

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17864

研究課題名(和文)炎症性サイトカインを介したクローン造血の拡大機序に基づく新規白血病予防法の創成

研究課題名(英文) Investigating a novel therapeutic strategy for preleukemic clonal hematopoiesis based on proinflammatory cytokine-mediated cell extrinsic mechanism of clonal expansion

研究代表者

國本 博義 (KUNIMOTO, Hiroyoshi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80464923

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)：In vitro培養系の検討から、賦形剤添加群に比べてIL-1 添加群でTet2欠失細胞の継代培養能の増強はみられず、IL-1 はTet2欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しないことが判明した。一方Tet2欠失細胞は野生型に比べてGM-CSF刺激を加えても単球系細胞への分化やアポトーシスが誘導されにくいことが示唆され、TET2変異陽性細胞はGM-CSF刺激に対する抵抗性を示して未分化性を維持することで結果的に骨髄単球系前駆細胞段階での分化停止、不死化を招き、白血病発症に寄与するのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TET2変異陽性クローン性造血及び慢性骨髄単球性白血病の拡大・進展過程における骨髄単球系サイトカインGM-CSFの役割が明らかにされた。今後野生型及びTet2欠失細胞におけるGM-CSFシグナルの変化やその分子基盤に着目することで、TET2変異陽性クローン性造血や血液腫瘍発生過程におけるGM-CSFシグナルの重要性や治療標的としての可能性も明らかになると期待され、臨床医学的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We first cultured wild-type (WT) or Tet2-null murine BM cells with or without proinflammatory (IL-1, IL-6, IFN γ) or myelomonocytic (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) cytokines in methylcellulose media. In contrast to our initial hypothesis, IL-1 did not induce enhanced replating capacity of Tet2-null hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) in vitro. On the other hand, GM-CSF suppressed clonogenicity of WT cells while enhanced both clonogenicity and replating capacity of Tet2-null HSPCs. Intriguingly, GM-CSF stimulation induced differentiation toward CD11b⁺ myelomonocytes and increased both Annexin V⁺ apoptotic cells and proliferative cells in S/G2/M phase in WT cells, whereas Tet2-null cells were resistant to these differentiative/apoptotic/proliferative effects induced by GM-CSF. These data suggest that Tet2 loss confers HSPCs with functional resistance to GM-CSF stress, leading to enhanced self-renewal and decreased apoptosis of Tet2-null HSCs.

研究分野：血液腫瘍内科学

キーワード：TET2 GM-CSF クローン性造血 慢性骨髄単球性白血病

1. 研究開始当初の背景

2009年にAMLを始めとする広範な血液腫瘍において機能喪失型の *TET2* 変異が初めて同定され¹、その後高齢者に多く白血病へ進展しやすいクローン造血においても高率に *TET2* 変異が同定された。これまでの我々の研究から、*TET2* の機能喪失は造血幹細胞または前駆細胞を増殖させて前白血病状態であるクローン造血を直接的に引き起こすことが明らかとなったが、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。

2. 研究の目的

最近の研究により、*Tet2* 欠失骨髄マクロファージは炎症性サイトカインである IL-18 を産生して炎症を惹起することが明らかとなった²。そこで、まずは *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能に対する IL-18 シグナルの影響を解析し正常造血幹細胞の挙動との違いを明らかにすることを目的に研究を行った。また血球系列特異的 *Tet2* 欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を伴う慢性骨髄単球性白血球様の病態を呈することから³、*TET2* の機能喪失は骨髄単球系へ分化を誘導すると考えられる。そこで顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) などの骨髄単球系サイトカインに対する *Tet2* 欠失細胞の挙動を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

IL-18 を含む炎症性サイトカインあるいは骨髄単球系サイトカインの *Tet2* 欠失造血幹細胞機能に与える影響を明らかにするため、まず炎症性サイトカイン(IL-18, IL-6, IFN γ)あるいは骨髄単球系サイトカイン(G-CSF, M-CSF, GM-CSF)存在下で野生型または *Tet2* 欠失骨髄細胞をメチルセルロース軟寒天培地で継代培養し、各継代で形成されたコロニー数及び継代培養可能回数を比較した。骨髄単球系サイトカインのうち GM-CSF については、GM-CSF 刺激による *Tet2* 欠失造血幹細胞の骨髄単球系への分化、アポトーシス、細胞周期に与える影響を明らかにするため、GM-CSF 存在下で培養後の野生型または *Tet2* 欠失骨髄細胞を用いて、フローサイトメトリーによる細胞表面形質解析、Annexin V/DAPI 染色によるアポトーシス解析、および Ki67/DAPI 染色による細胞周期解析を行った。さらに、野生型または *Tet2* 欠失骨髄系前駆細胞の細胞表面における GM-CSF 受容体 α 鎖の発現を比較するため、抗 GM-CSFR α 抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

4. 研究成果

賦形剤または IL-18 を 25ng/mL の濃度で添加してメチルセルロース軟寒天培地上で造血幹細胞を含む野生型または *Tet2* 欠失マウス骨髄細胞を連続継代培養したところ、賦形剤添加群に比べて IL-18 添加群で *Tet2* 欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった。一方、GM-CSF

(10ng/mL) を添加した場合には、サイトカイン非存在下に比べて野生型細胞はコロニー形成能が減弱するのに対し、*Tet2* 欠失細胞はコロニー形成能・継代培養能が継代培養を重ねるごとに増強することが確認された。GM-CSF 存在下で野生型または *Tet2* 欠失骨髓細胞を培養すると、野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で CD11b 陽性単球細胞数の増加を認めたのに対して、*Tet2* 欠失細胞では GM-CSF を添加しても CD11b 陽性単球の増加はみられなかった。また野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で Annexin V 陽性アポトーシス細胞数や S/G2/M 期に誘導された細胞数が増加したのに対して、*Tet2* 欠失細胞では GM-CSF を添加してもこれらの細胞の増加はみられなかった。野生型に比べて *Tet2* 欠失細胞で GM-CSF に対する反応性が低下するメカニズムを明らかにするため、我々は野生型または *Tet2* 欠失造血前駆細胞分画における GM-CSF 受容体 α 鎖 (GM-CSFR α) の細胞表面発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型と *Tet2* 欠失細胞で GM-CSFR α の発現レベルに有意差はみられなかった。以上より、野生型と *Tet2* 欠失細胞の間の GM-CSF に対する反応性の相違は受容体の発現レベルの違いからではなく、受容体下流の GM-CSF シグナル活性が何らかのメカニズムで変化していることが原因として考えられた。

(参考文献)

1. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009 May 28;360(22):2289-301. PMID: 19474426 DOI: 10.1056/NEJMoa0810069
2. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. Science. 2017 Feb 24;355(6327):842-847. PMID: 28104796 DOI: 10.1126/science.aag1381
3. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. Cancer Cell. 2011 Jul 12;20(1):11-24. PMID: 21723200 DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunimoto Hiroyoshi、Nakajima Hideaki	4. 巻 112
2. 論文標題 TET2: A cornerstone in normal and malignant hematopoiesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 31 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14688	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 Murakami Koichi、Kurotaki Daisuke、Kawase Wataru、Soma Shunsuke、Fukuchi Yumi、Kunimoto Hiroyoshi et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 OGT Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance via PINK1-Dependent Mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108579 ~ 108579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108579	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 Kunimoto Hiroyoshi、Fukuchi Yumi、Murakami Koichi、Ikeda Junji、Teranaka Hiroshi、Kato Ikuma、Miyazaki Takuya、Enaka Makiko、Mitsuhashi Takayuki、Yamazaki Etsuko、Kameyama Kaori、Murata Mitsuru、Okamoto Shinichiro、Nakajima Hideaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Establishment of a High-risk MDS/AML Cell Line YCU-AML1 and its Xenograft Model Harboring t(3;3) and Monosomy 7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HemaSphere	6. 最初と最後の頁 e469 ~ e469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HS9.0000000000000469	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 Kunimoto Hiroyoshi、Nakajima Hideaki	4. 巻 98
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis: Molecular basis and clinical relevance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 106457 ~ 106457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2020.106457	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國本博義・村上紘一・池田順治・寺中寛・加藤生真・宮崎拓也・江中牧子・三ツ橋雄之・山崎悦子・亀山香織・村田満・岡本真一郎・中島秀明
2. 発表標題 忠実度の高いヒト高リスクMDS/AMLモデルの構築
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 1. 國本博義・福地由美・村上紘一・池田順治・寺中寛・加藤生真・宮崎拓也・江中牧子・三ツ橋雄之・山崎悦子・亀山香織・村田満・岡本真一郎・中島秀明
2. 発表標題 3番染色体転座と7番染色体欠失を有する高リスクMDS/AMLからの細胞株と異種移植モデルの樹立
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------