

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03708

研究課題名（和文）造血幹細胞プログラムを標的とした難治性急性骨髄性白血病の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Targeting the haematopoietic stem cell programme to understand the molecular basis of refractory acute myeloid leukaemia.

研究代表者

正本 庸介（MASAMOTO, YOSUKE）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30706974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：EV11-GFPノックインMLL-ENLマウスAMLモデルで、GFP発現によりHSC様、GMP様AML細胞を分別し比較した。難治性AMLを惹起するHSC様AML細胞の特徴として、NF- κ B経路、化学療法耐性関連遺伝子群が濃縮され表現型と合致するとともに、ケモカインの発現上昇がみられた。HSC様発現パターンを呈するEV11高発現AMLモデルでも、HSC様AML細胞に共通した転写プロファイルの特徴として、ケモカイン、IFN- γ 経路などの免疫関連パスウェイが含まれ、cyclin D1によって制御されていた。Cyclin D1、IFN- γ 経路の制御によりAMLの発症を抑制できる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

代表的造血器腫瘍であるAMLの難治性病態を解明するため、AML幹細胞の中でも特に難治性病態に関連するHSC様AML細胞の性質の解析を行った。HSC様AML細胞は幹細胞活性の高さとは関係なく、既知の難治性関連遺伝子群の発現と関連しており、さらに面白いことに、免疫関係の遺伝子発現と関連していた。複数のAMLモデルを用いることにより、cyclin D1、ケモカイン、IFN- γ 経路などがHSC様AML細胞を特徴づけることを明らかにした。またこれらの経路がHSC様AML細胞の脆弱性を構成し、治療標的になりうる可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：In the EV11-GFP knock-in retrovirally induced MLL-ENL murine AML model, HSC-like and GMP-like AML cells were sorted by GFP expression and compared for gene expression pattern. The HSC-like AML cells induce refractory AML despite low leukemia stem cell frequency. The HSC-like AML cells were characterized by enrichment of the NF- κ B pathway, chemotherapy resistance-related gene cluster, and elevated chemokine expression, consistent with the phenotype of HSC-like AML cells. The EV11-high AML model with HSC-like expression patterns also shared the same transcriptional profile as HSC-like AML cells: the immune-related pathways, including chemokines and IFN- γ pathway, which were regulated by cyclin D1. We also demonstrated that the genetic modification of Cyclin D1, chemokine and IFN- γ pathway can suppress AML development.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は代表的な難治性造血器腫瘍である。主に支持療法の進歩により治療成績が向上し、多くの患者が一時的には寛解を得られるようになったが、抗腫瘍療法の選択肢はほとんど増えておらず、長期生存率はあまり改善していない。化学療法抵抗性のAML細胞により高率に再発することがその原因で、白血病幹細胞(LSC)が再発の主な母地と考えられている。LSCはマウスに骨髄移植をした時にAMLを生体内で再構築できる細胞であり、マウスにおいてLSCがAMLの病態形成に果たす重要性は繰り返し示されている。ヒトにおいても、免疫不全マウスに対する異種移植の系で高い再構築能力を示す細胞、つまりLSC活性の高い細胞に特異的に高発現するLSC遺伝子群が高発現する症例では、AMLの治療が効きにくく、予後が悪いことが示されている。LSC遺伝子群による予後予測は遺伝子変異による予後予測とは独立していることから、LSCはヒトAMLの病態形成・治療反応性においても重要と考えられている(Ng et al. Nature 2016)。

汎用されるマウスのAMLモデルにおいてLSCはHSCよりもGMPと類似した性質・遺伝子発現パターンを示し、マウスでの多くのLSC研究はGMPとの類似性を前提に進められてきた。しかしヒトAML症例におけるLSCの性質はマウスと比較して症例ごとに極めて多様である。この多様性の背景に関して上述のように、LSC遺伝子群の発現は遺伝子変異とは独立していることから、少なくともAMLの原因となる遺伝子変異だけでは説明できない。ヒトLSCの遺伝子発現パターンはHSCとの類似性が高い場合も多いことが知られ、実際にヒトで見出されたLSC遺伝子群にはHSCと共通するものが多数含まれていることから、LSCの細胞起源、つまり正常カウンターパートがHSCなのかGMPなのか重要である可能性を着想した。実際、HSCに類似した代謝活性・遺伝子発現パターンを有する細胞を多く有するAML症例では、治療反応性・予後が悪いことが報告されている。しかしAMLにおいて細胞起源が及ぼす影響については、ヒトはもちろん、マウスにおいてもほとんど知られていない。数少ない報告では、ヒトAMLの代表的な原因遺伝子であり、難治性のAMLを起こすことが知られている融合遺伝子MLL-AF9をマウスHSCに発現させて発症したAMLと、GMPに発現させて発症させたAMLでは前者の方がより急激な経過をたどることや、HSC特異的な遺伝子群を発現するとされている(Stavropoulou et al. Cancer Cell 2016)。

申請者の所属する研究室では、正常造血細胞の中でHSC特異的に発現し、HSCの機能維持に重要な転写因子であるEVI1に注目して研究を行ってきた。EVI1はヒトAMLの一部で高発現し、EVI1高発現AMLは治療反応性が極めて悪く、あらゆるAMLの中で最も予後不良な病型である。申請者らの所属する研究室ではEVI1のプロモーター下流にGFPをノックインしたマウス(EVI1-GFPノックインマウス)を開発し、正常HSCおよび慢性骨髄性白血病のLSCがEVI1-GFP陽性で標識されることを示してきたが、このマウスの血液細胞を用いて作製したAMLモデルでは、GFP陽性・陰性分画の両方にLSC活性が認められ、その関係は不定であった(未発表)。申請者がEVI1-GFPマウスのHSC、GMPを用いてMLL-AF9、あるいは同様に難治性AMLの原因となるMLL-ENL融合遺伝子を導入してAMLモデルを作製したところ、GMPからはGFP陰性AML細胞のみが、HSCからはGFP陽性・陰性の細胞が産生された。GFP陽性のAML細胞を培養あるいは別のマウスに移植したところ、GFP陰性の細胞も産生されたが、その逆の変化は見られなかった。またGFP陽性AML細胞の未分化な分画には、GMPの表現型以外にもマウスのHSCを濃縮するLSK(Lineage-, c-kit+, Sca-1+)の表現型を示す細胞が多く含まれ、GFP陰性細胞にはLSK細胞は含まれなかった。これらのことから、GFP陽性の未分化な分画にはHSC様のAML細胞が含まれるが、陰性細胞はGMP様の細胞のみから成ると考えられた。骨髄移植の系で、少数の細胞を移植することでLSC活性を有する細胞の割合を測定したところ、LSCの頻度はGFP陰性細胞で高かったが、LSCの頻度の低いGFP陽性AML細胞を移植したマウスにおいて、AMLはより急激な進行を示し、早期に死亡した。

重要なことに、GFP陽性細胞、つまりHSC様AML細胞を移植して発症させたAMLマウスに、ヒトAMLの治療に用いるシタラピン(AraC)による治療を行ったところ、GFP陽性細胞の方が高頻度に残存した(図2)。つまりHSC様AML細胞は未分化で化学療法抵抗性を示すものの、これらの性質は必ずしもLSC活性とは関連しないことが示唆された。これまでのマウスモデルを用いたAMLモデルのほとんどは、GMP様のLSCを前提としているため、ヒトにおける難治性病態の解明、治療標的の開発のためには、GFP陽性細胞に含まれるHSC様AML細胞の本態を明らかにすることが有用なのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究においては、AMLの病勢の強さ、再発の原因となる化学療法抵抗性は、LSC活性というよりもEVI1を代表とするHSC関連遺伝子群によって制御されるという仮説のもと、EVI1を高発現するHSC様の遺伝子プログラムを有するAML細胞を、通常のマウスモデルで見られるGMP様のAML細胞、あるいは正常HSCと区別する分子学的な特徴を明らかにし、HSC様AML特異的な治療標的を探することを目的とする。

3. 研究の方法

1. HSC 様 AML 細胞の特徴を明らかにする

MLL-AF9、MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウィルスで EVI1-GFP ノックインマウスの HSC に導入して作製した AML 細胞のうち、未分化な分画の GFP 陽性(HSC 様 AML 細胞を含む)、GFP 陰性(GMP 様 AML 細胞)を回収し、RNA-seq により遺伝子発現パターンを比較し、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて特異的なシグナル伝達経路を明らかにする。実際には様々な分化段階の細胞に融合遺伝子が導入されて AML に変化すると考えられ、細胞の起源は多様になることもあり、HSC 様 AML 細胞と GMP 様細胞両者の区別は連続的なものになり、また細胞集団は不均一になると考えられる。それぞれの分画を用いた単一細胞遺伝子発現解析を組み合わせて系統樹を作成し、GFP 陽性 AML 細胞に含まれる HSC 様 AML 細胞に特有の遺伝子発現パターンや、関与する分子、シグナル経路を明らかとするとともに、HSC 様 AML 細胞を濃縮するための表面抗原を明らかにする。

さらに Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq, 種々の抗ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)-seq を用いて、HSC 様 AML 細胞のエピジェネティックな特徴を明らかにする。AML においては病型ごとにスーパーエンハンサーの出現パターンが極めて特徴的な挙動を示し、エンハンサーの異常が病態に密接に関連していることが報告されているため、特に HSC 様 AML 細胞のスーパーエンハンサーのプロファイルに注目して解析し、治療標的の候補を見出す。

これらの解析によって差異を明確にできない場合、HSC 様・GMP 様の AML 細胞に対して CRISPR/Cas9 によるノックアウトライブラリを導入し、ノックアウト前後のバーコード配列を比較することによって、ノックアウトにより *in vitro* で増殖が抑制されるような遺伝子群を探索し、HSC 様 AML 細胞に特徴的な、生存に必須な遺伝子を探索する。

また MLL 融合遺伝子だけでなく、MOZ-TIF2 などの別の AML モデル、あるいは難治性 AML の代表であり、HSC 関連遺伝子群を高発現する代表的なモデルである EVI1 高発現 AML などのモデルを用いて同様の解析を行い、複数のモデルに共通する HSC 様細胞の共通点を明らかにする。

2. マウス AML モデルを用いて検証する

1. の解析で得られた候補遺伝子、シグナル経路について、CRISPR を用いたノックアウト、shRNA を用いたノックダウンを行い、*in vitro*, *in vivo* での AML 細胞の挙動を観察する。化学療法に対する抵抗性の変化についても検証を行う。小分子化合物や中和抗体による当該分子・経路の阻害が可能であれば、これらを用いた治療効果の検証を行い、HSC 様 AML 細胞の化学療法抵抗性を解除するような標的を明らかにする。

3. ヒト AML 検体を用いて検証する

東京大学医学部附属病院で診断・治療を受けた AML 症例の凍結保存骨髄検体を用いて、1., 2. で得られた結果を検証する。症例ごとに 1 細胞レベルで、または症例間で HSC 様 AML 細胞と GMP 様 AML 細胞の遺伝子発現パターンの比較を行う。ALDH 活性や、Hoechst 33342 などの色素の排出能など、ヒト細胞において前向きに(細胞の機能を保持したまま)HSC 類似の性質を示す細胞を区分可能な方法を用いて HSC 様細胞と GMP 様細胞を分取し、*in vitro*, *in vivo* での挙動を観察する。

1., 2. で得られた結果を、遺伝子導入・サイレンシングなどの分子遺伝学的方法を駆使して *in vitro* での培養実験、*in vivo* での異種移植モデルで検証し、マウスで得られた結果をヒト AML の病態理解・治療開発に還元することを目指す。

4. 研究成果

MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウィルスで EVI1-GFP ノックインマウスの HSC に導入して作製したマウス AML モデルで、白血病幹細胞活性の高い L-GMP 分画のうち、GFP 陽性(HSC 様 AML 細胞を含む)、GFP 陰性(GMP 様 AML 細胞)を回収し、RNA-seq により遺伝子発現パターンを比較した。HSC 様 AML 細胞が難治性 AML を惹起する一方で幹細胞活性が低いことを示したが、RNA-seq 解析でも既知の白血病幹細胞維持に関わる NF- κ B 経路に関連した遺伝子群のほか、化学療法耐性関連、ケモカインの発現変動が示され、表現型と合致した。しかし個体による L-GMP 分画構成の不均一性を反映し、発現変動経路については個体差が大きく、ここから HSC 様 AML 細胞の標的経路を絞り込むのは困難だった。そこで HSC 様の遺伝子発現パターンを呈する難治性 AML の代表的病型である EVI1 高発現 AML のモデルを使用することにし、EVI1 高発現 AML モデルマウスの細胞を用いて実施した、下流標的に関する ChIP-seq, RNA-seq の結果と照合した。このように複数のモデルの HSC 様 AML 細胞に共通した転写プロファイルの特徴として、意外なことにケモカイン、IFN- γ 、JAK/STAT、TLR などの免疫系に含まれるパスウェイが多く含まれていた。また EVI1 高発現 AML 細胞の生存に必須な因子として同定した cyclin D1 がこれらの経路を制御していた。HSC 様 AML 細胞の特徴として制御されるパスウェイとして免疫系シグナル伝達経路に注目し、遺伝学的方法を用いてこれらの経路を制御したところ、AML の発症を抑制することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masamoto Y, Chiba A, Mizuno H, Hino T, Hayashida H, Sato T, Bando M, Shirahige K, Kurokawa M.	4. 巻 7
2. 論文標題 EVI1 exerts distinct roles in AML via ERG and cyclin D1 promoting a chemoresistant and immune-suppressive environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1577-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2022008018.	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 Masamoto Y, Honda A, Shinozaki-Ushiku A, Ushiku T, Kurokawa M.	4. 巻 NA
2. 論文標題 Long-term remission after upfront autologous hematopoietic stem cell transplant for CD5+ diffuse large-B cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1120009X.2024.2340147.	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 Masamoto Y, Kurokawa M.	4. 巻 109
2. 論文標題 A key to engineering natural killer cells to attack acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1302-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2023.284272.	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 Masamoto Y, Chiba A, Mizuno H, Hino T, Hayashida H, Sato T, Bando M, Shirahige K, Kurokawa M.	4. 巻 7(8)
2. 論文標題 EVI1 exerts distinct roles in AML via ERG and cyclin D1 promoting a chemoresistant and immune-suppressive environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1577-1593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2022008018.	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 Masamoto Y, Taoka K, Maki H, Kurokawa M.	4. 巻 101(12)
2. 論文標題 Bone marrow involvement is a risk factor for infusion-related reactions in patients with follicular lymphoma treated by obinutuzumab.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2795-2797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-022-04987-5.	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 Masamoto Y, Shimura A, Honda A, Taoka K, Maki H, Kurokawa M.	4. 巻 102(1)
2. 論文標題 Bone marrow involvement is a risk factor for infusion-related reactions in patients with follicular lymphoma treated by obinutuzumab.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 243-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-022-05037-w.	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 Miyachi M, Sasaki K, Kagoya Y, Taoka K, Masamoto Y, Yamazaki S, Arai S, Mizuno H, Kurokawa M.	4. 巻 6
2. 論文標題 CAMK2G is identified as a novel therapeutic target for myelofibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1499-1511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003303	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 Higo T, Suzuki Y, Sato M, Koya J, Mizuno H, Miyachi M, Masamoto Y, Kataoka K, Sumitomo Y, Tsuruta-Kishino T, Sato T, Kurokawa M.	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Heterozygous Dnmt3a R878C induces expansion of quiescent hematopoietic stem cell pool.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.02.006	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 Mizuno H, Koya J, Masamoto Y, Kagoya Y, Kurokawa M.	4. 巻 112
2. 論文標題 Evi1 upregulates Fbp1 and supports progression of acute myeloid leukemia through pentose phosphate pathway activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4112-4126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15098	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hiroki Hayashida, Toshiya Hino, Ken Morita, Yosuke Masamoto, and Mineo Kurokawa,
2. 発表標題 Identification of ZFP91 As the Master Transcription Factor for EVI1 Gene Expression
3. 学会等名 The 65th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Akira Chiba, Toshiya Hino, Hiroki Hayashida, Hideaki Mizuno, Tomohiko Sato, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 EVI1 promotes immune-evasive microenvironment via cyclin D1 in acute myeloid leukemia
3. 学会等名 The 64th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Akira Chiba, Hideaki Mizuno, Toshiya Hino Hiroki Hayashida, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 EVI1 promotes immune-evasive microenvironment via cyclin D1 in acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Hideaki Mizuno, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 EV11 promotes immune-evasive microenvironment via cyclin D1 in acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Akira Chiba, Toshiaki Takezaki, Toshiya Hino, Hiroki Hayashida, Hideaki Mizuno, Tomohiko Sato, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 EV11-positive AML cells show distinct features and high dependency on ETS transcription factor ERG
3. 学会等名 第63回アメリカ血液学会総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Masamoto
2. 発表標題 EV11-positive AML stem cells survive cytotoxic chemotherapy and induce highly aggressive AML
3. 学会等名 第82回日本血液学会総会
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
---------	---------