

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18395

研究課題名(和文) GATA1関連白血病幹細胞を維持する遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Molecular characterization of the leukemic stem cells maintaining GATA1-related DS-AMKL

研究代表者

長谷川 敦史 (Atsushi, Hasegawa)

東北大学・事業支援機構・助教

研究者番号：80747460

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)：白血病の性質解明や化学療法成績の向上のためには、自身を維持しながら白血病芽球を産生する白血病幹細胞の機能解明が求められている。本研究課題では、ダウン症随伴急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)を支える白血病幹細胞の同定と機能特性の解析を目的とした。ダウン症患者由来DS-AMKL細胞を超免疫不全マウスに異種移植することで、ヒト白血病細胞および健康ヒト造血幹細胞を安定的に増幅・解析することのできる解析系を樹立した。この解析系を用い、DS-AMKL幹細胞が存在する候補分画として、CD34陰性かつヘキスト高染色性分画にある細胞集団を同定し、幹細胞分画単離の指標を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the function of leukemic stem cell, that generates leukemic blasts and retains self-renewal potency, is required for characterization of leukemia and improving efficiency of chemo-therapy. The aim of this study is identification and characterization of the leukemic stem cell sustaining Down-syndrome associated acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL). Human DS-AMKL- or hematopoietic stem cell-xenograft mice enabled to provide and analyze human leukemic cells and healthy hematopoietic stem cells stably. Utilizing this system, CD34 positive and Hoechst high-stained fraction was identified as a candidate fraction residing leukemic stem cell in this DS-AMKL. This information provides useful guideline to isolate the fraction with high concentration of leukemic stem cells.

研究分野：分子血液学

キーワード：白血病幹細胞 DS-AMKL

1. 研究開始当初の背景

白血病患者の腫瘍細胞中には、造血幹細胞に類似した性質を持つ白血病幹細胞と呼ばれるごく少数の細胞が存在し、白血病発症に関与している。白血病幹細胞は、通常は分裂休止期にとどまっているため、細胞分裂過程で働く従来の抗がん剤治療に抵抗性を示すことがわかっている。近年の白血病治療法の進歩により高確率で寛解には至るものの、抗がん剤治療から逃れた白血病幹細胞を起源とする再発が、白血病治療における最大の問題となっている。従って、白血病幹細胞を標的とする分子標的薬の創出を目指した研究が精力的に進められている。

白血病病態および発症機序の解明において、転写因子異常との関連は無視できない。白血病との関連が深い因子のひとつである GATA1 は、赤血球・巨核球の分化に関わる多様な遺伝子の発現を制御するマスター転写因子である。近年、ダウン症患児において高率に発症する一過性骨髄増殖(TMD)と、随伴する急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)の発症に GATA1 のアミノ末端側転写活性化(NT)ドメイン欠失が関与することが報告されている。NTドメイン欠失型変異 GATA1 発現マウスは、GATA1 変異のみで TMD 様病態を呈することから (Shimizu *et al.* 2009 *Genes Cells*)、GATA1 による転写制御の均衡破綻が、TMD および DS-AMKL の発症に深く関与すると考えられている。

また DS-AMKL は、多段階発がん機構に則した非常に特徴的な発症経緯を示す。ダウン症患児の約 10%において、臨床的には白血病と同じ病態を呈する TMD を発症する。TMD は数ヶ月で自然に軽快し、細胞遺伝学的完全寛解の状態になるが、その内の約 20%が小児期に DS-AMKL を発症する。TMD と DS-AMKL 発症時の芽球では同じ GATA1 遺伝子変異を有することから、TMD 寛解時に残存していた幹細胞が更なる遺伝子変異を獲得することで、DS-AMKL に至ると考えられている (Shimizu *et al.* 2008 *Nat Rev Cancer*)。このように、特異的な転写因子機能と白血病発症機序に明確な関連を見出せる症例は、分子機構解析の方向性を定めることができ、幹細胞機能解析へのアプローチが容易であると言える。

故に、遺伝子発現制御に着目した白血病幹細胞研究において、DS-AMKL が有用なツールになると考えた。特に白血病幹細胞は、可逆的に増殖特性を変化させて休止状態維持、自己複製、腫瘍細胞産生を行っていることから、各ステージの遷移過程における、増殖シグナル伝達経路や細胞周期チェックポイント構成因子等の遺伝子発現制御に関わるエピゲノム修飾の変化が予想される。こうしたエピゲノム特性と、従来から着目されている 21 番染色体トリソミーや GATA1 変異および他の遺伝的変異との関与を精査していくことで、TMD を経て DS-AMKL に至る過程で

の白血病幹細胞の出現と維持に関わるメカニズムを解明できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ダウン症に随伴する急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)の形成を支持する白血病幹細胞を同定し、幹細胞特性およびその獲得機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 超免疫不全マウスにおけるヒト DS-AMKL 細胞の異種移植系の樹立

解析対象とする DS-AMKL 細胞を安定的かつ潤沢に得るために、マウス異種移植疾患モデルを樹立し、白血病幹細胞研究の為に DS-AMKL 細胞をマウス個体内で増幅させる実験系を構築する。超免疫不全マウス(NOG マウス)個体内で AMKL へ進展したダウン症/TMD 患児由来細胞 (Saida *et al.* 2013 *Blood*) を、ヒト DS-AMKL 細胞として用いる。2x10⁶ 個の本細胞を、放射線照射(2.4 Gy)した超免疫不全マウス(NOG マウス)に尾静脈注射し、異種移植を成立させる。移植後 10 週目から、レシピエントマウスより 14 日おきに末梢血を採取し、末梢血球中のヒト CD45 陽性細胞をフローサイトメーターで検出することで、ヒト由来 AMKL 芽球の循環を確実に認める時期を判定する。さらに DS-AMKL 発症マウスにおいて、骨髄および脾臓における芽球割合の算定と、回収、凍結保存、再移植が可能であることを連続移植系により検証する。

(2) 超免疫不全マウスにおける正常ヒト造血幹細胞の異種移植系の樹立

白血病幹細胞の性質を解析するうえでの対照群とするヒト造血幹細胞を得るために、細胞バンク由来ヒト CD34 陽性造血幹前駆細胞の異種移植マウスを樹立する。ヒト CD34 陽性細胞 1x10⁵ 個を、放射線照射(2.4 Gy)した NOG マウスに尾静脈注射し、異種移植を成立させる。移植後 4 週目から、レシピエントマウスより 21 日おきに末梢血を採取し、末梢血球中のヒト CD45 陽性細胞をフローサイトメーターで検出することで、ヒト造血系の確実な再構築を認める時期を判定する。さらに骨髄および脾臓におけるヒト造血細胞割合の算定と、回収、凍結保存、再移植が可能であることを連続移植系により検証する。

(3) 細胞表面形質に基づく白血病幹細胞濃縮分画の同定

ヒト造血幹前駆細胞において特異的に発現する CD34 は、多くのヒト白血病研究において白血病幹細胞を単離するための指標として用いられる。DS-AMKL 発症マウス骨髄中のヒト由来細胞より CD34 陽性細胞および CD34 陰性細胞をセルソーターによりそれぞれ単離し、異種移植を行う。レシピエントマウスにおける DS-AMKL 発症の有無により、

白血病幹細胞がCD34陽性あるいは陰性いずれの分画に含まれるかを判定する。さらに、CD34と組み合わせることでヒト造血幹細胞から前駆細胞の間の分化段階を分けることが可能な細胞表面形質として、CD117、CD90、CD38、CD49f、CD45RAを用い、CD34陽性分画あるいは陰性分画中から、より詳細に白血病幹細胞濃縮分画を探索する。また血球分化の進行過程とは別指標を用いた方法として、他のヒト白血病幹細胞分画単離指標としてこれまでに報告のあったCD123およびCD44の発現パターンをCD34発現の情報に追加し、分画化する。

(4) 造血幹細胞の機能的特性に基づく白血病幹細胞濃縮分画の同定

造血幹細胞は自身の幹細胞性を維持するために、分化成熟した血球とは異なる独特の性質をもつ。白血病幹細胞と造血幹細胞には多くの類似性が見出されてきており、細胞表面形質だけでなく、機能面での類似性もまた、白血病幹細胞分画同定の指標となり得る。

第一に、幹細胞特異的機能の一つとしてDNA染色色素(ヘキスト)の排出能亢進に着目する。ヘキスト低染色性分画(高排出能)およびヘキスト高染色性分画(低排出能)に分け、それぞれの分画をセルソーターにより単離し移植する。

第二に、幹細胞が細胞分裂休止期(G₀期)にとどまっている点に着目する。ヘキストおよびピロニンYを用いた蛍光色素染色により、G₀期細胞および細胞周期亢進細胞をそれぞれ単離し移植する。細胞機能特性と、細胞表面形質発現パターンとを組み合わせ、DS-AMKL幹細胞同定の指標を見出す。

4. 研究成果

(1)

DS-AMKL移植レシピエントマウスでは、移植後10-12週目で末梢血中へのCD45陽性ヒト由来芽球の循環が認められた。末梢血中ヒト由来芽球は巨核球特異的細胞表面マーカーであるCD41aを発現していた。造血組織における所見として、骨髄における骨髄芽球および巨核芽球様の未熟な細胞の蓄積が認められた。また脾臓への芽球の浸潤および軽微な脾腫が認められた。加えて、血小板減少と貧血が認められた。以上の血液学的所見により、レシピエントマウスにおいて確実にDS-AMKL様病態が形成されることが示された。

10-12週目の時点で造血組織におけるヒト由来芽球の割合は、骨髄脾臓共に80%程度に達しており、さらに20週を超えると正常造血が障害されて死亡する個体が出現することがわかった。そのため、十分な細胞サンプルを回収できる最適な解析タイミングとして、移植後10-18週目を基準にすることができると判断した。

DS-AMKL発症マウス骨髄からヒト由来芽

球をセルソーターにより単離し、二次移植を行なったところ、二世代目のレシピエントマウスにおいてもヒト由来芽球の生着率は保たれていた。同様に三次・四次と連続的に移植を行なっても、継続的にDS-AMKL発症マウスを得られることがわかった。さらに回収した細胞を液体窒素中に凍結保存し、再度融解した場合でも生着効率は保たれることがわかった。DS-AMKL細胞を安定的に増幅・供給できる実験系の樹立に成功した。

(2)

ヒトCD34陽性造血幹前駆細胞移植レシピエントマウスでは、移植後4週目で末梢血中へのCD45陽性ヒト由来血球の循環が認められた。全循環血球中のヒト由来血球の割合は、1%程度であるが、時間経過に依存して割合は増加傾向にあった。フローサイトメーターによる細胞表面形質解析より、循環血球中にはヒト赤血球、骨髄球、単球、Tリンパ球、Bリンパ球の各系列が含まれ、造血幹細胞からの分化成熟がマウス内で再現されていることが示された。造血組織におけるヒト細胞のキメリズムは骨髄で40%程度、脾臓で50%程度であり、CD34陽性CD90陽性を示すヒト造血幹細胞分画が検出できることを確認した。

DS-AMKL細胞と異なり、ヒトCD34陽性造血幹前駆細胞移植系においては、マウス体内での3世代以上の連続的な移植および幹前駆細胞分画の増幅は不可能であった。これは、共存するマウス造血幹細胞との競合によりヒト造血幹細胞が骨髄微小環境から排除されることで、幹細胞性を喪失したことが推察される。そのため継代移植による永続的な生着維持は困難であり、DS-AMKL幹細胞解析における対照細胞供出の際には、その都度新規細胞から異種移植マウスを作製する必要があることがわかった。

(3)

DS-AMKL発症マウス骨髄より単離したヒトCD34陽性分画または陰性分画をNOGマウスに移植した。CD34陽性分画移植群ではDS-AMKL発症を認めなかったが、CD34陰性分画移植群において発症を認めた。CD34陰性分画中では、CD177、CD123、CD44のいずれにおいても、陽性分画および陰性分画が混在していた。どちらの分画を移植した場合でもDS-AMKL発症を認めたことから、これらの表面形質ではCD34陰性分画からの細胞分化が出来ないことが示された。

白血病幹細胞の大部分は休止状態にあり、抗がん剤への抵抗性を示すことがこれまでに報告されている。DS-AMKL発症マウスにおいて抗がん剤(5-FU)を投与したところ、CD34陰性分画におけるCD90、CD38、CD49f、CD45RAの発現パターンが変化し、特にCD49f陰性かつCD45RA陰性分画の生存性上昇が認められた。しかしながら、CD34

陰性分画中ではCD49fおよびCD45RAの発現の有無に関わらず、移植レシピエントマウスにおけるDS-AMKL発症を認めた。この結果は、CD34陰性分画には抗がん剤抵抗性を示す細胞集団が確かに存在するが、本解析で適用した造血幹前駆細胞単離法に準ずる表面形質の発現パターンとは一致しないことを示している。

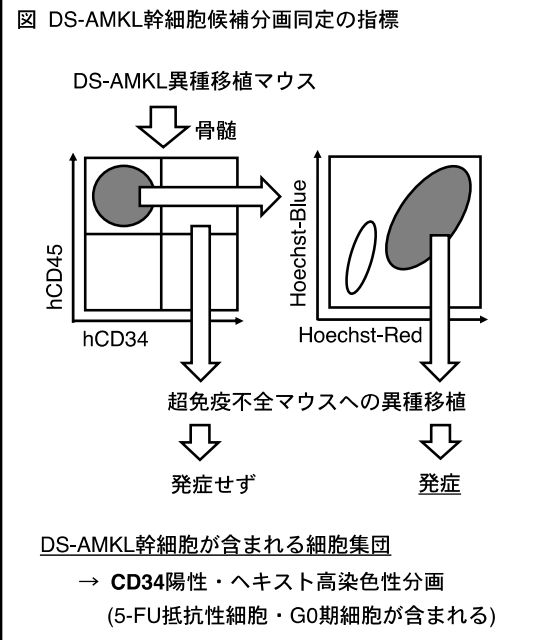
(4)

ヘキスト低染色性分画およびヘキスト高染色性分画に分離し、それぞれの分画をセルソーターにより単離し移植した。その結果、ヘキスト高染色性分画移植群においてDS-AMKL発症を認めた。しかしながら正常造血幹細胞が濃縮されるヘキスト高染色性分画移植群においては発症を認めなかった。実験(3)での解析結果より白血病幹細胞候補領域と想定したCD34陰性分画はヘキスト低染色性分画およびヘキスト高染色性分画のどちらにも含まれていたが、本結果より、CD34陰性分画の中でも特にヘキスト高染色性細胞集団において、白血病幹細胞が存在していることが示された。

CD34陰性分画において、ヘキストおよびピロニンY低染色性を示すG0期にある細胞を検出することができた。G0期細胞が、CD34の他にどのような表面形質を呈するか同定するまでには至らなかったが、CD34陰性分画中に、休止状態にあるDS-AMKL幹細胞が存在する可能性を提示することができたと考えられる。

(総括・展望)

本研究において解析対象としたDS-AMKL幹細胞は、CD34陰性かつヘキスト高染色性分画に存在することがわかった(図)。この結果は、多くのヒト白血病幹細胞がCD34陽性分画に存在するという報告が多い中で、本



白血病は非常に珍しいタイプであることを支持する。現時点で同定できた分画は、全白血病細胞中の多くの割合を占めていることから、真の白血病幹細胞濃縮分画を単離するためには、さらに別の指標を用いて候補分画を細分化していく必要がある。

今後、DS-AMKL幹細胞集団において、細胞特性を形成する遺伝子発現プロファイル等を解析することで、白血病芽球および正常造血幹細胞との相違点あるいは類似点を明らかにできると考える。将来的に白血病根治を目指す治療標的の探索につながることを期待される。

<引用文献>

Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, et al. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4377-4387.

Shimizu R, Kobayashi E, Engel JD., et al. Induction of hyperproliferative fetal megakaryopoiesis by an N-terminally truncated GATA1 mutant. *Genes Cells*. 2009 Sep;14(9):1119-1131.

Shimizu R, Engel JD., Yamamoto M. GATA1-related leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):279-287.

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4件)

Hasegawa A, Shimizu R. GATA1 activity governed by configurations of cis-acting elements. *Front Oncol*. 2017 Jan 9;6:269. doi: 10.3389/fonc.2016.00269. (査読有り)

長谷川敦史, 清水律子. 転写因子異常に起因する血液疾患. 最新医学社 最新医学・別冊 診断と治療のABC 125「貧血症」. 2017. 34-42. (査読なし)

Hasegawa A, Kaneko H, Ishihara D, Nakamura M, Watanabe A, Yamamoto M, Trainor CD, Shimizu R. GATA binding kinetics on conformation-specific binding sites elicit differential transcription regulation. *Mol Cell Biol*. 2016 Jul 29;36(16):2151-67. doi: 10.1128/MCB.00017-16. (査読有り)

長谷川敦史, 清水律子. 赤血球造血におけるGATA1研究の新たな展開. 科学評論社 血液内科 2016 73(2):221-227. (査読なし)

〔学会発表〕(計5件)

長谷川敦史. シス配列パターンに依存した転写因子 GATA1 の DNA 結合親和性修飾機構. 日本生化学会東北支部 第 83 回例会・シンポジウム. 2017 年 5 月 27 日. 東北大学 さくらホール, 仙台.

長谷川敦史, 金子寛, 石原大嗣, 中村正裕, 渡辺亮, 山本雅之, 清水律子. シス配列構造に依存した GATA1-DNA 結合様式修飾と転写活性調節. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25-27 日. 仙台国際センター/東北大学 川内北キャンパス, 仙台.

石原大嗣, 長谷川敦史, 佐賀井聡, 梶浦大貴, 山本雅之, 清水律子. GATA1 変異に起因した TMD/DS-AMkL の発症メカニズムの解析. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25-27 日. 仙台国際センター/東北大学 川内北キャンパス, 仙台.

Hasegawa A, Kaneko H, Ishihara D, Nakamura M, Watanabe A, Yamamoto M, Trainor CD, Shimizu R. *Cis*-element configuration dependent dynamics in DNA-binding and transactivation activity of GATA1. The 20th Hemoglobin Switching Conference. 2016 年 9 月 24-18 日. Pacific Grove, CA (USA).

石原大嗣, 長谷川敦史, 山本雅之, 清水律子. GATA1 変異に起因した TMD/DS-AMkL 発症メカニズムの解析. 日本生化学会東北支部 第 81 回例会・シンポジウム, 2015 年 5 月 9 日. 東北大学 さくらホール, 仙台.

〔その他〕

東北大学プレスリリース

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2016/06/press20160606-03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 敦史 (HASEGAWA Atsushi)

東北大学・事業支援機構・助教

研究者番号: 80747460