

令和 4 年 4 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08824

研究課題名（和文）RUNX1変異モデルマウスを用いた低リスク骨髄異形成症候群の分子発症機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of lower-risk MDS

研究代表者

原田 浩徳（Harada, Hironori）

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10314775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群（MDS）の主病態である骨髄不全症の発症機序解明のため、CBL変異とRUNX1変異を遺伝子導入したMDS骨髄移植モデルマウスを用いて検討を行った。このマウスは骨髄不全症の表現型と遺伝子発現プロファイルを再現した、世界初の早期発症低リスクMDSモデルマウスである。造血細胞におけるミトコンドリア動態の解析結果から、過剰な断片化によりROSの産生が誘導され、細胞死を来すことを見出した。ミトコンドリアの過剰な断片化を化合物で阻害すると白血球減少が改善した。MDS患者でも同様の結果が得られた。ミトコンドリアダイナミクス異常がMDSの骨髄不全症を引き起こすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDSに関わる多数の遺伝子変異が同定されたが、発症や進展の分子病態は不明である。前白血病といわれているMDSは白血病と同様、遺伝子変異が造血幹細胞に生じているが、徐々に進行する汎血球減少と白血病へ移行する特有な病態は明らかになっていない。臨床的には、貧血などの血球減少への対応が中心となる低リスクMDSと白血病移行の抑制が治療の主体となる高リスクMDSに分類される。MDS治療薬であるアザシチジンは高リスクが対象であり、MDSの主病態である汎血球減少症に対する治療薬はない。本研究成果は、MDSの多様な遺伝子変異に共通する分子病態を明らかにしたことにより、新たなMDSの創薬開発に繋がったといえる。

研究成果の概要（英文）：Myelodysplastic syndromes (MDS) are defined as stem cell disorders caused by various gene abnormalities. Recent analysis has provided advances in identifying relationships between mutations and clinical phenotypes. However, the mechanism of ineffective hematopoiesis, which is a fundamental process leading to the clinical feature, remain unclear. Therefore, we investigated the molecular mechanism using CBL E8/9/RUNX1S291fs mice. RNA-Seq revealed that a distinct gene expression profile of MDS patients is induced in this model. We identified the DRP1-dependent mitochondrial fragmentation as a trigger of MDS pathogenesis. Notably, the fragmentation is observed in HSCs from patients regardless of mutational profile. Pharmacological inhibition of DRP1 activity attenuated dysplasia and ineffective hematopoiesis, and prolonged survival of mice. Our results provide new insights into ineffective hematopoiesis and indicate that dysregulated mitochondrial dynamics could be a druggable target.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 骨髄不全症 RUNX1 ミトコンドリア動態異常 BMTモデル

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) は造血幹細胞の異常に起因して発症する難治性血液がんである。次世代シーケンス技術により、MDS 発症に関わる遺伝子異常がほぼ同定された。その結果、一人の MDS 患者に複数のいわば「MDS 幹細胞クローン」が存在し、その中で特定の遺伝子異常が協調的に働いて MDS の多様な病態を発症させていることが明らかになっている。MDS の本質は、異常クローンの腫瘍性増殖とアポトーシス亢進 (無効造血) 正常クローンの抑制に伴う骨髄不全症である。しかし、この MDS の本質である骨髄不全症の発症機序は、遺伝子変異の全容が明らかとなった現在でも解明されていない。MDS の病態を解明するために、これまで様々な疾患マウスモデルが作製されが、低リスク MDS の病態を忠実に再現したモデルはなかったことも一因である。我々は、CBL 変異と RUNX1 変異を造血幹細胞・前駆細胞へ遺伝子導入することによって、骨髄不全症の表現型と遺伝子発現プロファイルを再現した世界初の低リスク MDS 早期発症モデルマウスを樹立した。この新規モデルマウスを用いることにより、MDS の主病態である骨髄不全症についての検証が可能となった。

2. 研究の目的

白血病移行へのリスクに関わらず、MDS の本質は無効造血と正常クローンの抑制に伴う骨髄不全症である。我々が樹立した CBL 変異と RUNX1 変異を遺伝子導入した世界初の早期発症低リスク MDS (骨髄移植) モデルマウスを用いて、MDS の主病態である骨髄不全症すなわち無効造血について、ミトコンドリアダイナミクスに着目し、その発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規低リスク MDS モデルマウスの表現型解析

RUNX1 変異と CBL 変異発現ベクターを正常野生型マウスの造血幹細胞・前駆細胞に導入し、亜致死量の放射線照射をした野性型マウスの尾静脈より注入し (骨髄移植) 新規低リスク MDS モデルマウスを作製した。発症マウスの血液・免疫学的解析、骨髄細胞を用いたアポトーシスアッセイ、ROS レベル測定や血清サンプルを用いたサイトカインおよびケモカイン測定を行った。各分化段階の骨髄細胞を分取し、RNA シークエンシングによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(2) 新規低リスク MDS マウスのミトコンドリアの動態・機能解析

造血細胞のミトコンドリアの動態を検討し、また機能評価として酸素消費速度測定、ミトコンドリア電子伝達系複合体 (I~V) の活性測定、各複合体サブユニットの mRNA・タンパク発現測定を行った。

(3) ヒト MDS 患者検体におけるミトコンドリア動態・機能と表現型の関連性評価

インフォームド・コンセントが得られた MDS 患者の骨髄細胞を用いて、マウスと同様の検討を行った。これらの結果と種々の臨床指標を合わせて多変量解析し、ミトコンドリア機能と骨髄不全症病態、MDS でみられる多様な臨床表現型との関連性を検証した。

4. 研究成果

(1) 新規低リスク MDS モデルマウスの樹立とミトコンドリアダイナミクス異常の同定

MDS 患者において RUNX1 変異と CBL 変異が共存していることを見出し、両変異を遺伝子導入した骨髄移植モデルマウスを作製した。このマウスはヒト低リスク MDS 患者の骨髄不全症の表現型と遺伝子発現プロファイルを再現しており、世界初の早期発症低リスク MDS モデルマウスである。このマウスの骨髄において、造血前駆細胞の拡大と骨髄系分化成熟障害、細胞死亢進がみられた。また、血漿中の様々な炎症性サイトカイン・ケモカインのレベルが上昇していた。RNA-Seq による遺伝子発現解析結果から、自然免疫系シグナル経路などの炎症性関連遺伝子群の活性化が認められた。さらに、ミトコンドリア酸化的リン酸化関連遺伝子群の著しい発現亢進がみられた。そこで、ミトコンドリアの状態を観察したところ、ミトコンドリアの過剰な断片化がみられた。

(2) マウス MDS 造血細胞のミトコンドリア過剰断片化の機序

ミトコンドリアの分裂において中心的な働きをする DRP1 について検討したところ、DRP タンパクおよび活性化 DRP のレベルが上昇していた。これらは、mTOR シグナル経路の活性化に起因していた。DRP1 阻害剤で処理すると、ミトコンドリア断片化の有意な改善がみられ、MDS モデルマウスの白血球減少の改善と生存期間の延長が確認された。

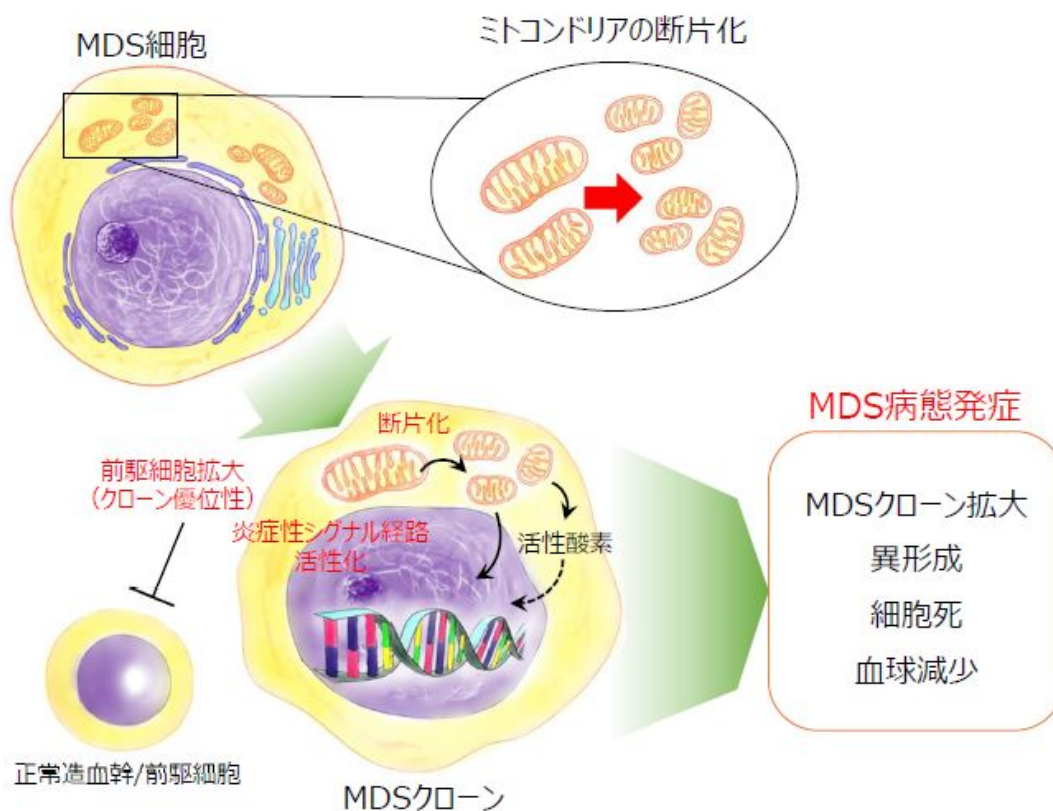
(3) ヒト MDS 患者の造血細胞におけるミトコンドリアダイナミクス異常

ヒト MDS の造血細胞においてマウスと同様、ミトコンドリアの過剰な断片化がみられた。MDS の

血球減少や無効造血などの表現型とミトコンドリア断片化の関連性が示唆された。

(4) ミトコンドリア断片化を標的とする MDS に対する創薬開発
ミトコンドリアダイナミクス異常が MDS の病態形成に大きく寄与していることが明らかになった。ミトコンドリアの過剰な断片化を抑制することで、MDS 病態を改善させる可能性が示された。今後、ミトコンドリア動態異常に着目した MDS の病態解明がさらに進み、それらを標的とした創薬開発が期待される。

図1 ミトコンドリア断片化による MDS 発症



<引用文献>

Aoyagi Y, Hayashi Y, Harada Y, Choi K, Matsunuma N, Sadato D, Maemoto Y, Ito A, Yanagi S, Starczynowski DT, Harada H. Mitochondrial Fragmentation Triggers Ineffective Hematopoiesis in Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):250-269. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0032. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34462274

林嘉宏, 原田浩徳: ミトコンドリア異常による骨髄異形成症候群の発症機序. *血液内科* 84(3): 375-380, 2022. 2022/3/28

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sadato Daichi, Hiram Chizuko, Kaiho-Soma Ai, Yamaguchi Ayaka, Kogure Hiroko, Takakuwa Sonomi, Ogawa Mina, Doki Noriko, Ohashi Kazuteru, Harada Hironori, Oboki Keisuke, Harada Yuka	4. 巻 16
2. 論文標題 Archival bone marrow smears are useful in targeted next-generation sequencing for diagnosing myeloid neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0255257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ureshino Hiroshi, Kurahashi Yuki, Watanabe Tatsuro, Yamashita Satoshi, Kamachi Kazuharu, Yamamoto Yuta, Fukuda-Kurahashi Yuki, Yoshida-Sakai Nao, Hattori Naoko, Hayashi Yoshihiro, Kawaguchi Atsushi, Tohyama Kaoru, Okada Seiji, Harada Hironori, Ushijima Toshikazu, Kimura Shinya	4. 巻 20
2. 論文標題 Silylation of Deoxynucleotide Analog Yields an Orally Available Drug with Antileukemia Effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1412 ~ 1421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-20-1125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda Daisuke, Nakajima-Takagi Yaeko, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Aoyama Kazumasa, Saraya Atsunori, Harada Hironori, Rahmutulla Bahityar, Kaneda Atsushi, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Koseki Haruhiko, Shimoda Kazuya, Tanaka Tomoaki, Sashida Goro, Iwama Atsushi	4. 巻 36
2. 論文標題 Insufficiency of non-canonical PRC1 synergizes with JAK2V617F in the development of myelofibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 452 ~ 463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01402-2	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 Sunami Yoshitaka, Yokoyama Takashi, Yoshino Seiko, Takahara Tomoko, Yamazaki Yukari, Harada Hironori, Nakamura Takuro	4. 巻 6
2. 論文標題 BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by repressing PU.1 target genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1827 ~ 1843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021004558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aoyagi Yasushige, Hayashi Yoshihiro, Harada Yuka, Choi Kwangmin, Matsunuma Natsumi, Sadato Daichi, Maemoto Yuki, Ito Akihiro, Yanagi Shigeru, Starczynowski Daniel T., Harada Hironori	4. 巻 12
2. 論文標題 Mitochondrial Fragmentation Triggers Ineffective Hematopoiesis in Myelodysplastic Syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 250 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-0032	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 原田結花, 原田浩徳	4. 巻 278
2. 論文標題 骨髄異形成症候群に対する分子標的治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1120-1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 林嘉宏, 原田浩徳	4. 巻 84
2. 論文標題 ミトコンドリア異常による骨髄異形成症候群の発症機序	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 375-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Najima Yuho, Sadato Daichi, Harada Yuka, Oboki Keisuke, Hiramata Chizuko, Toya Takashi, Doki Noriko, Haraguchi Kyoko, Yoshifuji Kota, Akiyama Megumi, Inamoto Kyoko, Igarashi Aiko, Kobayashi Takeshi, Kakihana Kazuhiko, Okuyama Yoshiki, Sakamaki Hisashi, Harada Hironori, Ohashi Kazuteru	4. 巻 56
2. 論文標題 Prognostic impact of TP53 mutation, monosomal karyotype, and prior myeloid disorder in nonremission acute myeloid leukemia at allo-HSCT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 334 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-020-01016-9	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 Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Bai Jie, Hamashima Ai, Morii Mariko, Sun Yuqi, Katagiri Seiichiro, Imori 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 林嘉宏, 原田浩徳	4. 巻 273
2. 論文標題 造血器腫瘍におけるHIF1A/ARNTシグナル経路とがん幹細胞制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 404 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 林嘉宏, 原田浩徳	4. 巻 78増刊号3
2. 論文標題 骨髄異形成症候群の病態形成における自然免疫系制御異常の役割「造血器腫瘍学」(第2版)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 378 ~ 383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Takaoka Kensuke, Koya Junji, Yoshimi Akihide, Toya Takashi, Kobayashi Takashi, Nannya Yasuhito, Nakazaki Kumi, Arai Shunya, Ueno Hironori, Usuki Kensuke, Yamashita Takeshi, Imanishi Daisuke, Sato Shinya, Suzuki Kenshi, Harada Hironori, Manabe Atsushi, Hayashi Yasuhide, Miyazaki Yasushi, Kurokawa Mineo	4. 巻 -
2. 論文標題 Nationwide epidemiological survey of familial myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia in Japan: a multicenter retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2020.1734595	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 Harada Yuka, Shingai Naoki, Ding Ye, Sadato Daichi, Hayashi Yoshihiro, Yamaguchi Masaki, Okuyama Yoshiki, Shimoyama Tatsu, Ohashi Kazuteru, Harada Hironori	4. 巻 -
2. 論文標題 Gene Rearrangements of MLL and RUNX1 Sporadically Occur in Normal CD34+ Cells Under Cytokine Stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 原田浩徳, 萩原政夫, 名島悠峰	4. 巻 61
2. 論文標題 低リスクMDSに対する治療選択 MDS治療をどう改善するか?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 156-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 林嘉宏, 青柳泰成, 小林大貴, 貞任大地, 原田結花, 原田浩徳
2. 発表標題 ミトコンドリア断片化によるMDS無効造血発症機序の解明
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aoyagi Y, Hayashi Y, Shingai N, Harada Y, Harada H
2. 発表標題 Dysregulated mitochondrial electron transport chain is involved in bone marrow failure in a novel preclinical MDS model
3. 学会等名 The 78th annual meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Aoyagi Y Shingai N, Harada Y, Harada H
2. 発表標題 Aberrant mitochondrial complex activity causes bone marrow failure in a lower-risk MDS model
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 乾 賢一、望月真弓、加藤裕久、服部 豊（分担：原田結花、原田浩徳）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 416（分担：pp36-46）
3. 書名 血液・造血器／感染症／悪性腫瘍（分担：再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、骨髄異形成症候群）	

1. 著者名 鈴木 隆浩、竹中 克斗、池添 隆之（分担：原田浩徳）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 432（分担：pp141-144）
3. 書名 専門医のための血液病学（分担：治療関連骨髄性腫瘍）	

1. 著者名 井上 英史、都筑 幹夫 (分担: 原田浩徳)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 240 (分担: pp95-130)
3. 書名 基礎講義 生物学 (分担: 動物の体内環境)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京薬科大学生命科学部腫瘍医学研究室 https://toyaku-ls-oncology.com/</p>
--

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 分 担 者	原田 結花 (Harada Yuka) (50379848)	東京都立駒込病院(臨床研究室)・臨床試験科・部長 (82685)	

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		
米国	シンシナティ小児病院医療センター		