

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21538

研究課題名(和文)白血病最初期における白血球細胞出現機構の解明

研究課題名(英文)Study for mechanisms of emergence of leukemia cell

研究代表者

黒川 峰夫(Kurokawa, Mineo)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に前白血病状態および白血病に反復的に出現するDNMT3A, ASXL1, RUNX1の変異に対応する遺伝子改変マウスがそれぞれ前白血病状態を生じることを明らかにした。これらのマウスの造血細胞にもう一つの変異がん遺伝子を強制発現すると白血病を発症することがわかったが、本研究においてはウイルスによる遺伝子導入によるノイズを避けるため、Dnmt3a変異 x Kras変異での白血病発症を新たに試みた。今後、細胞起源を区別できる核酸バーコードと単一細胞解析を組み合わせることで白血球発症までの複数の時点で経時的に解析することで、最終的に白血病発症に至った細胞の特徴を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病の発症過程においては、複数の遺伝子変異が造血幹細胞や造血前駆細胞に蓄積し、前白血病状態を経てから急性骨髄性白血病になることが知られている。しかしながら前白血病状態と白血病状態を区別する機構は未だ明らかでは無く、従って前白血病状態から白血病発症に至る鍵となる機構についても同定されていない。本研究では前白血病状態から白血病への進展を再現するモデルマウスを用いて、前白血病状態から白血病に至るプロセスを同定する。本研究の継続により白血病初期段階の機構を解明し、白血病予防治療を含む先進的な治療の確立することが可能である。

研究成果の概要(英文)：We found that genetically modified mice corresponding to mutations in DNMT3A, ASXL1, and RUNX1, which recurrently appear in clonal hematopoiesis and leukemia produce preleukemic state. Overexpression of another mutated oncogene in the hematopoietic cells of these mice resulted in the development of leukemia. In this study, we newly attempted to develop leukemia with the Dnmt3a mutation x Kras mutation to avoid noise caused by viral transduction. We will combine nucleic acid barcoding, which can distinguish cellular origin, with single cell analysis to analyze the cells over time at multiple time points up to the onset of leukemia to characterize the cells that ultimately led to the onset of leukemia.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 クローン性造血 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

われわれは今までに主に EVI1 高発現白血病、MLL 遺伝子変異白血病などの難治性白血病を対象として種々のマウスモデルの樹立およびそれらを用いた治療標的の同定に成功してきた (EMBO J 2000, Blood 2011, Blood 2013, Blood 2014, Blood 2016)。また、前白血病状態における遺伝子異常による造血細胞の機能変化についても明らかにした (Leukemia 2019)。しかしながら前白血病状態と AML を直接結び付ける制御機構については未だ明らかになっていない。これまで前白血病状態から AML が生じる初期段階における少数の AML 細胞を用いた機能解析は困難であったが、scRNA-seq の技術を用いて例え少数の細胞群であっても細胞内トランスクリプトームの変化を経時的な解析が可能になり、in vivo の生理的な条件下において AML 発症のプロセスを追跡してその病態を明らかにできるようになったため、本研究の着想に至った。

本研究構想は、前白血病状態から AML 発症へ至る際の詳細なプロセスを明らかにし、2 つの異なる状態を橋渡ししようという点で独創性があり、これまでブラックボックスだった領域に踏み込むものである点で挑戦的研究としての意義がある。これまでの造血器腫瘍研究においては、前白血病状態における遺伝子異常が前白血病細胞においてどのような役割を果たしているか、または、AML 細胞において遺伝子異常が AML 細胞または白血病幹細胞においてどのような機能を有するか、というように前白血病状態と AML で研究対象が分かれていた。これはマウスモデルにおいても前白血病状態から AML へ移行する時点の予測が難しく、前白血病状態から AML への移行を予測できたとしても多数の AML 細胞が出現するまで解析対象の細胞が判然としないといった技術的な困難があったためである。そこで本研究では、AML 発症時期を狭めるためにテトラサイクリン依存的に 2 種類目の遺伝子異常を導入することで人為的に前白血病状態から AML への移行を生じさせ、scRNA-seq の技術を用いて少数の初期 AML 細胞の詳細な解析を行うことで技術的な障壁をクリアしようとするものである。

また、本研究の手法は他の癌腫においても目新しいものである一方で、同様の多段階遺伝子異常によるがん発症マウスモデルを構築することで前がん状態からがん化へのプロセスを高い時間的解像度で追跡することが可能になり、更なる新規治療標的の同定に結び付くことが期待される。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病 (AML) では、複数の遺伝子変異 (ドライバー変異) が造血幹細胞や前駆細胞に蓄積し、前白血病状態を経て白血病に進行する。実際には個々のドライバー変異は、多くの副次的な細胞内異常を生じることで白血病を発症させる。こうしたドライバー変異は数多く同定されてきたが、それらを標的とした治療の多くは根治療法となっていない。完成した白血病では病因とは無関係の異常も多く蓄積していて、前白血病状態から AML への進展の最終過程において、既知のドライバー変異にもとづくどのような異常が原因となるかが特定されていないからである。本研究では、前白血病状態から AML への進展を再現するマウスモデルにおいて、経時的に病的細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析を行うことで前白血病状態から AML へ移行するプロセスを動的に捕捉し、前白血病状態にある細胞が AML へ進展する際に決定的な役割を果たす細胞内過程を明らかにし、革新的な治療の基盤確立を行う。

3. 研究の方法

本研究では 2 種類のドライバー遺伝子変異を組み合わせることで、初めて AML を発症するマウスモデルを用いる。第一の遺伝子変異を有する造血細胞に、in vivo においてテトラサイクリン誘導的に第二の変異遺伝子を発現させて AML に導く。また、2 種類の遺伝子異常を持つ細胞の一部が病態を進展させることで AML を発症すると考えられる。そこでテトラサイクリン投与直後の前白血病状態から AML 発症後まで、経時的にマウス骨髓液の採取を行い、得られた造血細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq) を行う。これにより、『最初は微小なクローンであったが最終的に AML を発症した細胞群』を特定し、この細胞群の経時的な遺伝子発現プロファイルの変化を捉え、AML の発症プロセスを明らかにする。多段階の AML 発症過程の最終段階に決定的な因子を同定し、新たな治療標的を確立する。

(1) 前白血病状態から AML 発症までの経時的な scRNA-seq

申請者らは、AML で高頻度に見られるクロマチンリモデリング因子 *Asx1G643fs* 変異、DNA メチルトランスフェラーゼ *Dnmt3aR878C* 変異のノックインマウスをそれぞれ樹立した (Leukemia 2019, Exp Hematol 2022)。これらの変異は前白血病状態において高頻度に認められるドライバー変異である。*Runx1* 遺伝子異常はヒトで高頻度に AML を発症することが知られており、造血細胞特異的に *Runx1* を欠失させたマウス (*Runx1^{-/-}*) も前白血病状態のモデルとなる (Nat Med 2004)。これらの 1 つ目の遺伝子異常を有するマウスの造血幹細胞において、協調して AML を発症する 2 種類目の遺伝子異常をテトラサイクリン誘導性に発現するようにトランスジェニックマウスまたはレンチウイルスを用いて導入する。この造血幹細胞を同系マウスに移植し、1 つ目

のドライバー変異による前白血病状態を作り出した後で、テトラサイクリンを投与して 2 つ目のドライバー変異の発現を誘導して AML を発症させる。Runx1 / xNrasG12V、Asxl1G643fsxIDH1R132H、Dnmt3aR878CxKrasG12D をドライバー変異のペアとして用いる。

テトラサイクリン投与開始後から AML 発症まで、同一個体のマウスから経時的に骨髓液を採取し、骨髓中の造血幹細胞および前駆細胞について scRNA-seq を行う。この結果の解析により、最終的に AML を発症したクローンが前白血病状態からどのように拡大したかを追跡し、そのクローンにおいて経時的に変化したシグナル経路、細胞内代謝経路をもとに AML 発症において鍵となる因子を同定する。in silico の解析により絞り込みを行う。3 系統の AML 発症モデルに共通する因子を同定することができれば、広く AML に応用可能な治療標的が得られる。

(2) 同定された因子の阻害効果の解析および機能解析

特定された AML 発症の鍵となる因子に対して、その阻害により得られる治療効果を検証する。もし共通の因子が抽出されれば、他の白血病マウスモデルでも検証を行う。また、in silico の解析で推定される機能について、実際に変化が生じているかを解析する。具体的には、エピジェネティック異常（ヒストン修飾や DNA メチル化）、代謝異常（メタボローム、酸化ストレス、ミトコンドリア機能）、骨髓微小環境との相互作用（骨髓間葉系幹細胞への影響、骨髓中サイトカイン濃度）を解析する。

4. 研究成果

前白血病状態を再現する DNMT3A 変異マウス、ASXL1 変異マウス、RUNX1 ノックアウトマウスに加えて、急性骨髄性白血病患者の RNA-seq 解析から同定した HMGA1 高発現を同系移植で再現したモデルマウスも前白血病状態を呈することを見出した。また、Dnmt3a 変異マウスの造血幹細胞分画に変異 Nras を高発現させ同系移植を行う系および Asxl1 変異マウスの造血幹細胞分画に変異 IDH1 を高発現させ同系移植を行う系において、それぞれ白血病への進展が認められた。

本研究の白血病発症初期の病態解明においては遺伝子導入によるノイズを除くためトランスジェニックマウスでの解析が望ましいと考えられ、Dnmt3a 変異 x Kras 変異マウスでの白血病発症を新たに試みた。今後、この白血病マウスモデルの白血病発症前の造血幹・前駆細胞にウイルスにより細胞起源を区別できる核酸バーコードを導入し、単一細胞解析を組み合わせ、白血病発症までの複数の時点で経時的に解析することで、最終的に白血病発症に至った細胞の特徴を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kurihara Y, Mizuno H, Honda A, Shimura A, Fujioka Y, Maki H, Kurokawa M.	4. 巻 26
2. 論文標題 CCDC88C-FLT3 gene fusion in CD34-positive haematopoietic stem and multilineage cells in myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of cellular and molecular medicine	6. 最初と最後の頁 950-952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.17143	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 Miyuchi 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 1585-1597
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 Higo T, Suzuki Y, Sato M, Koya J, Mizuno H, Miyuchi M, Masamoto Y, Kataoka K, Sumitomo Y, Tsuruta-Kishino T, Sato T, Kurokawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 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 -
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 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 -

1. 著者名 Honda A, Koya J, Yoshimi A, Miyauchi M, Taoka K, Kataoka K, Arai S, Kurokawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in BCOR contribute to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	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) 10.1016/j.exphem.2021.07.005	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kazutoshi Ebisawa, Yosuke Masamoto, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 HMGA1 IS UPREGULATED IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES WITH MUTATION IN PRE-MRNA SPLICING GENES AND INHIBITS LEUKEMIA CELL DIFFERENTIATION
3. 学会等名 2020 ASH Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Akira Chiba, Yosuke Masamoto, Hideaki Mizuno, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 GF11 Is a Downstream Target of EVI1 in Normal Hematopoiesis
3. 学会等名 2020 ASH Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Yusuke Ito, Fumio Nakahara, Yuki Kagoya, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 CD62L Expression Level Dictates the Cell Fate of Myeloid Progenitors in Mice and Humans
3. 学会等名 2020 ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 松田健佑、籠谷勇紀、水野秀明、山崎翔、宮内将、黒川峰夫
2. 発表標題 モノソミー7を伴う急性骨髄性白血病においてEEDはPRC1依存性に白血病維持に寄与する
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 正本庸介、千葉晶輝、水野秀明、竹崎俊晶、佐藤智彦、黒川峰夫
2. 発表標題 EVI1陽性AML幹細胞は化学療法抵抗性を示し、高悪性度のAMLを起こす
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------