

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659462

研究課題名(和文)慢性リンパ性白血病モデルマウスを応用した原因遺伝子の探索

研究課題名(英文)Gene mutations in hematopoietic stem cells of chronic lymphocytic leukemia

研究代表者

宮本 敏浩 (MIYAMOTO, TOSHIHIRO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70343324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性リンパ球性白血病(CLL)は、代表的な成熟B細胞性腫瘍であり、腫瘍起源としては成熟B細胞であると考えられてきた。我々は、CLLの発症機構において造血幹細胞(HSCs)が腫瘍化プロセスの起点として重要な役割を担っている可能性を免疫不全マウスへの異種移植モデルを用いて提唱した。本研究ではCLL症例における症例特異的な遺伝子変異を同定し、その変異がHSCsレベルに獲得されているかを検討した。その結果、CLL細胞と同一の体細胞変異を有するHSCsが存在していることを見いだした。すなわち、遺伝子変異を有する異常なHSCsを起点として、CLLが多段階的に進展していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a mature B cell malignancy, which has been considered to originate from mature B cells. We reported that even in CLL, very primitive hematopoietic stem cells (HSCs) should be involved in the pathogenesis of CLL. In this study, we tried to identify the somatic mutations acquired in primary CLL cells, and test whether such somatic mutations could be detected within HSCs of the CLL patients. We found that some of the identical somatic mutations acquired in CLL cells could be traced back to CD34+ human hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) and myeloid cells of the CLL patients. These results collectively suggest that early mutations associated with CLL pathogenesis should be acquired and accumulated within the self-renewing HSCs in human, and these abnormal pre-leukemic HSCs play a significant role in the multi-step leukemia progression processes of CLL.

研究分野：血液内科学

キーワード：慢性リンパ性白血病 造血幹細胞 白血化機構

1. 研究開始当初の背景

慢性リンパ球性白血病(CLL)は、高齢者に好発し、加齢とともに有病率が増加する。CLLは、代表的な成熟B細胞性腫瘍であり、腫瘍起源としては基本的に成熟B細胞であると考えられてきた。申請者らは、先行研究において、CLL患者由来の造血幹細胞(HSCs)が免疫不全マウスへの異種移植実験において、CLLの前白血病状態(Monoclonal B cell lymphocytosis; MBL)と考えられる異常な oligoclonal な成熟B細胞集団を再構築することを見だし、CLLの発症機構として、HSCsレベルで何らかの異常が獲得されており、その異常を背景に多段階的にCLLが発症するという新しいCLL発症モデルを提唱した(Kikushige et al., Cancer Cell, 2011)。我々の報告に引き続き、従来成熟リンパ球性腫瘍と考えられていたT細胞リンパ腫の一部あるいは、Hairy cell leukemiaにおいても、同様にHSCsレベルで獲得、蓄積された遺伝子異常を背景に多段階的にリンパ腫が進展することが明らかになってきている。

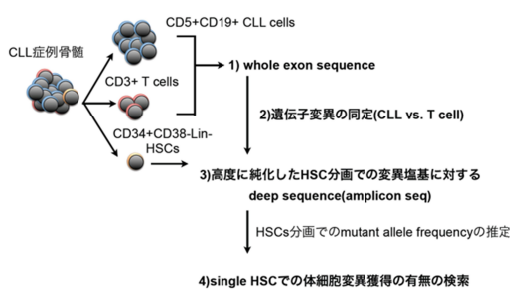
2. 研究の目的

先行研究で我々の提唱したHSCsレベルからの多段階のCLL進展モデルを遺伝子変異解析により検証するべく、本研究を遂行した。具体的には、症例特異的な体細胞変異を同定し、同定された体細胞変異群がHSCsレベルに獲得、蓄積されているかを検討した。

3. 研究の方法

図1に実験方法の概略を示す。

図1 実験計画



CLL患者よりCD5+CD19+CLL細胞および、CD3+ T細胞をFACSにより純化し、T細胞をレファレンスとして次世代シーケンサーによる全エキソンシーケンスを行い、症例特異的な体細胞変異を同定する。全エキソンシーケンスにより同定した体細胞変異のうち、mutant allele frequencyの高いものに関して変異特異的なPCR primerを設計した。FACSによりCD34+CD38- HSCs分画を純化しgDNAを抽出し、設計した変異特異的PCR primerを用いてPCR反応を行い、次世代シーケンサーによるamplicon sequenceを行い、HSCs

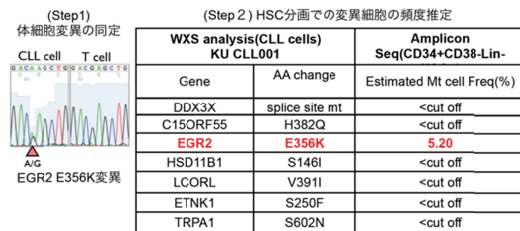
における体細胞変異の頻度を測定した。さらに、CLL症例HSCのsingle cell sortingによりコロニーアッセイを行った。14日後にsingle HSC由来の骨髄系コロニーをピックアップし、上記変異特異的PCR primerを用いて変異を有するコロニーの頻度を直接的に計測した。

4. 研究成果

1) 症例特異的な体細胞変異の同定

図2に代表的な解析結果を提示する。

図2



CLL症例(KU CLL001)骨髄よりFACSにより、T細胞、CLL細胞を純化し全エキソンシーケンスによりT細胞をレファレンスとしてCLL細胞に獲得されている体細胞変異を同定した。本症例で、mutant allele frequencyの高い変異遺伝子群を図2に示す。これらの変異を検出するPCR primerを作成し、FACSにより純化したCD34+CD38-HSCsより抽出したgDNAを用いてPCRを行った。PCR productを次世代シーケンサーによりdeep sequenceを行い、HSCsレベルで獲得されている遺伝子変異の検索を行った。図2に示すように本症例では、EGR2 E356K変異がHSCs分画において約5%程度の頻度で存在している可能性が示唆された。

2) single HSCsにおける体細胞変異の検索

上述の手法により、HSCsレベルで獲得されている体細胞変異および、変異を有する細胞の頻度を推定することが可能となった。さらに、我々は遺伝子変異を有する造血幹細胞、前駆細胞群の頻度を直接的に評価するためにsingle cellレベルでの解析を行った。別の症例(KU CLL002)の解析結果を表1に示す。本症例では、表1に示す遺伝子変異が高い

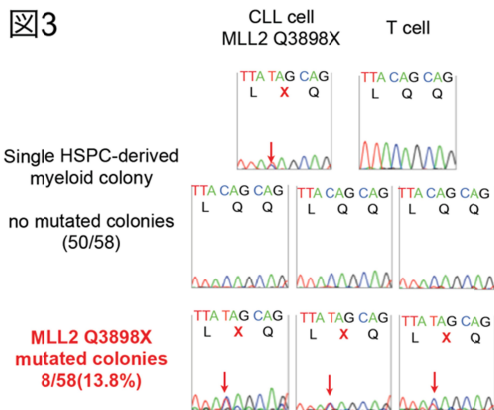
表1

KU CLL002		deep sequence of PCR products			Single cell-derived colony pick-up
WXS analysis		(CD19+)	(CD3+)	(CD34+CD19-)	CD34+CD19- derived colonies
Gene	AA change	Mt alle freq	Mt alle freq	Mt alle freq	Mutation positive colonies/analyzed
ELOVL4	F145C	0.55	-	-	0/61
MLL2	Q3898X	0.53	-	0.091	8/58(13.8%)
PTPN14	R743H	0.50	-	-	NA
UBXN10	R45Q	0.47	-	-	0/60
TRAM1L1	T306M	0.46	-	0.051	0/67
ZFH4	L27R	0.44	-	0.07	0/64
FBXW7	R465C	0.44	-	-	0/66
TCF20	S640N	0.44	-	-	NA

mutant allele frequencyでCLL細胞に検出

された。PCR product の deep sequence からは、MLL2, TRAM1L1, ZFX4 の 3 つの変異が CD34+CD19- 造血幹細胞、前駆細胞分画に cut off value(mutant allele frequency>0.04) 以上の頻度で検出された。そこで single cell レベルでの変異陽性造血幹細胞、前駆細胞の存在を確認するために、CLL002 症例より CD34+CD19- 造血幹細胞、前駆細胞群を FACS により、メチルセルロース上に single cell sorting を行い、14 日後に single cell 由来の骨髓系コロニーをピックアップして gDNA を抽出し、変異特異的 PCR primer を用いて変異陽性コロニーの存在を評価した。図 3 に結果を示す

表 2 に示すように PCR product の deep



sequence(amplicon sequence) 結果から、CD34+CD19- 造血幹細胞、前駆細胞分画には mutant allele frequency で約 9%、変異陽性細胞として約 18%の頻度で異常造血幹細胞、前駆細胞の存在が推定された。コロニーアッセイの結果からは 58 個の骨髓系コロニーのうち 8 コロニー(13.8%)に CLL 細胞と同一の MLL2 変異が同定され、amplicon sequence で予想された頻度と矛盾しない結果であった。さらに重要なことは、骨髓系コロニーを形成する能力を有する多系統への分化能力を有する未分化な造血幹細胞、前駆細胞レベルですでに MLL2 変異が存在しているという機能的な面からの証明がこの結果からなされた。MLL2 遺伝子変異は、成熟 B 細胞性腫瘍で CLL のみならず、follicular lymphoma 等で非常に高頻度かつ高い allele frequency で検出される遺伝子変異であり、成熟 B 細胞性腫瘍における driver mutation として注目されている遺伝子変異である。このような driver mutation が、骨髓系細胞への分化能を有する未分化な造血幹細胞、前駆細胞レベルで既に獲得されていることは、我々の提唱する成熟 B 細胞性腫瘍の多段階発症モデルに合致する所見と考えられた。現在では、複数の CLL 症例において、このような複数の体細胞変異が、造血幹細胞あるいは、B 細胞以外の骨髓系細胞にも検出されることを確認しており、解析を継続している。

3)CLL における造血幹細胞レベルからの多段

随発症モデル

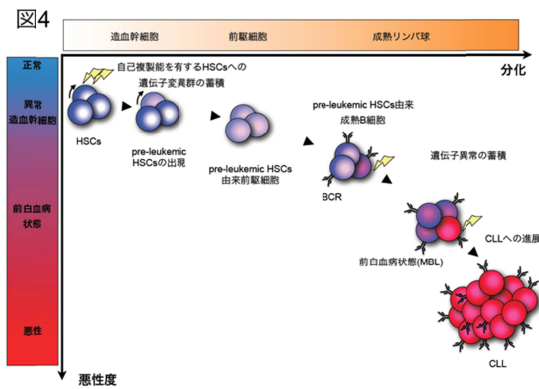


図 4 に CLL における HSCs レベルからの多段階発症、進展モデルを示す。加齢とともに CLL およびその前白血球状態である MBL の頻度は直線的に増加する。本研究結果からは、我々の提唱する上記モデルにおいて、このような加齢に伴う HSCs レベルでの体細胞変異の蓄積が、CLL 発症にとって一つの重要な役割を担っていることを示している。本研究では、CLL と同一の体細胞変異が、非常に未分化な造血幹細胞、前駆細胞分画に獲得されており、その異常 HSCs を起点として CLL が多段階の step を経て進展していることを示した。

今後は、解析症例数を増加させるとともに、このような genetic な変化を有する異常な HSCs がどのような in vivo でどのような挙動を示すのかを xenograft model を用いて解析する予定である。さらには、genetic な異常以外の epigenetic な変化が、HSCs レベルで生じている可能性についても今後検討を進めていく。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K. The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp Hematol* 42, 955-65, 2014.
2. Kikushige Y, Miyamoto T. Hematopoietic stem cell aging and chronic lymphocytic leukemia pathogenesis. *Int J Hematol* 100, 335-40, 2014.
3. Kikushige Y, Miyamoto T. TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous

- leukemia stem cells. *Int J Hematol* 98, 627-33, 2013.
4. Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Okamura T, Ohtsuka E, Yoshida T, Higuchi M, Yoshimoto G, Fujisaki T, Abe Y, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K, Harada M. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study). *J Hematol Oncol* 6, 14, 2013.
 5. Miyamoto T, Yoshimoto G, Kamimura T, Muta T, Takashima S, Ito Y, Shiratsuchi M, Choi I, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Takamatsu Y, Teshima T, Akashi K. Combination of high-dose melphalan and bortezomib as conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Int J Hematol* 98, 337-345, 2013.
 6. Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120, 4058-67, 2012.
 7. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121, 840-8, 2013.
 8. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121, 1316-25, 2013.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 宮本敏浩

骨髄増殖性腫瘍の治療

第 76 回日本血液学会総会(2014)

2. 宮本敏浩
造血器腫瘍における治療選択と臨床検査
～急性骨髄性白血病～
第 61 回日本臨床検査医学会(2014)
3. 宮本敏浩
高齢者造血器腫瘍に対する最新の治療
第 56 回日本老年医学学会 (2014)
4. 宮本敏浩
AML stem cells
第 75 回日本血液学会総会(2013)

〔図書〕(計 2 件)

1. 菊繁吉謙、宮本敏浩、赤司浩一
慢性リンパ球性白血病(CLL)の発症機構.*Annual Review 血液* 2013 (高久史磨ら監修), 中外医学社 (東京) p143-151, 2013
2. 菊繁吉謙、宮本敏浩、赤司浩一
TIM-3: 新しい白血病幹細胞マーカーの発見.*Annual Review 血液* 2012(高久史磨ら監修), 中外医学社 (東京) p22-30, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮本敏浩 (MIYAMOTO, Toshihiro)

九州大学病院・血液腫瘍内科・講師

研究者番号 : 70343324