

令和元年 8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10026

研究課題名(和文) 内在性変異導入分子による白血病クローン多様性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Study on the clonal evolution of leukemia induced with internal mutators

研究代表者

丹羽 明 (Niwa, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：20546999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：AML1-ETOを始めとする白血病遺伝子はiPS細胞由来の造血前駆細胞に於いてNF- $\kappa$ Bパスウェイの活性化と、それに随伴する特定のAPOBEC遺伝子群の発現上昇を、細胞系列・分化段階特異的に引き起こすことが明らかになった。一方、これらの変化によって特定の白血病遺伝子座における変異導入が直接的に誘導されるかを検討するためのChIPアッセイを試行したが、本研究期間内では確定的なデータをまだ得られていない。その点について、今後さらに検討を続ける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのAML研究では新たな変異を探索同定し、その機能を解析する手法が多数であった。本研究により、発症後のクローン進化で見出される変異獲得機序には先行する白血病遺伝子の発現、および病態に関連した炎症シグナルに媒介される無い税制変異誘導遺伝子の働きが関与していることが示唆された。今後、AML発症段階の細胞での特異的APOBEC関与および変異獲得機構をより詳細に明らかにすることができれば、腫瘍研究全体に新たな一石を投じる成果となる。

研究成果の概要(英文)：Onset of acute myeloid leukemia (AML) has been accounted for by cooperation between multiple genetic alterations which induce abnormal control of various cellular pathways. Among the previously listed leukemogenic lesions, AML1-ETO fusion (AE) generated by translocation (8;21) (q22;q22) is one of the common mutations observed in 20-40% of patients. AE affects transcriptional regulation associated with hematopoietic differentiation, while 60% of AE-positive AML cases are shown to have together other types of mutation of genes involved in cell proliferation. However, the detailed mechanisms of how they work in the very early stages of leukemogenesis and what unknown "cooperative" cues function in those periods. From this viewpoint, in order to identify novel cellular molecules involved in the acquisition of leukemic phenotypes, we have conducted the gene-trap strategy-based phenomic screen in the use of pluripotent stem cell (PSC)-derived hematopoietic culture.

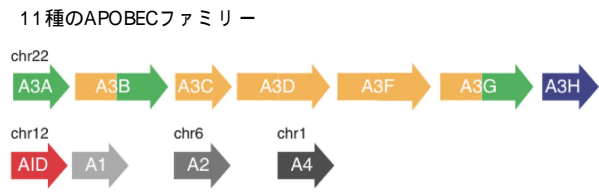
研究分野：幹細胞生物学

キーワード：白血病 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍におけるゲノム不安定性およびクローン進化はその発生・進展・再発の基本メカニズムの一つである。急性白血病においても、次世代シーケンス (NGS) 技術を始めとする近年の解析手法の発展に伴い、実際の患者体内でのクローン進化過程をいわゆる "Landscape" として後方視的に俯瞰できるようになっている。またそれら変異が腫瘍細胞の代謝やシグナル経路に及ぼす摂動についても多くの知見が得られている。ところが、「ではなぜ、広大なゲノム全長の中で、個々の白血病遺伝子はその位置に変異を獲得したのか」という問題に関して、これまで詳細な機構は殆ど明らかにされていない。変異が「単に無作為な DNA ダメージの結果」なのか、それとも「能動的に変異を誘導する内在的変異誘導分子の関与するプロセス」の結果なのか、またその場合「変異を能動的に獲得しやすい造血細胞分画」は果たして存在するのか。これが本研究の根本的な「問い」である。

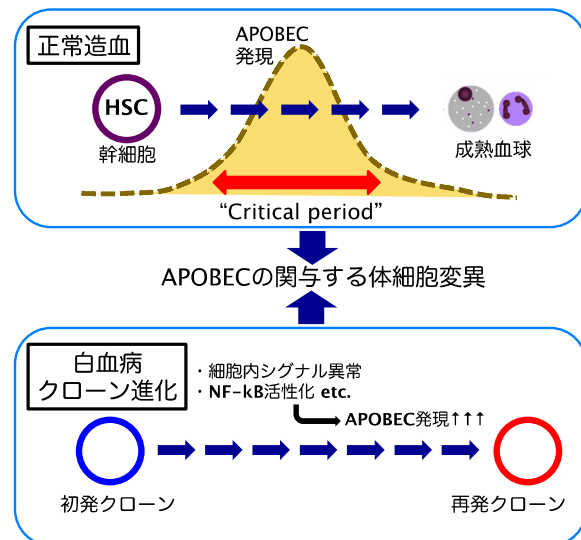
過去の病態研究からすでに多くの白血病遺伝子が同定されているが、上述のように AML の発症には複数段階の追加変異が必要である。その際に細胞内で鍵となるシグナル異常を同定する目的で、申請者は以前、既知 AML 遺伝子変異 (AML1-ETO, および MLL-AF9) を先行変異として予め導入した iPS 細胞を作製し、自ら構築した造血分化系を用いて Gene-trap system による表現型スクリーニングを行った。その結果、興味深いことに AML1-ETO, MLL-AF9 いずれの先行変異においても、白血病表現型の出現には追加の遺伝子変異が必要であること、AML1-ETO, MLL-AF9 の発現誘導に連動して転写活性化される遺伝子の中に、ゲノム変異の能動的獲得に関



与する遺伝子群が含まれていることが明らかになった。中でも、リンパ球のクラススイッチや体細胞超変異 (SHM) に極めて重要な作用を持つことが知られている AID 遺伝子を始めた、複数の

APOBEC ファミリー内在性変異誘導分子が挙げられた。興味深いことに、リンパ球においては例えば TCR 受容体からのシグナルや、ゲノム組み換えに伴う DNA 切断ダメージそのものに惹起され NF- $\kappa$ B を含む炎症シグナルが活性化しており、その NF- $\kappa$ B 活性化が AID 発現をさらに活性化していることは従来から知られていた事実である。さらに、AID を含む APOBEC ファミリー遺伝子によってもたらされる塩基置換パターン (APOBEC signature) を腫瘍細胞でマッピングすると、全ゲノム上でランダムに分布せずクラスターを呈する (Kataegis 現象) ことも昨今報告されている。これらの背景より、申請者は iPS 細胞が前白血病段階のクローン進化過程を分子レベルで明らかにするための最適なモデルを提供し得ると考え、その上で

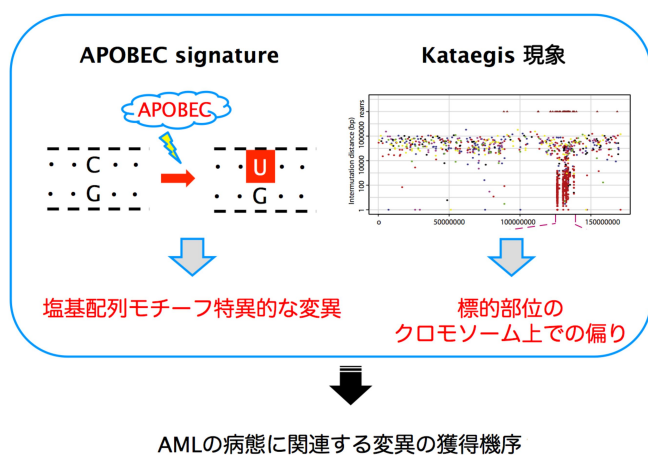
「AML1-ETO, MLL-AF9 などの先行変異を有する細胞には、APOBEC ファミリーの高発現細胞群が存在する」「AML の前白血病段階におけるクローン進化を進める機序のひとつとして NF- $\kappa$ B-APOBEC 経路を介した内在性変異獲得機構が存在



する」との仮定を打ち立てるに至った。

## 2. 研究の目的

まず、(1) APOBEC ファミリーを含む既知の内在性遺伝子改変酵素の発現プロファイルを各系列・各分化段階の造血前駆細胞で検証するとともに、AE, MF9 などの AML 遺伝子を導入した細胞での APOBEC ファミリーの発現変動を比較検討する。また、(2) 遺伝子改変の容易な iPS 細胞の利点を活用し、APOBEC をコンディショナルに強制発現もしくはノックアウトする iPS 細胞を作製する。それを用い、各造血前駆細胞での白血病化誘導およびその後の多クローン性獲得に APOBEC が与える影響と機序を分子生物学的に検証することを目標とする。端緒としては、AML



アクセスを解析することも想定している。その上で、(3) APOBEC の Kataegis 現象が白血病のクローン進化に関連しているか、すなわち AE や MF9 の引き起こす白血病化に特異的な「APOBEC 標的部位の偏り」の有無を検証し、(4) APOBEC の人為的制御が白血病の病態に及ぼす効果、影響について vivo 移植モデルでも検討することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) APOBEC の発現解析：ヒト iPS 細胞由来造血細胞を用い、現状 11 種類知られる APOBEC の発現を、系列・分化段階に区別して検証する。次に、AE, MF9 などの既知 AML 遺伝子を外来から導入し、APOBEC 発現の変動を観測する。

(2) Tg-iPS 細胞の作製：並行して、造血細胞で APOBEC を強制発現またはノックアウト(KO)する iPS 細胞を作製する。

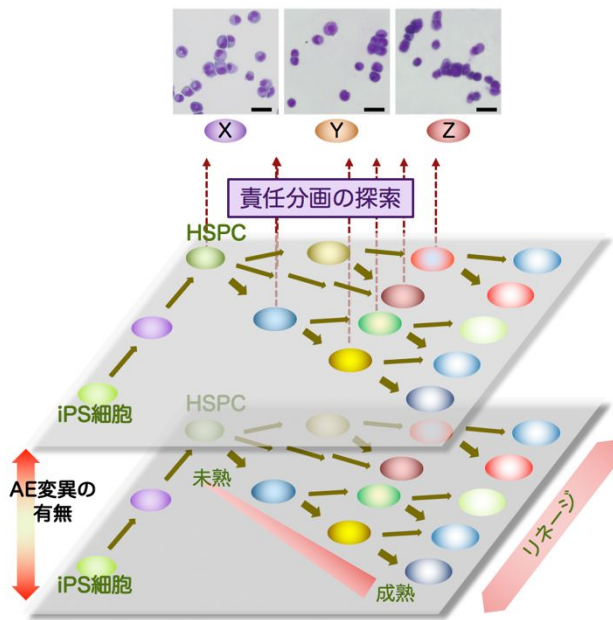
(3) 体細胞変異の検出：Chip-Seq、FISH 等により、種々の AML 関連遺伝子座への APOBEC のアクセスを検討する。

(4) 網羅的変異部位の同定：既知 AML 遺伝子の存在・非存在下での APOBEC 特異的変異 (APOBEC signature) 獲得箇所を全ゲノムシーケンスによりマッピングし、Kataegis を検証する。

(5) in vivo 解析：(2)の iPS 細胞から誘導した造血細胞の移植により、既知 AML 遺伝子に関連する白血病化と APOBEC の関連を、vivo モデルで解析する。

## 4. 研究成果

(1) APOBEC の発現解析：ヒト iPS 細胞由来造血細胞を用い、APOBEC ファミリー11 種の発現を、骨髄球系・赤芽球造血分化の各系列・分化段階に区別して検証した。その結果、APOBEC 遺伝子



群の発現は各リネージ、分化段階によりそれぞれ特有の挙動を示すことが明らかになった。中でも、APOBEC3B, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H の4 遺伝子については、前2 者は骨髄球系前駆細胞、後二者は赤芽球系前駆細胞で発現が高く、さらに AML1-ETO (AE) 遺伝子を Dox 添加により誘導的に発現させた場合に、非添加群と比較し発現が有意に上昇していることを見出した。

(2) 白血病遺伝子導入による NF-κB パスウェイの活性化：(1) において、PCR アレイを用い、720

種の造血関連遺伝子についての半網羅的発現解析を行った。その結果、前述の骨髄球系・赤芽球系前駆細胞段階で NF-κB パスウェイ遺伝子群の活性化が見られ、AE 発現細胞においてさらに有意に活性化が見られた。これらの結果より、iPS 細胞由来造血分化課程における前駆細胞段階で NF-κB パスウェイ関連遺伝子の活性化、および臨床報告と同じく白血病变異の存在によるさらなる活性化が見られることが確認された。

(2) Tg-iPS 細胞の作製：(1)の結果を受け、4 種の APOBEC について Dox 依存的に誘導発現、およびノックアウト(KO)可能な Tg-iPS 細胞を作製した。

(3) 試験管内アッセイにおいて、NF-κB の発現を炎症刺激・化合物投与により人為的に活性化した場合に APOBEC の発現が上昇することを見出した。特に、骨髄球系前駆細胞において APOBEC3B および APOBEC3F の発現は NF-κB 刺激に伴い有意に上昇していた。

(4) (2)で作出した APOBEC-iPSC を用い、各造血細胞への選択的分化における前駆細胞を個別に回収し、既知白血病遺伝子部位

の変異の有無を検証した。

APOBEC 強制発現細胞に於いて

複数の遺伝子変異を検出した

が、in vitro の系における今

回の検討範囲で APOBEC の直接

的なアクセスについての有意な差を認めるには至らなかった。

(5) iPS 細胞由来造血幹前駆細胞を免疫不全 NOG マウスに移植する系において、NF-κB の抑制制御因子である遺伝子 X を抑制することで、間接的に NF-κB パスウェイの活性化を誘導したところ、白血病遺伝子誘導前駆細胞の骨髄におけるキメリズムが長期に渡り上昇することを見出した。マウスには軽度の肝脾腫を認め、肝臓内で移植細胞の存在も確認された。しかし、今回の検討では、いずれの細胞移植群についても 16 週を越えての生着の持続および 2 次移植マウスでの生着は認められなかった。

Colony ID	Gene symbol	Accession No.	Locus	Total No. exons	CDS exons	Trapped exon
#01	Gene A	NM_XXXXXX	Ch.XX	20	1-20	2-20
#03	Gene B	NM_000820.3	Ch.13	15	1-15	8-15
#04	Gene C	NM_001039618.2	Ch.11	1	1	-
#06	Gene D	NM_001206736.1	Ch.20	10	1-10	3-10
#08	Gene E	NM_000754.3	Ch.22	6	3-6	6
#09	Gene F	NM_001003696.1	Ch.21	4	2-4	2-4
#10	Gene G	NM_022717.3	Ch.12	2	2	-
#10	Gene H	NM_002412.4	Ch.10	5	1-5	4-5
#12	Gene I	NM_002711.3	Ch.7	4	1-4	2-4

以上の結果より、AML1-ETO を始めとする白血病遺伝子は iPS 細胞由来の造血前駆細胞に於いて NF-kB パスウェイの活性化と、それに随伴する特定の APOBEC 遺伝子群の発現上昇を、細胞系列・分化段階特異的に引き起こすことが明らかになった。一方、これらの変化によって特定の白血病遺伝子座における変異導入が直接的に誘導されるかを検討するための ChiP アッセイを試行したが、本研究期間内では確定的なデータをまだ得られていない。その点について、今後さらに検討を続ける予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Akira Niwa, Megumu K. Saito and Tatsutoshi Nakahata “PSC-Derived Hematopoietic System to Elucidate the Cooperation Between Gene Alterations and Cell Lineages in Leukemogenesis” 米国血液学会 2016年11月

Akira Niwa, Megumu K. Saito and Tatsutoshi Nakahata “iPSC-Based Phenomic Screen Revealed an Impact of Uncontrolled NFkB Activity at the Initiating Stages of AML1-ETO Related Leukemia” 米国血液学会 2018年12月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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、研究者個人に帰属されます。