

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19540

研究課題名(和文) 乳児白血病の起源となる細胞の同定と多能性の検証

研究課題名(英文) Identification of the cell of origin of infant leukemia with pluripotency

研究代表者

合山 進 (Goyama, Susumu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：80431849

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)：MLL-AF4転座を有するBリンパ性白血病は、最も頻度の高い小児がんである。HOXA9の発現が高いHOXA9型と、IRX1の発現が高いIRX1型の2タイプあり、HOXA9型は年長児および成人に多く、IRX1型は乳児にしか認められない。本研究では、ヒト臍帯血CD34+細胞にMLL-AF4を導入して免疫不全マウスに移植し、IRX1型およびHOXA9型のMLL-AF4白血病モデルを作製した。また、single cell RNA-seqを行い、IRX1型では幹細胞関連遺伝子の発現が上昇していることを見出した。これらは、乳児白血病に対する治療戦略を構築する上で基盤となる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生後1年未満の乳児に発症する白血病を乳児白血病と言います。乳児白血病の多くでMLL遺伝子の異常が認められ、特に、MLL-AF4転座型乳児白血病は、頻度が高くかつ予後も悪いことから臨床上の大きな問題になっています。MLL-AF4転座型白血病は、HOXA9の発現が高いHOXA9型と、IRX1の発現が高いIRX1型の2タイプに分けられます。本研究では、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞にMLL-AF4を導入してHOXA9型、IRX1型の2種類の乳児白血病モデルを作製し、さらに単一細胞RNAシーケンシングを行って両者の病態を明らかにしました。これは、乳児白血病に対する治療法開発の基盤となる成果です。

研究成果の概要(英文)：B-cell acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 translocation is the most common childhood cancer. There are two types, HOXA9 type with high expression of HOXA9 and IRX1 type with high expression of IRX1; HOXA9 type is common in older children and adults, while IRX1 type is found only in infants. In this study, we transduced MLL-AF4 into human cord blood CD34+ cells and transplanted them into immunodeficient NSG mice to generate MLL-AF4 leukemia models with high expression of IRX1 or HOXA9. We also performed single-cell RNA-seq and found that the expression of stem cell-related genes was upregulated in the IRX1 type. These results provide a basis for the development of therapeutic strategies for MLL-AF4 translocated infant leukemia.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：乳児白血病 リンパ性白血病 MLL-AF4 臍帯血 シングルセルRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

生後1年未満の乳児に発症する白血病を乳児白血病と言う。一般的に乳児白血病の予後は不良で、病態生理の解明と新たな治療方法の開発が求められている。乳児白血病の約60-70%は急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL)、約20-30%は急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia: AML) として発症し、どちらの病型であっても MLL (KMT2A) 遺伝子の再編成を伴うことが多い。特に、MLL-AF4 転座を有する B リンパ性白血病は、乳児白血病の中で最も頻度が高く、かつ予後が悪いことから臨床上の大きな問題になっている。MLL-AF4 転座型乳児白血病には、ホメオボックス転写因子 HOXA9 の発現が高い HOXA9 型と、IRX1 の発現が高い IRX1 型の2タイプあり、HOXA9 型は年長児および成人にも認められるのに対し、IRX1 型は乳児白血病特異的であり、予後不良、治療抵抗性と強く関連している。申請者は最近、ヒト臍帯血 CD34+細胞に MLL-AF4 を導入して免疫不全マウスに移植するという手法を用いて、“HOXA9 型”と“IRX1 型”の MLL-AF4 白血病モデルを作製することに成功した。そこで本研究では、この乳児白血病モデルを活用して single cell RNA-Sequence (scRNA-Seq) 解析を行い、両者の相違点を検証した。

MLL-AF4 転座はリンパ性白血病で特異的に認められる転座であるが、乳児 AML では MLL-AF9 など他の MLL 転座が高頻度に認められ、予後も悪い。また、予後は比較的良好であるが、RUNX1-ETO 転座も乳児 AML で良く認められる。さらに乳児白血病としては稀ではあるが、治療後の再発例などでは TP53 変異を持つ白血病や赤血球系 (赤芽球) の細胞が異常に増殖する赤白血病を発症することもある。そこで本研究では、これらの白血病モデルの作製および病態解析も行った。

2. 研究の目的

ヒト臍帯血細胞もしくはマウス骨髄細胞に白血病原因遺伝子 (MLL-AF4, MLL-AF9, RUNX1-ETO, ERG) を導入し、様々な白血病モデルを作製する。また、これらの白血病モデルを活用して病態解析および治療標的の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびマウス白血病モデルの作製

ヒト臍帯血中の CD34+細胞およびマウス (野生型もしくは Trp53^{-/-}-Cas9+マウス) 骨髄中の c-Kit+細胞を MACS beads を用いてソートし、サイトカインを添加 (SCF, TPO, FLT3 各 50 ng/ml) した StemSpan 培養液中で 18 時間 pre-culture した。一方、レトロウイルスベクターに挿入した白血病遺伝子の cDNA を 293T 細胞 (ヒト細胞感染用) もしくは Plat-E 細胞 (マウス細胞感染用) に、必要に応じて M57 及び RD114 プラスミドと共に transfection し、レトロウイルスを作製した。MLL-AF4 ウイルスをヒト臍帯血 CD34+細胞に、MLL-AF9 と RUNX1-ETO を野生型マウス骨髄細胞に、ERG を Trp53^{-/-}-Cas9+骨髄細胞にレトロネクチンを用いて導入した。MLL-AF4 導入ヒト CD34+細胞を 200cGy の放射線照射をした免疫不全 NSG マウスに、その他の細胞は 525cGy の放射線照射をした野生型マウスに移植した。定期的な採血で白血病発症の有無を調べ、発症したマウスの骨髄および脾臓から白血病細胞を採取し、以下の実験に使用した。

(2) scRNA-seq 解析

MLL-AF4 白血病細胞を骨髄から分離し、FACS AriaIII を用いてシングルセルをソートした。10X genomics 社のプラットフォームを用いて各 well にて RNA を抽出後 cDNA を合成し、増幅後ライブラリを作製した。最後に illumina シークエンサーを用いてシークエンシング後、各細胞の遺伝子発現プロファイルを生成した。

(3) CRISPR/Cas9 システムによるノックアウト解析

標的遺伝子のターゲット配列を pLentiguide-puro ベクターもしくは pLK05.sgRNA.EFS.tRFP657 ベクターに組み込み、PCMV-VSV-G および psPAX2 と共に 293T に transfection してレンチウイルスを作製した。これを白血病細胞に導入し、標的遺伝子をノックアウトした。

4. 研究成果

(1) HOXA9 型および IRX1 型 MLL-AF4 白血病モデルの作製と scRNA-seq 解析

MLL-AF4 導入ヒト臍帯血 CD34+細胞を免疫不全 NSG マウスに移植したところ、2-3 ヶ月程度でヒトリンパ性白血病を発症した。半定量 PCR 法で IRX1 および HOXA9 の発現を調べたところ、興味深いことに、多くの白血病細胞で両方の発現が検出された。臨床的には IRX1 タイプと HOXA9 タイプの白血病は排他的であるため、この結果は、MLL-AF4 をヒト造血幹前駆細胞に導入することにより、IRX1 と HOXA9 の両方のタイプが形成されたと考えられた。次に、この MLL-AF4 白血病を用いて scRNA-seq を行った。その結果、IRX1 と HOXA9 の発現は排他的であり、やはり 2 種類の白血病ができていたことが確認できた (Fig.1)。また、IRX1 高発現細胞と HOXA9 高発現細胞の遺伝子発現パターンを比較したところ、IRX1 型では幹細胞関連遺伝子の発現が上昇しており、IRX1 型乳児白血病の発症起源が未分化な幹細胞であることが示唆された。この成果は、今後 MLL-AF4 転座を有する乳児白血病に対する治療戦略を構築する上で、基盤となる成果である。

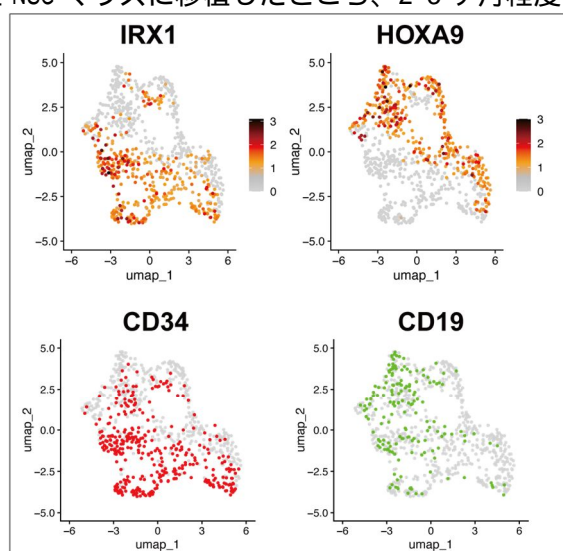


Fig.1. MLL-AF4 白血病細胞を用いた scRNA-Seq 解析

MLL-AF4 をヒト臍帯血 CD34+細胞に導入して作製したヒトリンパ性白血病細胞を用いて scRNA-seq 解析を行った。IRX1 高発現細胞と HOXA9 高発現細胞は排他的であり、IRX1 型と HOXA9 型の 2 種類の白血病が混在していることが判明した。IRX1 型では幹細胞マーカー CD34 が、HOXA9 型では B 細胞マーカー CD19 の発現が高い傾向があった。

(2) MLL-AF9-AML、RUNX1-ETO-AML、Trp53^{-/-}ERG-赤白血病モデルの作製と病態解析

MLL-AF9 導入マウス骨髄細胞をレシピエントマウスに移植することにより、MLL-AF9-AML 細胞を作製した。また、野生型および Trp53 ノックアウトマウスから採取した骨髄細胞に RUNX1-ETO を導入してレシピエントマウスに移植し、RUNX1-ETO-AML 細胞を作製した。さらに、Trp53^{-/-}Cas9+マウスから採取した骨髄細胞に ERG を導入してレシピエントマウスに移植し、赤白血病細胞を作製した。これらの細胞を用いて病態解析を行い、MLL-AF9-AML 細胞の治療標的として SETDB1、また赤白血病細胞の治療標的として HDAC7 を同定した。また、MLL-AF9-AML の発症が、特に NK 細胞によって抑制されていることを見出した。さらに、白血病治療薬 Decitabine の作用機序について解析し、よく知られている DNA メチル化阻害作用だけでなく、細胞の正常な有糸分裂を阻害する作用を持つことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Zhang Wenyu, Li Jingmei, Yamamoto Keita, Goyama Susumu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Modeling and therapeutic targeting of t(8;21) AML with/without TP53 deficiency	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of 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） 10.1007/s12185-024-03783-3	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 Sugimoto E, Li J, Hayashi Y, Iida K, Asada S, Fukushima T, Tamura M, Shikata S, Zhang W, Yamamoto K, Kawabata KC, Kawase T, Saito T, Yoshida T, Yamazaki S, Kaito Y, Imai Y, Denda T, Ota Y, Fukuyama T, Tanaka Y, Enomoto Y, Kitamura T, Goyama S	4. 巻 6
2. 論文標題 Hyperactive Natural Killer cells in Rag2 knockout mice inhibit the development of acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05606-3	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 Yabushita T, Chinen T, Nishiyama A, Asada S, Shimura R, Isobe T, Yamamoto K, Sato N, Enomoto Y, Tanaka Y, Fukuyama T, Satoh H, Kato K, Saitoh K, Ishikawa T, Soga T, Nannya Y, Fukagawa T, Nakanishi M, Kitagawa D, Kitamura T, Goyama S	4. 巻 42
2. 論文標題 Mitotic perturbation is a key mechanism of action of decitabine in myeloid tumor treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113098 ~ 113098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.113098	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 合山進	4. 巻 38
2. 論文標題 加齢とクローン性造血	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioClinica	6. 最初と最後の頁 378-382
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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Chang YH, Fujino T, Yamamoto K, Enomoto Y, Kitamura T, Goyama S.
2. 発表標題 SETDB1 suppresses interferon responses and NK cell-mediated immunosurveillance in monocytic AML
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zheng W, Yamamoto K, Chang YH, Yabushita T, Kitamura T, Goyama S.
2. 発表標題 HDAC7 is a potential therapeutic target in acute erythroid leukemia.
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sato N, Goyama S, Kitamura T.
2. 発表標題 Mutant ASXL1 promotes atherosclerosis development in mice via accelerated myeloid cell proliferation and dysregulation of innate immune pathway
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu-Hsuan Chang, Takeshi Fujino, Keita Yamamoto, Yutaka Enomoto, Toshio Kitamura, Susumu Goyama.
2. 発表標題 SETDB1 suppresses interferon responses and NK cell-mediated immunosurveillance in monocytic AML.
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 ASXL1-CHIP は万病の元
3. 学会等名 第6回腫瘍循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu Hsuan Chang, Takeshi Fujino, Keita Yamamoto, Yutaka Enomoto, Toshio Kitamura, Susumu Goyama
2. 発表標題 SETDB1 suppresses interferon responses and NK cell-mediated immunosurveillance in monocytic AML
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jingmei Li, Emi Sugimoto, Keita Yamamoto, Toshio Kitamura, Susumu Goyama.
2. 発表標題 Dual targeting of mTOR and p53 shows potent activity against aggressive acute myeloid leukemia.
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wenyu Zhang, Keita Yamamoto, Yu Hsuan Chang, Tomohiro Yabushita, Yangying Hao, Jakushin Nakahara, Toshio Kitamura, Susumu Goyama.
2. 発表標題 HDAC7 is a potential therapeutic target in acute erythroid leukemia.
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Goyama S
2. 発表標題 Targeting TP53 for acute myeloid leukemia and its relation to tumor immunity.
3. 学会等名 10th International MDM2 Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 AMLゲノム解析全盛時代にあえてFAB分類の重要性を訴える
3. 学会等名 第15回茨城造血器腫瘍セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chang YH, Fujino T, Yamamoto K, Enomoto Y, Kitamura T, Goyama S.
2. 発表標題 SETDB1 Suppresses Interferon Responses and NK Cell-Mediated Immunosurveillance Specifically in Monocytic AML.
3. 学会等名 65th Annual meeting of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Goyama S
2. 発表標題 SETDB1 as a therapeutic target in monocytic AML
3. 学会等名 Scientific Workshops on Myeloid Development (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 CRISPR-Cas: Biology and its application to Blood Research
3. 学会等名 熊本大学医学・生命科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 NK細胞の役割とDecitabineの作用機序を考える
3. 学会等名 第82回佐賀ブルーアートイベント（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wenyu Zhang, Goyama S
2. 発表標題 HDAC7 is a potential therapeutic target in AEL
3. 学会等名 若手国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 志村瑠香、田村萌、山本圭太、北村俊雄、合山進
2. 発表標題 カルシウム制御因子Atp2a2は骨髄系腫瘍においてin vivo特異的に増殖を抑制する
3. 学会等名 第28回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 張文字、山本圭太、張育せん、藪下知宏、北村俊雄、合山進
2. 発表標題 HDAC7 is a potential therapeutic target in Acute Erythroid Leukemia
3. 学会等名 第28回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yu-Hsuan Chang, Takeshi Fujino, Toshio Kitamura, Susumu Goyama
2. 発表標題 Identification of tumor regulators in myeloid neoplasms using in vivo CRISPR- Cas9 screening
3. 学会等名 第27回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田孝平、山本圭太、浅田修平、北村俊雄、合山進
2. 発表標題 MECOM 症候群で認められる変異は、MECOM の転写活性化能及び造腫瘍性を喪失させる
3. 学会等名 第27回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 白血病幹細胞と腫瘍免疫
3. 学会等名 第18回がん分子標的治療学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 健康長寿実現のために、CHIPとどう向き合うか？
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 合山進
2. 発表標題 白血病幹細胞と腫瘍免疫
3. 学会等名 第36回臨床血液セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 合山進	4. 発行年 2023年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 574
3. 書名 EBM血液疾患の治療2023-2024(CBF白血病の治療)	

〔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	高木 正稔 (Takagi Masatoshi) (10406267)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授 (12602)	

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