

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08399

研究課題名（和文）骨髄増殖性腫瘍が急性白血病に転化する機序と予防的治療法の解明

研究課題名（英文）The mechanism of leukemic transformation from myeloproliferative neoplasms

研究代表者

植田 航希（Ueda, Koki）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80632190

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）：骨髄増殖性腫瘍のドライバー変異を持つマウスとポリコム制御因子欠失マウスを交配し、骨髄増殖性腫瘍から急性骨髄性白血病に緩徐に進行するマウスモデルを確立した。これらのマウスを解析し、両遺伝子異常の共存で造血幹細胞分画におけるポリコム標的遺伝子の発現異常が増強されることがわかった。一方で、両遺伝子の異常を持つマウスの表現型は生後10ヶ月程度までは単独の遺伝子異常を持つマウスとほとんど変わらないにも関わらず、生後10-18ヶ月でほとんどのマウスが急性骨髄性白血病もしくは骨髄増殖性腫瘍の重症化で死亡する（単独の遺伝子異常では24ヶ月近く生存する）。現在、AML発症マウスの解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄増殖性腫瘍の治療は進歩していますが、白血病への進行を阻止する方法は確立していません。造血細胞にどのような変化が起きると白血病に進行するのかを明らかにするためには、患者さんの骨髄を頻回に採取して、白血病に進行した患者さんと進行しなかった患者さんの違いを調べるのが一番ですが、それでは患者さんの負担が大きすぎます。今回の研究成果から、マウスを用いて病態解明を進めることが期待できます。

研究成果の概要（英文）：To elucidate critical factors to induce leukemic transformation from myeloproliferative neoplasms (MPN), we generated a murine model which slowly develop acute myeloid leukemia (AML) from moderate phenotypes of MPN. We crossbred Calr-10d mice with Ezh2-KO mice, and obtained Calr-10d; Ezh2-KO, Calr-10d;Ezh2-KO respectively. We observed these mice, and found that only Calr-10d;Ezh2-KO mice died with AML or severe MPN during age 10 to 18 months. Calr-10d and Ezh2-KO mice lived nearly 24 months. Upregulation of polycomb target genes were observed in hematopoietic stem cells (HSCs) of Calr-10d;Ezh2-KO mice. Presently, we are analyzing HSCs of moribund AML and MPN mice, and we are expecting to detect important factors for leukemic transformation.

研究分野：骨髄系腫瘍

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 急性転化 急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(MPN)は、真性多血症(PV)・本態性血小板血症(ET)・原発性骨髄線維症(PMF)に分類される。本邦における年間発症率は10万人あたり2-3名、新規発症者は5000から6000人であるが、人口の高齢化などの要因で患者数の増加が認められている。MPN患者のほとんどでJAK-STATシグナルの恒常的活性化をきたす遺伝子変異(*JAK2*-V617F変異や*CALR*のフレームシフト型変異など)が認められる。本邦で2014年から使用可能となったJAK2阻害剤(ルキソリチニブ)は、MPN患者の白血球増多や脾腫などに基づく症状を劇的に改善し、おそらく生命予後も改善すると期待される。一方で、PV/ETの2-4%、PMFの10-20%で10年以内に急性骨髄性白血病(AML)への急性転化が認められ、急性転化した場合の予後は不良である(Blood. 2008; 111: 3383 / Blood. 2014; 124: 2507)。ルキソリチニブが急性転化を減少させるかどうかの結論は現時点では出ていないが、ルキソリチニブ投与下での急性転化は多数報告されており、単剤で急性転化を予防できるとは考えにくい。したがって、MPN患者の急性転化を予防する方法はなく、AML発症を防ぐ先制的治療法の確立が必要とされている。

我々はまず、MPNからAMLへの急性転化をきたすマウスモデルを確立し、急性転化の機序の解明、および急性転化を予防するための治療標的の検索を試みようと考えた。MPNからAMLへの急性転化症例では、MPNのドライバー変異である*JAK2*や*CALR*の変異に加えて、*EZH2*や*ASXL1*などのエピジェネティクス制御因子に機能喪失型変異を認めることが多い(Blood Reviews. 2020; 42: 100708)。こうした変異プロファイルを再現するマウスモデルとしては、*Jak2*-V617F変異マウス(*Jak2*-V617Fトランスジェニックマウスまたは*Jak2*^{V617F/+}マウス)と*Ezh2*コンディショナルノックアウトマウス(*Ezh2*^{-/-})を交配したモデルが報告されている(J Exp Med. 2016; 213: 1459・J Exp Med. 2016; 213: 1479)。このモデルで*Jak2*^{V617F/+};*Ezh2*^{-/-}マウスは*Jak2*^{V617F/+}マウスより早期に重症MPNを発症して死亡するが、MPNの重症化が数ヶ月で生じるためにAML発症の有無を検証する前にマウスが死亡してしまう。一方、我々が樹立した*Calr*変異マウス(*Calr*^{10d/+})は、MPNの表現型が*Jak2*^{V617F/+}マウスより軽症で2年近く生存するため(J Hematol Oncol. 2021; 14: 52)、これを*Ezh2*^{-/-}マウスと交配すれば、AML発症の有無を検証するのに十分な観察期間が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

MPNからAMLへ進行をきたすマウスモデルを確立し、その解析を通じて、AMLへの進行に決定的な役割を果たしている因子を同定する。また、そうした因子の活性化を阻害する薬剤の発見につなげることを目的とする。前述のように、そのためにはAMLを発症しないまま死亡することがない、MPNの表現型が比較的軽症で、緩徐にAMLへと進行するモデルが望ましい。当初の研究計画書に記載した、*Jak2*^{V617F/+}マウスとp53抑制因子であるMDMXを過剰発現する*Mdmx*トランスジェニックマウスを交配するモデルでは、*Jak2*^{V617F/+}マウスそのものが4-6ヶ月しか生存せず、AMLへの進行を観察するのが困難であった。そこで、MPNのドライバー変異として*Jak2*^{V617F/+}を用いることをやめ、かわりに*Calr*フレームシフト型変異マウス(*Calr*^{10d/+})を用いることにした。臨床的にMPNドライバー変異と*EZH2*や*ASXL1*などのエピジェネティクス制御因子の機能喪失型変異が共存するとAMLの発症率が高くなることが報告されているので、まずは*Calr*^{10d/+}を*Ezh2*^{-/-}マウスと交配したモデルを樹立し、経過を観察することにした。

3. 研究の方法

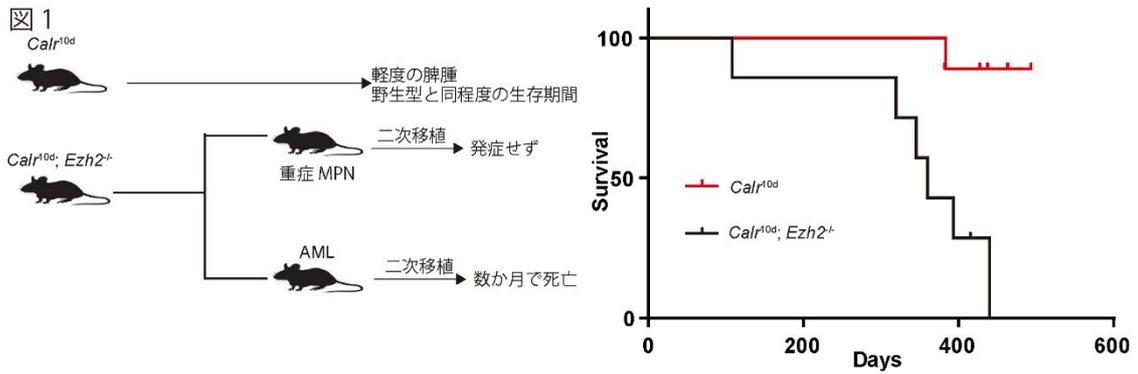
Ezh2^{-/-}マウスと*Calr*^{10d/+}マウスを交配することでそれぞれ*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウス、*Ezh2*^{-/-}マウス、*Calr*^{10d/+}マウスを得て、生存期間や造血の表現型を解析した。

4. 研究成果

Ezh2^{-/-}マウスと*Calr*^{10d/+}マウスを交配することでそれぞれ*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウス、*Ezh2*^{-/-}マウス、*Calr*^{10d/+}マウスを得た。これらの生存期間は、*Ezh2*^{-/-}マウス、*Calr*^{10d/+}マウスの大半が18-24ヶ月だったのに対して、*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウスは10-18ヶ月で多くが死亡した。死亡直前の*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウスから骨髄・脾臓を採取して解析したところ、約半数は脾腫・骨髄線維化認めるが骨髄芽球の増生は認めない重症MPNであり、残りの半数は脾腫に加えて骨髄芽球の増生を認めるAMLであった。AMLを発症したマウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植すると、AMLを発症して数ヶ月で死亡した(図1)。

そこで、AMLや重症AMLを発症する前の生後10ヶ月で各遺伝子型マウスの造血(脾臓の重量や骨髄の細胞数、細胞分画など)を比較した。意外なことに、*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウスは軽度の脾腫や骨髄球系細胞の増加を認めるのみで、*Ezh2*^{-/-}マウス、*Calr*^{10d/+}マウスと大きな差を認めなかった。さらに造血幹細胞分画(LSK細胞)のRNAシーケンスを行ったところ、*Calr*^{10d/+};*Ezh2*^{-/-}マウスのLSKでは*Calr*^{10d/+}だけでなく*Ezh2*^{-/-}マウスと比較しても、ポリコーム標的因子の上昇が認められ

た。特に、*Il7r* は以前の報告で *Jak2*^{V617F/+};*Ezh2*^{-/-} マウスと *Jak2*^{V617F/+} マウスの LSK 同士の比較でも発現上昇が認められていた(JExp Med. 2016; 213: 1459、および我々の報告 Blood Adv. 2017;1:1001)。*Il7r* はリンパ球分化に関わる分子であるが、造血幹細胞から骨髄球系への分化や、組織における骨髄球系細胞の維持に必要なとの報告もあり(Exp Hematol. 2020;90:39)、病態への関与が疑われる。



さらに、現在 AML-type と重症 MPN-type のマウスの死亡直前に採取した骨髄から LSK 分画の RNA シークエンスと全エクソンシークエンスを行っている。今後これらを比較して、AML 発症に必要な因子の抽出につなげる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ueda Koki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Review: MDMX plays a central role in leukemic transformation and may be a promising target for leukemia prevention strategies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2023.04.001	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 Ikeda Kazuhiko, Ueda Koki	4. 巻 401
2. 論文標題 Gaining MOMENTUM against anaemic myelofibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Lancet	6. 最初と最後の頁 248 ~ 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S0140-6736(23)00171-X	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 Ueda Koki, Kumari Rajni, Schwenger Emily, Wheat Justin et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDMX acts as a pervasive preleukemic-to-acute myeloid leukemia transition mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 529-547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ccell.2021.02.006	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 該当する
1. 著者名 Minakawa Keiji, Yokokawa Tetsuro, Ueda Koki, Nakajima Osamu, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Tomita Yusuke, Miura Saori, Sato Yuka, Mimura Kosaku, Sugimoto Koichi, Nakazato Kazuhiko, Nollet Kenneth E., Ogawa Kazuei, Ikezoe Takayuki, Hashimoto Yuko, Takeishi Yasuchika, Ikeda Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Myeloproliferative neoplasm-driving Calr frameshift promotes the development of pulmonary hypertension in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13045-021-01064-8	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 Kimishima Yusuke, Misaka Tomofumi, Yokokawa Tetsuro, Wada Kento, Ueda Koki, Sugimoto Koichi, Minakawa Keiji, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Shide Kotaro, Shimoda Kazuya, Iwama Atsushi, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension with ALK1 upregulation in lung neutrophils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26435-0	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 Ueda Koki, Steidl Ulrich	4. 巻 2
2. 論文標題 Epigenetic Achilles' heel of AML	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cancer	6. 最初と最後の頁 481-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43018-021-00212-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 該当する

1. 著者名 Ikeda Kazuhiko, Minakawa Keiji, Yamahara Kenichi, Yamada Fujiwara Minami, Okuyama Yoshiki, Fujiwara Shin ichiro, Yamazaki Rie, Kanamori Heiwa, Iseki Tohru, Nagamura Inoue Tokiko, Kameda Kazuaki, Nagai Kazuhiro, Fujii Nobuharu, Ashida Takashi, Hirose Asao, Takahashi Tsutomu, Ohto Hitoshi, Ueda Koki, Tanosaki Ryuji	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Comparison of cryoprotectants in hematopoietic cell infusion?related adverse events	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion	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) 10.1111/trf.16877	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Koki Ueda, Saori Miura, Tomofumi Misaka, Keiji Minakawa, Yuka Sato, Yasuchika Takeishi, Kazuhiko Ikeda
2. 発表標題 Interaction between JAK2-Mutated Neutrophils and Platelets Initiates Thrombosis Via Neutrophil Extracellular Traps
3. 学会等名 The 65th American Society of Hematology (ASH) Annual meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2023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	池田 和彦 (Ikeda Kazuhiko) (90381392)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究 分担者	三村 耕作 (Mimura Kosaku) (90568031)	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
---------	---------