukio, Kurita Ryo, Sashida Goro, Zunder Eli R., Li Hui, Gru Alejandro A., Price Elizabeth A., Schrier Stanley L., Weissman Irving L., Figueroa Maria E., Pang Wendy W., Goldfarb Adam N.	4. 巻 105
2. 論文標題 RUNX3 levels in human hematopoietic progenitors are regulated by aging and dictate erythroid-myeloid balance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 905 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.208918	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 Tenjin Yuki, Kudoh Shinji, Kubota Sho, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Sato Younosuke, Ichimura Takaya, Kohrogi Hirotsugu, Sashida Goro, Sakagami Takuro, Ito Takaaki	4. 巻 99
2. 論文標題 Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0277-y	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 -

1. 著者名 Kuan Jew Win, Su Anselm Ting, Tay Siow Phing, Fong Isabel Lim, Kubota Sho, Su 'ut Lela, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 111
2. 論文標題 Low prevalence of the BCR?ABL1 fusion gene in a normal population in southern Sarawak	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 217 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02768-x	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 Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Bai Jie, Hamashima Ai, Morii Mariko, Sun Yuqi, Katagiri Seiichiro, Iimori Mihoko, Kanai Akinori, Tanaka Daiki, Oshima Motohiko, Harada Yuka, Ohyashiki Kazuma, Iwama Atsushi, Harada Hironori, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 80
2. 論文標題 Overexpression of RUNX3 Represses RUNX1 to Drive Transformation of Myelodysplastic Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2523 ~ 2536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3167	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takako Yokomizo, Sho Kubota, Atsushi Iwama, Hironori Harada, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 RUNX3 over-expression impedes RUNX1 function and promotes the development of myelodysplastic syndrome
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Maeda, Sho Kubota, Takako Yokomizo, Mihoko Imori, Kimi Araki, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 Stress and aging impair the transcriptome of MLL-AF9 stem cells and impede the leukemic transformation
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Morii, Sho Kubota, Takako Yokomizo-Nakano, Masayoshi Tasaki, Kimi Araki, Goro Sashida
2. 発表標題 Loss of Tif1b suppressed the development of BCR-ABL-induced leukemia
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuqi Sun, Sho Kubota, Jie Bai, Takako Yokomizo-Nakano, Mariko Morii, Kimi Araki, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 HSCs-specific induction of Hmga2 ensures the enhanced self-renewal property
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Kubota, Yuqi Sun, Jie Bai, Takako Yokomizo, Mariko Morii, Motomi Osato, Kimi Araki, Goro Sashida
2. 発表標題 HMGA2 regulates hematopoietic stem cell fate decisions in the stress hematopoiesis
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Sashida, Takako Yokomizo, Sho Kubota, Ai Hamashima, Akinori Kanai, Atsushi Iwama, Hitoshi Takizawa, Hirotaka Matsui
2. 発表標題 Infection-induced epigenetic remodeling facilitates the transformation of pre-leukemic stem cells
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Sashida
2. 発表標題 Understanding of Trisomy 8 hematopoietic stem cell function by using a new in vivo Trisomy 8 model
3. 学会等名 分子生物学会年会 (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
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
---------	---------