

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19567

研究課題名(和文)造血環境異常による前白血病状態の病態形成機序の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of preleukemic state due to abnormal hematopoietic environment

研究代表者

正本 庸介(Masamoto, Yosuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30706974

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)：前白血病状態の造血幹細胞の特徴は遺伝毒性ストレスに対する抵抗性なので、この抵抗性を標的とした治療の可能性を追究するため、前白血病モデルマウスを構築し、脂肪細胞分泌ホルモン・アディポネクチンの正常・前白血病性造血幹細胞に対する影響を明らかにすることを試みた。アディポネクチンは定常状態の正常造血幹細胞に対しては大きな影響を与えないが、遺伝毒性ストレスが加わるとAkt/mTORC1経路の活性化を介して、ミトコンドリアを介したエネルギー供給を増加させ、正常造血幹細胞の活性化・細胞周期への誘導を促進することを明らかにした。一方前白血病性クローンが徐々に増殖する前白血病モデルマウスは現在構築中である。

研究成果の概要(英文)：As preleukemic hematopoietic stem cells are characterized by resistance to genotoxic stress, we investigated the therapeutic potential against resistance to stress. We attempted to elucidate the effect of adiponectin, an adipocyte-derived hormone, upon normal and preleukemic hematopoietic stem cells by establishing a preleukemic model mice. We have shown that adiponectin leads to activation and entry into cell cycle of hematopoietic stem cells by increasing energy supply through mitochondria upon genotoxic stress, while adiponectin didn't affect hematopoietic stem cells in a steady state. The effect of adiponectin was dependent on Akt/mTORC1 pathway. We are going on the establishment of preleukemic model mice, in which preleukemic clones increase gradually.

研究分野：血液内科学

キーワード：アディポネクチン 前白血病状態 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

正常造血には自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞を頂点とし、成熟・分化した血液細胞を終点とする分化の階層性が存在する。急性骨髄性白血病(AML)を含む造血器腫瘍でも同様に、白血病幹細胞を頂点とする分化の階層性が存在し、白血病幹細胞の根絶がAMLの治癒に必要であることが示唆されている。AML発症過程においては、造血幹細胞あるいは造血幹細胞に近い造血前駆細胞が遺伝子変異を獲得して白血病幹細胞に変化すると考えられているが、近年のゲノクス研究の進歩によって、AML発症および再発におけるクローン進化が予想以上に複雑かつダイナミックであることが明らかとなり、増殖優位性を獲得するような突然変異を獲得したクローンが白血病幹細胞となって優位に増殖し、最も増殖に有利な遺伝子異常を持ったクローンが主要クローンを形成するという単純な古典的モデルだけでは、AMLの発症・再発の病態の理解が困難であることが明らかになってきた。一方、AMLに特徴的とされる遺伝子異常を有しながらも一見正常の造血能・分化能を有する造血幹細胞が健康人にも一定の割合で見出され、これらの変異を有する患者はAMLの発症のリスクが高い、いわば前白血病状態にあることが明らかとなった。またAML寛解後の患者でも、AML細胞で見られた変異の一部を有する造血幹細胞が長期間残存する場合があることも古くから知られていた。このような造血幹細胞は前白血病性造血幹細胞と呼ばれ、遺伝子変異により正常造血幹細胞よりも生存・増殖で優位となって徐々に造血幹細胞プールの中で拡大し、さらに遺伝子変異を獲得することでAMLが発症し、またこれらの細胞がAMLに対する化学療法後も残存することで、AML再発時のリザーバー細胞として機能するというモデルが提唱され、非常に注目されている。このモデルは今後の検証が必要であるが、化学療法によって白血病幹細胞を根絶しても、白血病に特徴的な遺伝子変異を有する前白血病性造血幹細胞は残存し、徐々にクローンを拡大して遺伝子変異を蓄積するという機序により、治療後高率に起こるAMLの再発を説明できる。また前白血病性造血幹細胞は造血幹細胞と性質が類似しているため、治療による前白血病性造血幹細胞の根絶は困難という予測を与えており、注目に値する。

前白血病性造血幹細胞の特徴は未知な部分が多いが、最近、前白血病性造血幹細胞のモデルとなる転写因子Runx1欠損造血幹細胞では、リボソーム生合成の低下を介して放射線照射・化学療法剤などの遺伝毒性的なストレス(遺伝毒性的ストレス)に対するp53の誘導やアポトーシス応答が低下し、ストレス抵抗性が亢進する結果、正常造血幹細胞に対する生存優位性を獲得しクローンが拡大することが報告された。またDNAメチルトラ

ンスフェラーゼDNMT3Aの機能喪失型変異は、ヒトで前白血病状態と関連する代表的な遺伝子変異であるが、この遺伝子の欠失もマウスモデルで遺伝毒性的ストレスに対する抵抗性を付与することが報告されている。これらの事実からは、遺伝毒性的ストレスに対する抵抗性が前白血病性造血幹細胞の重要な特徴である可能性が想起される。実際にこの仮説は、前白血病性造血幹細胞がAMLに対する治療後(遺伝毒性的ストレスに相当する)も残存して、変異を蓄積して新たなAML発症の母地になるというモデルにも合致する。このように現在の前白血病状態のモデルは、造血幹細胞に生じた遺伝子変異とそれによる造血幹細胞の機能異常をその前提としているが、造血系を構成する造血細胞以外の要素である骨髄造血環境が、どのように前白血病状態の病態形成に影響を与えるかについてはほとんど解析されておらず、また骨髄造血環境が前白血病状態の治療ターゲットになりうるかどうかの検討もなされていない。

前白血病性造血幹細胞を許容する骨髄環境“というコンセプトは、前白血病性造血幹細胞自体に対する治療が困難であると考えられる中で、骨髄環境に対する治療により、前白血病性造血幹細胞らしさ、あるいは前白血病性造血幹細胞の生存メリットを減弱させることができる可能性があるため、魅力的な仮説と考えられる。しかし前白血病性造血幹細胞という概念自体が新しいものであり、モデルも最近ようやく報告され始めた段階であることから、これまでそのようなコンセプトを元にした解析は行われていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでマウスモデルを用いて肥満症における感染症と造血系異常の関連を解析し、肥満マウスではサイトカイン依存性の顆粒球系前駆細胞の増殖が障害され、その病態の主要因は脂肪細胞から分泌されるサイトカインadiponectinの欠乏であることを明らかにした。そこで造血器腫瘍におけるadiponectinの作用を明らかにするために、adiponectin欠損(adipo KO)マウスの造血系を解析した。抗がん剤などの遺伝毒性的ストレスに対するこのマウスでは造血幹細胞の抵抗性が亢進し、アポトーシスが抑制されていた。これは前白血病性造血幹細胞の特徴と同じであり、adiponectinが欠損した骨髄環境においては遺伝子変異を有さない正常造血幹細胞も前白血病性造血幹細胞に近い特徴を有することになるのではないかと着想を得た。つまりadiponectin欠損造血環境は前白血病性造血幹細胞の増殖・生存を許容し、遺伝毒性的ストレスに対する抵抗性という“前白血病性造血幹細胞らしさ”を付与する、またadiponectinの投与は前白血病性造血幹細胞らしさを減少させるのではないかと、という仮説に至った。

そこで本研究では、adiponectin欠損状態

において、造血幹細胞、前白血病性造血幹細胞の挙動を明らかにし、また adiponectin をマウスに投与した時の挙動を観察することで、骨髓環境に対する adiponectin 治療が及ぼす影響を明らかにすることで、最終的に前白血病性造血幹細胞に対する治療を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) adiponectin 欠損骨髓環境、および adiponectin の補充が造血幹細胞に与える影響の解析

Adiponectin 欠損マウスにおいて、造血幹細胞の性質がどのように変化するのか、これまで知られていない。そこで adiponectin が前白血病性造血幹細胞および白血病幹細胞に与える影響を調べる基盤とするために、まずは定常状態、遺伝毒性ストレスが加わった時の挙動を中心に、adipo KO マウスにおける造血幹細胞の性質を解析する。具体的には、

- ・定常状態の造血における造血幹細胞の量的・質的な変化
- ・放射線照射や抗がん剤など種々の遺伝毒性ストレスが加わった時の造血細胞数、造血幹細胞の細胞周期、アポトーシス、代謝、細胞内シグナルの変化

- ・adiponectin を補充、あるいは細胞内シグナルを制御した場合に、上記の変化に対して与える効果

などの項目について adipo-WT(コントロール)マウスと比較することで、adiponectin の定常状態および遺伝毒性ストレス下の造血幹細胞に対する影響を明らかにする。

2) adiponectin 欠損骨髓環境における造血幹細胞および前白血病性造血幹細胞、白血病幹細胞の挙動の差異の解析

前白血病性造血幹細胞のモデルとして、以下のマウスを用いて解析を行う。

- ・Runx1 Δ/Δ : Runx1^{flox/flox} マウスと Mx1-Cre トランスジェニックマウスを交配し、poly(I:C)を投与して Runx1 を造血系特異的にコンディショナルにノックアウトしたマウス

- ・Asxl1^{G643fs} : 前白血病状態のプロトタイプである骨髓異形成症候群(MDS)、AML の高リスクとなる健常人のクローン性造血で比較的高頻度に認められる、クロマチンリモデリング因子 Asxl1 の機能喪失型変異のノックインマウス

- ・p53 コンベンショナルノックアウトマウス

これらのモデルマウスの造血幹細胞を、フローサイトメトリーで血液細胞を区別可能な Ly5.1 コンジェニックマウスの造血幹細胞と様々な比率で混合して、致死量の放射線を照射した adipo KO、または adipo-WT マウスに移植する。移植後、経時的に末梢血または骨髓を評価し、造血幹細胞、造血前駆細胞、分化細胞といった細胞分画ごとに前白血病性造血幹細胞由来の細胞比率を追跡する。こ

れまでの知見からは、前白血病状態の細胞の正常造血幹細胞に対する増殖アドバンテージは、遺伝毒性ストレスのない状態では認められることも認められないこともあるが、遺伝毒性ストレスが加わった状態でより明らかとなりやすいことが予想される。そこで移植後に放射線照射、抗がん剤などの遺伝毒性ストレスを加えることで、前白血病細胞の比率、遺伝子変異の発生がどのように変化するかを観察する。

4. 研究成果

1) adiponectin 欠損骨髓環境、および adiponectin の補充が造血幹細胞に与える影響の解析

Adipo KO マウスの定常状態における造血系では、造血幹細胞の頻度・細胞周期・アポトーシス・ミトコンドリア活性に明らかな差はなく、致死量照射したマウスに対する骨髓移植実験で測定した造血幹細胞としての活性にも差はなかった。そこで分化した細胞を障害し、造血幹細胞を活性化するのに用いられる代謝拮抗剤 5-FU を投与した時の造血細胞の挙動を観察した。5-FU 投与後、造血幹細胞を含むさまざまな分画の造血細胞のアポトーシス、細胞数の減少はほぼ同等であったが、細胞障害性刺激に対応して静止期から細胞周期に誘導される造血幹細胞の割合は adipo KO マウスで有意に低下しており、その後の造血系の回復、すなわち造血幹細胞・前駆細胞・分化した造血細胞、いずれの回復も遅延していた。非致死量の放射線照射や、その他の細胞障害性薬剤の投与でも同様に、adipo KO マウスでは造血回復の遅延が見られた。その病態を詳しく解析したところ、adipo KO マウスでは造血幹細胞の活性化に伴って見られるミトコンドリア膜電位の上昇、ミトコンドリア DNA の合成亢進が減弱していることが明らかになった。これらのミトコンドリアの活性化は、造血幹細胞の活性化・増殖に伴うエネルギーを供給する。遺伝毒性ストレスによって造血幹細胞で mTORC1 経路が活性化されることによってこれらの変化が起こることが知られている。われわれの解析によって、adiponectin は造血幹細胞における mTORC1 経路の活性化に必要であること、adipo KO マウスでは Akt/mTORC1 経路の活性化が障害されることによって、遺伝毒性ストレスが加わっても造血幹細胞でのミトコンドリアの活性化、十分なエネルギー産生が起こらなくなることが明らかになった。このことが adiponectin 欠損環境において、造血幹細胞が遺伝毒性ストレスに対する抵抗性を獲得する機序であると考えられた。これらの現象は、経静脈的な adiponectin の補充、あるいは adiponectin のアゴニストの投与によってレスキューされた。さらに遺伝毒性ストレスによる造血細胞の傷害は骨髓微小環境の脂肪細胞の増殖を促進し、この脂肪細胞が主な

骨髄中の adiponectin の供給源となるが、一部の adiponectin は造血細胞からの autocrine や paracrine によって分泌されることが示唆された。

2) adiponectin 欠損骨髄環境における造血幹細胞および前白血病性造血幹細胞、白血病幹細胞の挙動の差異の解析

次に正常造血幹細胞と前白血病性造血幹細胞が adiponectin から受ける影響の差異を明らかにするために、前白血病モデルとして Runx1 Δ/Δ (Runx1flox/flox \times Mx1-Cre)マウス、Asxl1G643fs マウスの造血細胞を、Ly5.1 マウスの正常造血細胞と混合した上で野生型および adipo KO マウスに移植して、正常細胞と前白血病クローンが混在し、前白血病性クローンが増殖優位性を獲得するようなマウスの作製を試みた。移植後無処置で経過を観察しても、前白血病性クローンの有意な拡大は見られなかった。ヒトにおいては前白血病性クローンの拡大過程は極めて緩徐に起こるため、平均寿命が2年程度のマウスでその現象を再現するため、前白血病クローンの増殖優位性を誘導するような、抗がん剤や放射線照射などの様々な遺伝毒性ストレスを与えることを試みた。しかしこれらのモデルマウスにおける前白血病性クローンの有意な拡大を惹起することはできなかった。p53 欠損マウスの造血細胞の移植などを試みたが、やはり再現性のある前白血病性クローンが見られるモデルは構築できておらず、現在は p53 欠損マウスの細胞を移植したマウスに様々な遺伝毒性ストレスを加えている。Runx1 Δ/Δ マウスは既報におけるクローン拡大が再現できなかったが、これは Runx1 locus の flox 配列の挿入部位の差異によるものなどを考えている。今後最適な前白血病モデルを構築し、adiponectin の有無による前白血病性造血幹細胞と正常造血幹細胞の応答の差異を明らかにしていく。

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 1 件)

Adiponectin Enhances Quiescence Exit of Murine Hematopoietic Stem Cells and Hematopoietic Recovery Through mTORC1 Potentiation. Masamoto Y, Arai S, Sato T, Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T, Kurokawa M. Stem Cells, 35(7): 1835-1848, 2017.

〔学会発表〕(計 1 件)

Adipocyte-derived Adiponectin Enhances Activation of Hematopoietic Stem Cells by Potentiating mTORC1 Activation after Myelotoxic Injury. Masamoto Y, Arai S, Sato T, Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T,

Kurokawa M. Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Vancouver, 2016/6/22-25.

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

正本 庸介 (MASAMOTO, Yosuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30706974

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()