

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08754

研究課題名(和文) 前白血病幹細胞を標的とした小児白血病の発症予防の試み

研究課題名(英文) Prevention of childhood acute leukemia by targeting pre-leukemic stem cells

研究代表者

江口 峰斉 (Eguchi-Ishimae, Minenori)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50420782

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)：本研究では前白血病幹細胞を標的とする小児急性白血病の発症予防の可能性について検討した。小児期の白血病で高頻度に認められるMLL-AF4、TEL-AML1融合遺伝子を有する前白血病幹細胞モデルをマウスES細胞とiPS細胞を用いて作製した。これらの白血病特異的な融合遺伝子のみでは前白血病幹細胞にとどまっており、白血病化には十分ではないが、ランダムな挿入変異の導入により、白血病幹細胞への進展が得られた。またiPS細胞モデルでは白血病患者由来のiPS細胞では増殖刺激により低頻度ではあるが融合遺伝子の形成が認められた。融合遺伝子の生成には患者の有する何らかの遺伝的背景が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療法の進歩により小児白血病の治療成績は近年大きく改善している。しかしながら強力な化学療法による副作用が成長障害などの長期的な後遺障害を引き起こすことも多い。白血病の発症予防が可能となれば小児白血病の予後の改善が期待できる。前白血病幹細胞は白血病幹細胞へ進展し、白血病発症の元となる重要な細胞である。白血病の発症予防のためには前白血病幹細胞の根絶が必須であり、その生存・維持のメカニズムと白血病幹細胞への進展のメカニズムが明らかになれば、新たな治療法の開発へつながり、小児白血病患者の予後改善が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Prevention of leukemic development is most effective treatment of pediatric leukemia. To clarify the process of leukemic stem cell (LSC) generation from pre-leukemic stem cells (pre-LSC), experimental model of pre-LSC was established using mouse embryonic stem (ES) cells expressing leukemia-specific fusion genes and patient-derived iPS cells. Hematopoietic progenitor cells derived from fusion gene-expressing mouse ES cells were not able to initiate leukemia by transplantation into immune-deficient mice, indicating that these cells were in pre-LSC state. After introducing insertional mutagenesis mouse ES cell-derived hematopoietic progenitor cells generate leukemia in transplanted mice. Hematopoietic progenitor cells obtained from patient-derived iPS cells harbored MLL fusion gene in low frequency, which was not detected in iPS from healthy controls. It was suggested that some, yet unknown genetic background of the patient may be involved in the generation of the MLL fusion gene.

研究分野：小児科学、血液腫瘍学

キーワード：小児白血病 前白血病幹細胞 白血病幹細胞 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病の多段階発がん和前白血病幹細胞

白血病は無秩序な増殖能を獲得した白血病幹細胞 (leukemic stem cell, LSC) に由来する腫瘍である。白血病幹細胞は病型特異的な染色体・遺伝子異常である、いわゆる 1st hit の遺伝子変異と、付加的遺伝子異常(2nd hit)の蓄積により多段階に形成される。小児白血病では 1st hit の遺伝子変異として、融合遺伝子の形成がしばしば認められる。1st hit のみを有する白血病幹細胞の前駆細胞である前白血病幹細胞 (pre-leukemic stem cell, pre-LSC) は、白血病を発症させる能力はないが、白血病幹細胞を生み出す母地となる (図 1)。小児期の急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) に高頻度に認められる遺伝子異常である *ETV6-RUNX1* 融合遺伝子は、白血病を発症していない児の臍帯血の 1-2% の頻度で検出され、概ね 10^3 - 10^4 個に 1 個の割合で *ETV6-RUNX1* 陽性細胞が存在する (Eguchi-Ishimae ら, Blood. 2001;97:737.)。実際の *ETV6-RUNX1* 陽性 ALL の発症頻度は 1 万人に 1 人程度であることから、その 100 倍程度の頻度で前白血病幹細胞を有する、前白血病状態の小児が存在し、その前白血病状態の小児の 1% しか最終的に ALL を発症しないことになる。

(2) 小児白血病における前白血病幹細胞と白血病発症過程

小児期の白血病の特徴の一つは、白血病細胞の形成が胎生期に遡るということである

(Greaves ら, Nat Rev Cancer. 2003;3:639.)。 *MLL-AF4* 融合遺伝子陽性の乳児 ALL、 *ETV6-RUNX1* 陽性 ALL や、高 2 倍体性(High hyperdiploidy)の染色体異常を有する ALL、 *NOTCH1* 遺伝子変異を有する T 細胞性 ALL 等の胎生起源が証明されており、小児白血病では胎生期に 1st hit の遺伝子変異のみを有する前白血病幹細胞が形成され、白血病発症への準備状態(前白血病状態)が形成されていると考えられる。

胎生期に 1st hit の遺伝子異常が生じるメカニズムは、十分には解明されていない。 *MLL* 融合遺伝子の形成には、トポイソメラーゼ II 阻害作用による DNA 切断が誘因として重要と考えられているが、基本的には胎生期の造血細胞への過剰な増殖刺激による複製エラーや修復ミスが融合遺伝子等の遺伝子異常の形成の背景にあると考えられる。一方 2nd hit の遺伝子異常に関しては、マウスモデルなどを用いた解析が報告されているが、その形成のメカニズムもまた不明である。 *ETV6-RUNX1* 陽性の ALL では、2nd hit の遺伝子異常は概ね遺伝子欠失であり、免疫グロブリン遺伝子などの再構成に関与する組み換え蛋白である *RAG1/RAG2* の機能異常が関与することが示されている。

小児白血病症例の疫学解析から、小児白血病の発症リスクはありふれた一般的な病原体への曝露に影響されることが示されている。乳児期の病原体への曝露は白血病発症に抑制的に作用するのに対して、年長児でのタイミングの遅れた病原体への曝露は白血病の危険因子であることが示されている('delayed infection'仮説, Greaves M. Nat Rev Cancer. 2018;18:471.)。

マウスモデルの解析では、 *ETV6-RUNX1* や *PAX5* 欠失を有する前白血病幹細胞の存在下でマウスを無菌環境から病原体の存在する環境に移すと有意に白血病を発症することが示された (Cancer Res. 2017;77:4365., Cancer Discov. 2015;5:1328.)。発症した白血病細胞は *JAK3* 変異等の 2nd hit の遺伝子異常を有し、感染後の免疫応答が遺伝子異常獲得に導く過程が示唆された。

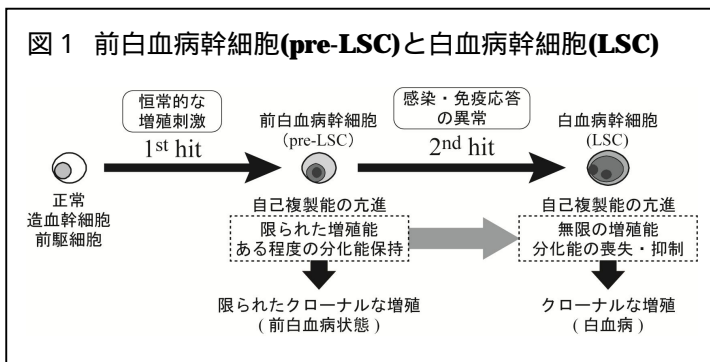
2. 研究の目的

化学療法の進歩や造血幹細胞移植の普及により、小児白血病の治療成績は近年大きく改善している。しかしながら強力な化学療法による副作用が成長障害などの長期的な後遺障害を引き起こすことも多い。一方で小児白血病では様々な病型特異的な染色体・遺伝子異常が認められ、特に白血病特異的な融合遺伝子の形成が小児期の白血病では高頻度に認められる。白血病ではこれらの遺伝子異常の種類により腫瘍の悪性度が規定されることが多い。

白血病治療による後遺障害を抑制するためには、化学療法の治療強度を弱める必要があり、そのためには、遺伝子異常により白血病の予後予測・治療反応性を詳細に層別化する必要がある。またそれぞれの遺伝子異常の白血病化のプロセスを明らかにして、有効な治療介入の方法を病型毎に検討する必要がある。

白血病の一部では白血病を発症する前の前白血病状態の存在が証明されており、小児白血病では、その前白血病状態は出生前の胎生期に形成されていることも証明されている。この前白血病状態を正確に診断し、白血病発症に進展する因子を同定する事が出来れば、白血病の発症予防が可能となる。

本研究課題では、小児白血病の発症を確実に予防できる方法の開発を目指して、小児白血病の前白血病幹細胞(前白血病状態)の特徴と白血病幹細胞への進展メカニズムの解明を試みた。

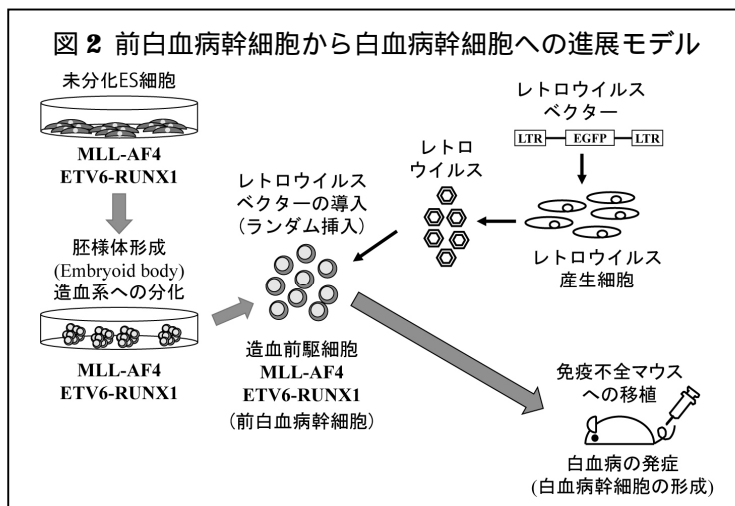


3. 研究の方法

(1) 白血病特異的融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞を用いた前白血病幹細胞モデルの解析

CAG プロモーター下に恒常的に MLL-AF4 あるいは ETV6-RUNX1 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製し実験に用いた。このマウス ES 細胞を造血系の細胞へ分化させ、造血コロニーアッセイや免疫不全マウスへの移植により *in vitro* および *in vivo* で造血細胞への分化能と白血病細胞の形成能を検討した。また白血病幹細胞への進展に必要な付加異常を導入するために、これらの融合遺伝子を有するマウス ES 細胞ヘインサートを持たないレトロウイルスベクターを感染させ、ランダムな挿入変異を導入した。付加的な遺伝子異常の導入後に増殖能を検討し、白血病幹細胞形成の可能性を検討した。

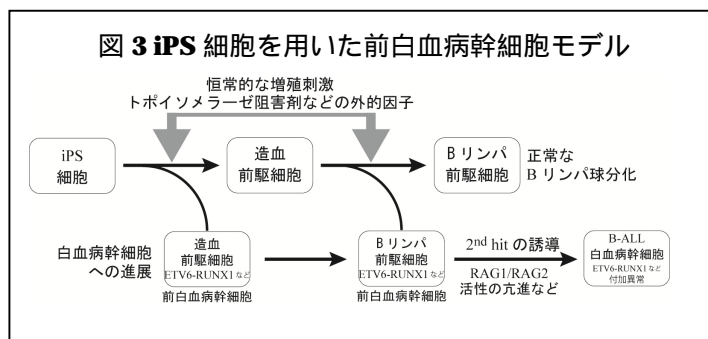
また挿入変異の導入により増殖活性を獲得したマウス ES 細胞由来の造血前駆細胞と免疫不全マウスへの移植後に発症した腫瘍組織から DNA を抽出し、レトロウイルスの挿入部位を同定することによって、造血細胞の腫瘍化に関与したと思われる付加的遺伝子異常の同定を試みた(図 2)。



(2) ヒト iPS 細胞を用いた小児白血病の前白血病幹細胞の実験モデルの作製

健康人および小児白血病患者の末梢血細胞を用いて iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞を OP9 等のストローマ細胞や造血サイトカインと共培養することにより、造血幹細胞、造血前駆細胞および B リンパ球へ分化させ、その分化能・増殖能を造血コロニーアッセイを用いて *in vitro* で検討した (図 3)。

また前白血病幹細胞の形成に必要な 1st hit の遺伝子異常が、造血細胞への分化に伴うサイトカイン刺激等による恒常的な増殖刺激により誘導される可能性を検討するために、iPS 細胞から造血前駆細胞やリンパ球への分化段階で定期的に検体を採取し、PCR 法などで遺伝子異常の形成をモニタリングした(図 3)。



4. 研究成果

MLL-AF4 融合遺伝子と ETV6-RUNX1 融合遺伝子を有するマウス ES 細胞を作製し、免疫不全マウスへの移植によるモデルを用いて前白血病幹細胞の存在する前白血病モデルの解析を行うとともに、前白血病幹細胞から白血病幹細胞への進展に必要な因子について解析を行った。MLL 融合遺伝子、ETV6-RUNX1 融合遺伝子ともに単独では移植マウスに早期に白血病を発症しないことから、これらの融合遺伝子のみを有する細胞は前白血病幹細胞としての性格を有しており、ES 細胞を用いた前白血病幹細胞モデルは有用な実験系であると考えられた。

レトロウイルスベクター導入による挿入変異の付加により、これらの融合遺伝子を有するマウス ES 細胞の一部で造血コロニーアッセイにて増殖能が亢進し、免疫不全マウスへの移植により腫瘍の発症を認めた。増殖能を獲得した細胞より抽出した DNA を用いてレトロウイルスの挿入部位を同定した。MLL-AF4 融合遺伝子陽性細胞では、遺伝子のプロモーター領域へのレトロウイルスの挿入を認め、特定の遺伝子の発現亢進が白血病の発症に寄与することが示された。また ETV6-RUNX1 陽性細胞では遺伝子のコーディング領域にレトロウイルスの挿入を認め、特定の遺伝子の発現の低下・抑制が移植マウスでの白血病発症の促進に寄与していると考えられた。

前白血病幹細胞の形成過程(白血病特異的融合遺伝子の形成過程)を解明するためにヒト iPS 細胞と造血細胞への分化実験系を用いて新たな前白血病幹細胞モデルの作製を試みた。健康成人の末梢血より iPS 細胞を樹立し、B リンパ球系の前駆細胞を含む造血前駆細胞への分化実験系を確立した。iPS 細胞から造血前駆細胞への分化により、CD34 陽性造血前駆細胞への分化が認められ、また得られた CD34 陽性細胞を用いて、B リンパ球への分化刺激により B220 および CD127(IL7 受容体)を発現する B リンパ球前駆細胞への分化が認められた。MLL 融合遺伝子を

有する急性白血病症例の寛解時の末梢血より同様に iPS 細胞を樹立し、同様に造血前駆細胞への分化実験を行った。iPS 細胞から得られた CD34 陽性細胞は白血病患者由来の iPS 細胞でも健康陣由来の iPS 細胞と同程度であり、また B220 および CD127 陽性の B リンパ球前駆細胞への分化にも有意な差はなかった。しかしながら白血病患者由来の iPS 細胞から得られた造血前駆細胞は、造血コロニーアッセイにより低頻度ながら自律性に増殖する造血コロニーが生じることが示された。この自律性に増殖する造血コロニーは replating による連続したコロニーアッセイにおいては継続した増殖能・自己複製能を示さず、3 - 4 回の replating で増殖能は失われた。

この B リンパ球分化の過程において、MLL 融合遺伝子の形成の有無を inverse PCR 法により検討したところ、白血病患者由来の iPS 細胞から得られた造血細胞で低頻度ではあるが MLL 融合遺伝子の形成が検出された。対照群の iPS 細胞では MLL 融合遺伝子は検出されなかった。MLL 遺伝子の切断を誘発する化学物質である Topoisomerase-II 阻害剤、Etoposide の MLL 融合遺伝子形成における影響を検討するために、CD34+細胞を Etoposide で処理した後に B リンパ球への分化を行ったが、MLL 融合遺伝子は検出されず、その検出頻度は増加しなかった。患者の iPS 由来造血細胞における MLL 融合遺伝子の生成に Etoposide は必ずしも必要ではなく、患者の有する何らかの遺伝的背景が MLL 遺伝子の再構成に関与している可能性が示唆された。

今後 ETV-RUNX1 陽性の白血病患者より iPS 細胞を樹立し同様の検討を行うとともに、iPS 細胞から得られた造血前駆細胞に ETV6-RUNX1 や MLL-AF4 等の融合遺伝子を CRISPR-Cas9 系にて導入することにより前白血病幹細胞を作製し、同様の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 石前峰斉、江口真理子	4. 巻 84
2. 論文標題 小児白血病におけるゲノム医療研究の進歩	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 578-587
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 江口真理子、石前峰斉	4. 巻 85
2. 論文標題 胎生期発症の乳児白血病の病態と治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 202-211
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 Yuko Tezuka, Minenori Eguchi-Ishimae, Erina Ozaki, Toshiyuki Ito, Eiichi Ishii, Mariko Eguchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Activation of fibroblast growth factor-inducible 14 in the early phase of childhood IgA nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0258090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258090	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 Yoshimatsu Takaharu, Nagai Kozo, Miyawaki Reiji, Moritani Kyoko, Ohkubo Kazuhiro, Kuwabara Jun, Tatsuta Kyosuke, Kurata Mie, Fukushima Mana, Kitazawa Riko, Hamada Junpei, Ochi Fumihiro, Eguchi-Ishimae Minenori, Tauchi Hisamichi, Eguchi Mariko	4. 巻 13
2. 論文標題 Malignant Ovarian Steroid Cell Tumor, Not Otherwise Specified, Causes Virilization in a 4-Year-Old Girl: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000506044	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 Ochi Fumihito, Tauchi Hisamichi, Miyata Toyohisa, Moritani Tomozo, Chisaka Toshiyuki, Hamada Junpei, Nagai Kozo, Eguchi-Ishimae Minenori, Eguchi Mariko	4. 巻 2020
2. 論文標題 Brain Abscess Associated with Polymicrobial Infection after Intraoral Laceration: A Pediatric Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8304302	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 0件)

1. 発表者名 坂口大典、塩田光隆、塚原 堯、山形雄伸、三上真充、園田真理、佐藤正人、江口真理子、石前峰斉、秦 大資
2. 発表標題 ACIN1-NUTM1融合遺伝子を認めた乳児B前駆細胞性急性リンパ性白血病の一例
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森谷京子、中村亮太、岩本麻友美、宮本真知子、加賀城真理、永井功造、桑原 淳、石前峰斉、田内久道、江口真理子
2. 発表標題 当院で実施したがん遺伝子パネル検査の小児症例についての検討
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本真知子、中村亮太、岩本麻友美、森谷京子、石前峰斉、山下大介、北澤理子、北澤莊平、義岡孝子、江口真理子
2. 発表標題 EWSR1-FLI1融合遺伝子の検出が診断に有用であった頭蓋内原発末梢性神経外胚葉性腫瘍の一例
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河上早苗、野間真依子、今井 剛、永井功造、石田也寸志、石前峰斉、江口真理子
2. 発表標題 環状21番染色体を有し、iAMP21を疑ったBCP-ALLの9歳女児
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮脇零士、岩本麻友美、加賀城真理、森谷京子、石前峰斉、田内久道、江口真理子、永井功造、東元 健、副島英伸
2. 発表標題 Paternal uniparental disomy(patUPD)モザイクを示したBeckwith-Wiedemann症候群に合併した肝芽腫の1例
3. 学会等名 第62回小児血液がん学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tezuka-Kagajo M, Hatta Y, Maekawa M, Ogawa A, Ishimae M, Eguchi M, Higashiyama S
2. 発表標題 Development of human CBF1-targeting single-stranded DNA aptamers as angiogenic inhibitors.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮脇零士、石前峰斉、江口真理子（分担）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クリニコ出版	5. 総ページ数 112
3. 書名 ヘマトロジー3 - 悪性リンパ腫に対する新たな治療展開 - トピックス AYA世代の造血器腫瘍の遺伝子異常と治療戦略	

〔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	江口 真理子 (Eguchi Mariko) (40420781)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

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