

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19546

研究課題名(和文)モデルマウスを用いた低形成性白血病の病態解析

研究課題名(英文)Pathogenesis of hypoplastic leukemia in murine models

研究代表者

荒井 俊也 (Arai, Shunya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00579716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス低形成性白血病のモデルとなりうる、Runx1遺伝子のC末端側短縮変異体を強制発現させたマウス造血細胞の移植実験を行ったが、白血病発症は認められなかった。Runx1遺伝子のさまざまな箇所でゲノムを切断するCRISPR/Cas9システムによる部位特異的ヌクレアーゼ発現ベクターを構築しマウス造血細胞に導入してRunx1欠失変異体を発現する造血細胞を作製した。サイトカイン含有半固形培地を用いた継代培養実験の結果、Runx1欠失変異体を発現するマウス造血前駆細胞に明らかな生存期間の延長や分化異常などの形質獲得は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：I transplanted murine hematopoietic progenitor cells (HPCs) transduced with the C-terminus truncated Runx1 mutant as a possible murine model of hypoplastic leukemia. However, the recipient mice have not developed leukemia. Then I constructed several CRISPR/Cas9 vectors that targeted the genomic locus of murine Runx1, and transduced murine HPCs with them. The HPCs expressing truncated Runx1 mutants were assayed by replating in cytokine-rich semisolid culture. In a result, the HPCs with truncated Runx1 mutants have not showed tumorigenic phenotypes such as survival advantage and differentiation block.

研究分野：血液内科学

キーワード：Runx1

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)は異なる病因からなる不均一な疾患であり、その病態には未知の部分が多くある。AML や MDS の一部(約 10%)では、腫瘍細胞の増殖に骨髄の低形成が伴っていることが知られており、低形成性 MDS/AML(hMDS/AML)などと呼ばれる。hMDS/AML において骨髄の低形成が誘導されるメカニズムは不明であり、臨床的には MDS に続発する AML で比較的高頻度に見られること、遺伝学的には chr. 7 monosomy を有する MDS では低形成を認めないことが知られているくらいである。hMDS/AML を起こす特異的な染色体異常や遺伝子変異は全く知られていない。hMDS/AML では化学療法による骨髄抑制が通常の場合に比べて長引くため十分な化学療法が行えず、同種造血幹細胞移植以外に有効な治療がほとんど存在しないのが現状である。従って、hMDS/AML の特に骨髄低形成を起こすメカニズムを解明し、それを標的とする新規治療を開発することは、本疾患群の治療成績の向上、また造血制御の未知の機構を明らかにするという点でも意義があると考えられた。

低形成性に関する知見はこれまで主に MDS について得られている。hMDS の病態は再生不良性貧血のような非腫瘍性の骨髄不全に近い要素があるとされ、免疫学的な機序が関連していると考えられている。全身性エリテマトーデスのような炎症性疾患の症例やそのモデルマウスで汎血球減少がしばしば見られることから、自己免疫性の炎症の亢進が骨髄不全を誘導する機序は有ると考えられる。実際、MDS では 10%前後で血管炎や皮膚炎、ニューロパチ、関節炎、糸球体腎炎といった自己免疫性疾患様の症状が認められ、抗核抗体をはじめとする自己抗体の陽性率も高い。

hMDS/AML の病態には、免疫学的な変化と造血環境の変化が関係していると考えられている。前者は主にサイトカイン産生異常による CD4 陽性または CD8 陽性 T リンパ球を中心とした活性亢進である。なかでも TNF は MDS 症例で高い傾向にあることが知られているサイトカインで、それに関連する TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)の発現も比較的高値とされている。また、IFNG の産生も比較的高値で、TNF と IFNG によって hMDS/AML 細胞内に一酸化窒素合成酵素(NOS)が蓄積し、それが造血障害を助長すると考えられている。しかし、TNF や IFNG がそもそもどのような機序によって骨髄内で増えるのかという機序は解っていない。また、後者については、造骨前駆細胞の Dicer1 をノックアウトすると正常造血細胞から MDS を発症したという報告があるなど(Raaijmakers MH, et al. Nature 2010)、造血環境の造血制

御における役割が注目されている。最近でも MDS における骨髄間葉系幹細胞の形作る造血微小環境の産生する CDH2, IGFBP2, TEGFA, LIF といったサイトカインの働きが報告されている(Medyouf H, et al. Cell Stem Cell 2014)。しかし、低形成性のメカニズムに着目した報告はこれまで世界的にみてもほとんどない。

私は、骨髄系腫瘍の病態を解析する中で、骨髄系腫瘍細胞自体が産生する液性因子の働きに関する知見を様々な形で得てきた。まず、AML 細胞の leukemia initiating cell に富む、幹細胞性の高い分画において、AML 細胞は自ら TNF を産生して、それが自細胞の NF- κ B シグナルを活性化しているという、ポジティブ・フィードバック機構が存在することを明らかにした(J Clin Invest 2014)。また、JAK2-V617F 変異を有する腫瘍細胞は液性因子リポカリン 2 を分泌しており、これはパラクライン効果で周囲の正常造血細胞ゲノムにダメージを与えていることを明らかにした(Blood 2014)。また、疾患由来 iPS 細胞を用いた解析では、骨髄線維症(MF)由来の iPS 細胞および其由来の血球細胞を用いて、MF で IL-8 の産生が亢進していることを示唆する知見を得た(Exp Hematol 2014)。このような研究を通じて、炎症性サイトカインの産生源はリンパ球のみではなく、特に造血器腫瘍細胞は造血微小環境においてオートクラインまたはパラクラインとして作用するサイトカイン産生を行っており、それが病態にとって重要なケースが少なくないのではないかと私は考えた。

2. 研究の目的

本研究は hMDS/AML の病態について、腫瘍細胞の産生する液性因子が惹起する炎症による造血抑制という観点から新しい知見を得ることを目的として行った。腫瘍細胞において液性因子産生が活性化するメカニズム、hMDS/AML 由来の液性因子が正常造血に与える影響、hMDS/AML 由来の液性因子が造血環境に与える影響、造血環境の異常が正常造血に与える影響、の 4 つに分けて解析を行い、特に重要なメカニズムとそこに関わる遺伝子異常やサイトカインを明らかにすることを目的とした。hMDS/AML の病態に重要な腫瘍細胞由来のサイトカインは TNF なのか IFNG なのかあるいは他にあるのか、という点は明らかにすることを目的とした。この解析により、hMDS/AML のみならず、再生不良性貧血など非腫瘍性の本態性、二次性造血不全疾患群の治療開発において有用な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

RUNX1S291fsX300 変異遺伝子の強制発現と移植によって、マウスで半年から 1 年程度で低形成性白血病が発症することが知ら

れている(Watanabe-Okochi N, et al. Blood 2008)。この移植実験は私の所属する研究室で再現可能であり、この白血病マウスの白血病細胞における各種炎症性サイトカインの発現や骨髄液のサイトカイン濃度を測定し、hMDS/AML の病態に關与していると考えられる TNF, IFNG 以外の要素を解析することを目指した。移植実験のレシピエントには NFkB-Luc Tg マウスを用い、半致死放射線照射にて移植することにより、残存している正常造血や骨髄組織における炎症反応誘導が起こっているかどうか観察することを目指した。

また、MDS/AML 細胞における炎症性サイトカイン分泌促進機構を解明するために、AML 細胞株(THP1, MOLM13, U937, Kasumi-1, MOLM1, KG1, HNT34, HL60 など)を用いた炎症性サイトカインのレポーター細胞の構築を目指した。定量 PCR によって IFNG と TNF 両方を発現している細胞株を選抜し、この細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 ノックアウトによるゲノム編集技術によって、ゲノム上の IFNG と TNF の C 端にそれぞれ上流の遺伝子と等量の蛍光タンパク質 TurboRFP を発現する DNA 配列を組み込むことで、TNF や IFNG の発現量を可視化した細胞株を作製することを目指した。細胞株の樹立後に、私の所属研究室が有するキナーゼ cDNA 発現レンチウイルス発現ベクターライブラリ、あるいは 12 万種以上のコンストラクトから成るレンチウイルスノックアウトベクターライブラリを組み合わせ、IFNG および TNF の発現を活性化する因子を探索する予定とした。

4. 研究成果

マウス低形成性白血病のモデルとなりうる、Runx1 遺伝子の C 末端側短縮変異体 RUNX1S291fsX300 を強制発現させたマウス造血細胞の移植実験を行ったが、約 1 年間の観察において白血病発症は認められなかった。RUNX1 の短縮変異体によって低形成白血病的形成が促進される機構を明らかにするため Runx1 遺伝子のさまざまな箇所ゲノムを切断する CRISPR/Cas9 システムによる部位特異的ヌクレアーゼ発現ベクターを構築した。これをマウス造血前駆細胞に導入して、Runx1 欠失変異体を発現する造血細胞を作製した。この細胞を、サイトカイン含有半固形培地を用いて継代培養したが、Runx1 欠失変異体を発現するマウス造血前駆細胞に明らかな生存期間の延長や分化異常などの形質獲得は見られなかった。また、TNF, IFNG などの低形成性白血病の病態に關係するとみられる炎症性サイトカイン類の発現量についても mRNA レベルで差は見られなかった(図 1)。

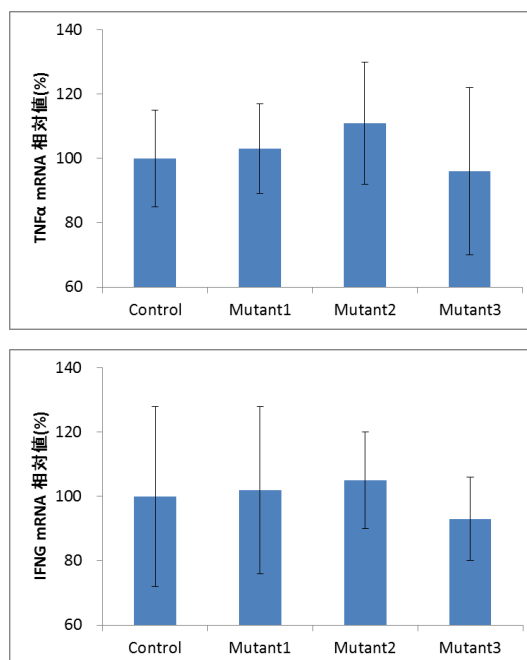


図 1 マウス造血前駆細胞に CRISPR/Cas9 システムによる部位特異的ヌクレアーゼ発現ベクターを導入して 3 種類の Runx1 欠失変異体をそれぞれ発現させた。この細胞を半固形培地上で 1 週間培養し、TNF (上)、IFNG(下)の mRNA 発現量を定量 PCR で測定したが、対照と比較して有意差を認めなかった(各 n =3)。

AML 細胞株 (THP1, MOLM13, U937, Kasumi-1, MOLM1, KG1, HNT34, HL60 など)を用いた炎症性サイトカインのレポーター細胞の構築では、AML 細胞株の HEL で IFNG 発現量のレポーターコンストラクトの挿入に成功したが、定常状態でのサイトカイン遺伝子の発現が極めて低く、その後のライブラリ導入に伴う挙動を観察するのが困難であった。その結果、ライブラリ導入によって IFNG レポーターの発現量が大きく変化する細胞を抽出し制御因子の候補として同定することはできなかった。

ヒト AML 細胞株に RUNX1 欠失変異体を強制発現させたが、TNF, IFNG の発現量には特に変化を認めなかった。Runx1 欠失変異体が周辺の細胞に作用して骨髄環境における炎症性サイトカインの増加を誘導している可能性を考え、間質細胞への作用を解析した。RUNX1 欠失変異体を強制発現させたヒト白血病細胞株と間質細胞 OP9 とを共培養し、OP9 細胞に起こる影響を観察したが、炎症性サイトカインの発現には有意な違いを認めなかった。次に、RUNX1 欠失変異体の T リンパ球への作用を解析した。RUNX1 欠失変異体を強制発現させたヒト白血病細胞株とヒト T リンパ球系細胞株(Jurkat cell)とを共培養し、T リンパ球細胞に起こる影響を観察したが、炎症性サイトカインの発現には有意な違いを認めなかった。一方、NF- B 系が活性化されている MLL 融合遺伝子発現白血病細胞株と T リンパ球系細胞の共培養を行なっ

たところ、Tリンパ球系細胞における炎症性サイトカインの発現は上昇する傾向が見られた。従って、白血病細胞によってTリンパ球の産生するサイトカインプロファイルに変化が生じる可能性は示唆されたものの、低形成性白血病のモデルの一つである RUNX1 変異体との関係は明らかにすることができなかった。低形成性白血病の生じるメカニズム、特に正常造血を抑制する機構にはまだ不明な点が多い。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http:// www.u-tokyo-hemat.com/](http://www.u-tokyo-hemat.com/)

6．研究組織

(1)研究代表者

荒井 俊也 (ARAI, SHUNYA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00579716