

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08738

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫細胞の起源となる異常Bリンパ球はどのような機序で生じるか

研究課題名(英文) How does aberrant B lymphocyte produce a origin of multiple myeloma cells?

研究代表者

坂井 晃 (Sakai, Akira)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70284221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常Bリンパ球からiPS細胞を作製(BiPSC)し、Tet-offシステムでAIDを発現誘導可能な細胞株(BiPSCs-AID)を樹立した。この細胞は元のBリンパ球と同様のIgH再構成を持つiPS細胞であり、CD34+/CD38-の骨髄前駆細胞(HPC)に分化可能である。次にゲノム編集を用いて、BiPSCs-AIDに染色体転座t(11;14)とp53の欠失を誘導し、さらにMM発症の初期から認められるKras及びNrasの変異を持つBiPSCsを作製した(Sci Rep, 2021)。これらを単独またはHPCに分化後NRGマウスに移植し、MMまたはBリンパ系腫瘍の発生を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多発性骨髄腫(MM)の腫瘍起源となる異常Bリンパ球は、成熟Bリンパ球が再プログラミングによってポテンシャルを獲得し染色体異常を生じた細胞であることの検証を行う。確認できれば、生体内で加齢や慢性炎症による正常細胞のエピジェネティックな変化が細胞のがん化に繋がる機序の1つであることを支持する腫瘍化のモデルであり、がん発生の予防方法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The onset of MM is often caused by a reciprocal chromosomal translocation (cTr) between chr 14 with IgH and chr 11 with CCND1. We propose that mature B cells gain potential to transform by reprogramming, and then chromosomal aberrations cause the development of abnormal B cells as a myeloma-initiating cell during B cell redifferentiation. To study myeloma-initiating cells, we have already established normal B cell-derived induced pluripotent stem cells (BiPSCs). Here we established two BiPSCs with reciprocal cTr t(11;14) using the CRISPR/Cas9 system. Furthermore, p53 was deleted using the CRISPR/Cas9 system in BiPSC13 with t(11;14). These BiPSCs differentiated into hematopoietic progenitor cells (HPCs). However, unlike cord blood, those HPCs did not differentiate into B lymphocytes by co-culture with BM stromal cell. Therefore, further ingenuity is required to differentiate those BiPSCs-derived HPCs into B lymphocytes.

研究分野：血液および腫瘍内科学

キーワード：成熟Bリンパ球 多発性骨髄腫 iPS細胞 再プログラミング 形質転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) の腫瘍起源は、主に免疫グロブリン H 鎖 (IgH) のクラススイッチ時に *IgH* 遺伝子のある染色体 14 番長腕と他の染色体が相互転座した成熟 B リンパ球由来と考えられている。これは骨髄の幼若な B リンパ球が腫瘍起源である急性リンパ性白血病 (ALL) や濾胞性リンパ腫 (FL) など、*IgH* 遺伝子可変領域 (VDJ) の再構成に伴う他の染色体との相互転座が腫瘍化の原因である B リンパ系腫瘍とは異なる (Lieber MR, Nat Rev Cancer, 2016)。MM では 14 番染色体とサイクリン D1 遺伝子のある染色体 11 番長腕 (11q13) との相互転座 t(11;14)(q13;q32) の頻度が最も高い。また *p53* 遺伝子のある染色体 17p の欠失は MM の病勢の進行に関係する。また MM では他の B 細胞リンパ腫とは異なり、B リンパ球に特異的な細胞表面抗原である CD19 およびその転写調節因子である PAX5 が欠失する。さらに顆粒球系の細胞表面抗原である CD33 の発現やアミラーゼ、アンモニアを産生する骨髄腫細胞もあり成熟 B リンパ球からのエピジェネティックな変化 (再プログラミング) の関与が示唆される。

我々は MM の腫瘍起源となる細胞を見出すため、ヒトの末梢血およびリンパ節の正常 B リンパ球から iPS 細胞 (BiPSCs) を樹立した (Kawamura F, Sci Rep, 2017)。これら BiPSCs は DNA2 本鎖切断に關与する活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現誘導が可能である。さらにゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) による染色体転座 t(11;14) の誘導方法 (Tsuyama N, Oncol Let, 2019) を用いて t(11;14) を持つ BiPSCs を作製し、*p53* 遺伝子を欠失する BiPSC も作製した。

2. 研究の目的

本研究では、我々が正常 B リンパ球から樹立した iPS 細胞 (BiPSCs) を用いて、多発性骨髄腫 (MM) の腫瘍化の起源となる異常 B リンパ球は、成熟 B リンパ球または形質細胞が再プログラミングによって形質変化し、ポテンシャルを獲得した後に染色体異常 (転座) した細胞であることを証明することを目的とする。

具体的な研究項目は、BiPSCs に AID を発現させ DNA2 本鎖切断の誘導による染色体転座の誘発、染色体転座 t(11;14) および *p53* 欠失または AID を発現させた BiPSC の *in vitro* での B リンパ球への分化方法の検討 上記の BiPSCs を造血前駆細胞 (HPC) への分化後、免疫不全 (NOG) マウスの骨髄へ移植し MM または B リンパ球系腫瘍形成能の検証である。

3. 研究の方法

我々が樹立した正常 B リンパ球由来の iPS 細胞 (BiPSCs) は、DNA2 本鎖切断に關与する AID を発現誘導可能である。さらにゲノム編集により染色体転座 t(11;14) を持ち *p53* 遺伝子を欠失するがストローマ細胞 (AGM-S3) との共培養で造血前駆細胞 (HPC) に分化する。これらの細胞を用いて以下の研究を行う。

1. AID の発現誘導が可能な BiPSC t(11;14)*p53*KD を作製する (BiPSC t(11;14)*p53*KD-AID)。
2. それぞれの BiPSCs (BiPSC, BiPSC t(11;14), BiPSC t(11;14)*p53*KD, BiPSC t(11;14)*p53*KD-AID) を HPC に分化させた後さらに B リンパ球への分化用ストローマ細胞 (MS-5) との共培養で B リンパ球への分化が可能か検討する。
3. B リンパ球への分化の確認は、細胞表面抗原 CD10, CD19, CD27 の発現の有無の解析で行う。また染色体転座 t(11;14) を持つ BiPSCs では、B リンパ球への分化に伴うサイクリン D1 の発現誘導の有無を確認する。
4. それぞれの BiPSCs を HPC に分化させ免疫不全 (NRG) マウスの骨髄に移植し、多発性骨髄腫 (MM) またはリンパ系腫瘍が形成できるか検討する。(阿部、柳、坂井が担当)
5. 移植マウスで腫瘍が形成された場合は、腫瘍細胞の HE 染色、免疫組織染色、細胞表面抗原染色法で腫瘍細胞の特性を解析し、G-band 法とマルチカラー-FISH 法で染色体異常の解析を行う。
6. MS-5 との共培養だけでは B リンパ球への分化が難しい場合は、*CD34* 遺伝子プロモーターを *Pu.1*, *E2A*, *EBF* 遺伝子上流に組込んだベクターを作製し、BiPSCs に移入後 BiPSCs が AGM-S3 との共培養により *CD34* 陽性 HPC に分化した時点で B リンパ球系へ分化誘導システムを構築する。
7. AID を誘導可能な HPC では、AID を発現させ染色体異常が誘導可能か検討する。染色体異常の有無は、G-band 法とマルチカラー-FISH 法で解析する。
8. BiPSC にゲノム編集により Cre/LoxP システムが誘導可能な 14 番染色体と 11 番染色体を構築し、BiPSCs が *CD27* 陽性の成熟 B リンパ球へ分化時に染色体転座 t(11;14) が起こる系を作製する。この方法は、293T 細胞を用いて確立している。

4. 研究成果

我々は多発性骨髄腫 (MM) の腫瘍起源となる細胞を見出すため、ヒトの末梢血およびリンパ節の正常 B リンパ球から iPS 細胞 (BiPSCs) を樹立した (Kawamura F, Sci Rep, 2017)。これら

BiPSCs は DNA2 本鎖切断に関与する活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現誘導が可能である。さらにゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) による染色体転座 t(11;14)の誘導方法 (Tsuyama N, Oncol Let, 2019)を用いて t(11;14)を持つ BiPSCs を作製し、p53 遺伝子を欠失する BiPSC を作製した (Azami Y, Sci Rep, 2021)。しかしながら、本研究ではマウスストローマ細胞との共培養において、臍帯血由来の造血前駆細胞 (HPC) とは異なり、BiPSCs 由来の HPC からは B リンパ球への分化は認められずさらに工夫が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Azami, Naohiro Tsuyama, Yu Abe, Misaki Sugai-Takahashi, Ken-Ichi Kudo, Akinobu Ota, Karnan Sivasundaram, Moe Muramatsu, Tomonari Shigemura, Megumi Sasatani, Yuko Hashimoto, Shigehira Saji, Kenji Kamiya, Ichiro Hanamura, Takayuki Ikezoe, Masafumi Onodera, Akira Sakai.	4. 巻 11
2. 論文標題 Chromosomal translocation t(11;14) and p53 deletion induced by the CRISPR/Cas9 system in normal B cell-derived iPS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84628-5.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Azami, Naohiro Tsuyama, Yu Abe, Misaki Sugai-Takahashi, Ken-ichi Kudo, Miwa Fukami, Akinobu Ota, Karnan Sivasundaram, Moe Muramatsu, Tomonari Shigemura, Megumi Sasatani, Yuko Hashimoto, Shigehira Saji, Kenji Kamiya, Ichiro Hanamura, Takayuki Ikezoe, Masafumi Onodera, Akira Sakai
2. 発表標題 Study for exploring myeloma-initiating cell using normal B cell-derived iPS cells
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井 晃
2. 発表標題 正常Bリンパ球由来iPS細胞を用いた骨髄腫起源細胞の探索
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会 会長講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misaki Sugai, Naohiro Tsuyama, Yu Abe, Yusuke Azami, Akinobu Ota, Karnan Sivasundaram, Moe Muramatsu, Tomonari Shigemura, Megumi Sasatani, Yuko Hashimoto, Kenji Kamiya, Ichiro Hanamura, Takayuki Ikezoe, Masafumi Onodera, Akira Sakai.
2. 発表標題 Chromosomal translocation t(11;14) induced by Cre-loxP system in normal B cell-derived iPS cells
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki Sugai, Naohiro Tsuyama, Yu Abe, Yusuke Azami, Kenichi Kudo, Akinobu Ota, Karnan Sivasundaram, Moe Muramatsu, Tomonari Shigemura, Megumi Sasatani, Yuko Hashimoto, Kenji Kamiya, Ichiro Hanamura, Takayuki Ikezoe, Masafumi Onodera, Akira Sakai.
2. 発表標題 Chromosomal Translocation t(11;14) Induced by the Cre-loxP System in Normal B cell-derived iPS Cells for the Study of Myeloma-initiating Cells
3. 学会等名 62th ASH Annual Meeting
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
研究分担者	阿部 悠 (Abe Yu) (00722472)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	現在の所属先と職名は、 長崎大学 原爆後障害医療研究所 放射線制御部門 放射線生物・防護学分野 助教
研究分担者	津山 尚宏 (Tsuyama Naohiro) (10335747)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	

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