

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461398

研究課題名(和文) Smad3ノックアウトマウスを用いた骨髄線維症発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of myelofibrosis with Smad3 knock out mice

研究代表者

武内 正博 (TAKEUCHI, Masahiro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50466702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄線維症のマウスモデルであるTEL-Lyn融合遺伝子を用いた解析をSmad3ノックアウトマウスを用いて行う事を目的として研究を行った。TEL-Lyn融合遺伝子を発現させるレトロウイルスをPEI (Polyethylenimine) 法を用いて作成し、効率よく作成できる事を確認した。その後、各種白血病細胞にTEL-Lyn融合遺伝子を強制発現させることに成功したが、骨髄線維症発症に重要なTGF- $\beta$ の発現亢進が認められなかったため、巨核球系の細胞株を用いて解析を行った。今後シグナル解析などを行ったうえでSmad3ノックアウトマウスを用いた実験を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of myelofibrosis with TEL-Lyn fusion gene and Smad3 knockout mouse. In vitro study using leukemia cell line and TEL-Lyn fusion gene failed to show overexpression of TGF- $\beta$ . We are planning TGF- $\beta$  expression analysis with iPS cell derived megakaryocyte.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄線維症 TGF

### 1. 研究開始当初の背景

近年、真性多血症 (PV) や本態性血小板血症 (ET) や骨髄線維症 (MF) といった慢性骨髄増殖性疾患の発症に JAK2 遺伝子の変異が関与することが明らかになった。しかし PV では 95% の症例で JAK2 変異を認める一方で、MF においては JAK2 変異の関与する症例は 50% 未満であることから、MF の発症には TET2 などの JAK2 の下流のシグナル以外にも重要な要素が存在する可能性が考えられる。

ここで、骨髄線維症の治療としてアメリカでは JAK2 阻害薬による治療が臨床応用されるようになってきているが生存期間の延長効果が示されつつあるものの、根治療法は造血幹細胞移植以外になく、高齢者に発症する事が多い MF の場合、移植適応にならない症例が多いことからより詳細な発症メカニズムの解明および新規治療法の開発が求められている。

一方、骨髄線維症を発症するには骨髄巨核球より TGF $\beta$  が過剰に産生され、それが骨髄の間葉系細胞に作用して線維化が起こることが示されつつあるが、TGF $\beta$  の下流分子のうち Smad3 分子は連携研究者である横手らによりノックアウトマウスが作成され、血液以外の分野において Smad3 が TGF $\beta$  による線維化に重要であることが示されてきた。

我々は原発性骨髄線維症患者から新たに TEL-Lyn 融合遺伝子を同定した (Tanaka, Takeuchi 他 Leukemia 2010)。TEL-Lyn 融合遺伝子をレトロウイルスを用いてマウス造血幹細胞に導入し移植すると、20 日程度の短期間に著明な骨髄線維症を来とし、MPN を発症して死亡したが、STAT5 欠損マウスではその効果は認めなかった。

これまでに我々が同定した TEL-Lyn 以外にも連携研究者である岩間らが報告した Bmi1 ノックアウトマウスによる骨髄線維症モデルや JAK2 V617F 変異、TEL-JAK2 や GATA1 low マウス (2013 年 Blood)、TEL-Syk (2013 年 Plos One) による骨髄線維症モデルが報告されているが、TEL-Syk によるモデルを除き、骨髄線維症の発症までに数ヶ月~1 年程度必要であることから、1 ヶ月弱で高度の骨髄線維化を発症し死亡するという我々が確立した TEL-Lyn マウスモデルは非常に強力であり発症機構を解明するためにきわめて有利と考えられる。

一方逆説的に、高度の線維化が起こるために骨髄や脾臓からの細胞回収が困難であり、線維化にどのような分子が関与しているのかを解明する事が困難であったが、これまでの研究から TGF $\beta$  による線維化が抑制される事が予測される Smad3 ノックアウトマウスを用いることで TGF $\beta$  を過剰発現している骨髄巨核球などを回収することが可能になると予測される。

ここで Smad3 ノックアウトマウスは連携研究者である本学の横手らが樹立した系統

であり、非常に強力な骨髄線維症発症モデルである TEL-Lyn と Smad3 ノックアウトマウスを組み合わせる事は他施設では困難と考えられ、きわめて独創的であり骨髄線維症発症機構の解明に有益と考えられる。

さらに、骨髄増殖性疾患においても DNA 脱メチル化に関与している TET2 遺伝子変異などのエピジェネティクスを制御する遺伝子の変異が一定の割合で認められ、JAK2 V617F 変異のある細胞のうち TET2 遺伝子変異を伴う細胞の方が増殖能力が高いことなどが明らかとなってきているが、連携研究者である岩間らは Bmi1 ノックアウトマウスによる骨髄線維症モデルや Tet2 遺伝子の低発現マウスを用いた MDS/MPN の研究を既に報告しており、造血幹細胞およびエピジェネティクスに関する解析を得意としている。骨髄線維症のメカニズムとエピジェネティクスに関する研究はまだほとんど行われておらず、Tet2 遺伝子の低発現マウスや Bmi1 ノックアウトマウス由来の造血幹細胞を直接もしくは TEL-Lyn 遺伝子を導入し、Smad3 ノックアウトマウスに移植し、ヒストンや DNA のメチル化などの解析を行う事ができれば骨髄線維症とエピジェネティクスに関する新たな知見が得られるものと考えられる。

ここで、骨髄線維症の発症機構を解明するためには移植後の骨髄巨核球や造血幹細胞においてどのような分子が活性化しているのか、抑制されているのか、あるいは TGF $\beta$  の下流シグナルを明らかにすることが必要と考えられるが、通常の骨髄移植モデルでは骨髄の線維化が高度となるために十分な細胞を回収できず十分な解析が困難であった。そこで Smad3 ノックアウトマウスを移植のレシピエントとして用いることで TGF $\beta$  下流シグナルとしての Smad3 の重要性をまず確認し、骨髄の線維化が減弱する場合には骨髄から各種細胞を回収し、その解析を行う事によって骨髄線維症発症機構の一端を明らかにし、その結果を治療に応用することを目指す。

### 2. 研究の目的

我々は新規に TEL-Lyn 融合遺伝子を単離し骨髄線維症マウスモデルを確立させたが、線維化のため骨髄細胞の回収・解析が困難であった。そこで TGF $\beta$  の下流シグナルである SMAD3 ノックアウトマウスを用いて TEL-Lyn などによる骨髄線維症の発症機構を明らかとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

連携研究者である横手らにより、TGF $\beta$  のシグナル伝達に関わる主要分子のノックアウトマウスとして唯一成熟個体を得ることができる C57BL/6 系統の Smad3 ノックアウトマウスはすでに作成されている。このマウスはホモ接合体では胎生致死であるため、ヘテロ

接合体マウスを骨髄移植のレシピエントマウスとして使用する。

ドナー由来細胞とレシピエント由来の造血細胞を区別するために、ドナーとしては C57BL/6 Ly5.1 マウスを用い、セルソーター (BD 社 Aria もしくはペイバイオサイエンス社 JSAN) にて骨髄中の造血幹細胞 (CD34-KSL 分画) をソートし、レトロウイルスを用いて TEL-Lyn (研究代表者が作成) や TEL-JAK2 (骨髄線維化を発症)、TEL-PDGF $\alpha$ R、BCR-ABL (この 2 種は骨髄増殖性疾患を発症するが線維化なし) 遺伝子を導入し、放射線照射後の Smad3 ヘテロノックアウトマウスに移植を行う。その後、生存期間や骨髄線維化の状態を評価する。また、Tet2 遺伝子の低発現マウス由来の造血幹細胞に TEL-Lyn 遺伝子などを導入し移植することで骨髄線維化の発症期間や表現型に変化が起きるか評価する。

前段階の研究として、TEL-Lyn 融合遺伝子によって起こるシグナルの変化を各種細胞株を用いて検討し、特に TGF- $\beta$  の発現上昇を認める細胞株を探し出し、詳細に検討する。

#### 4. 研究成果

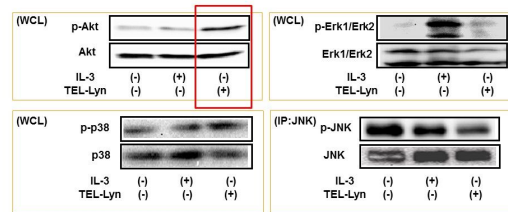
TEL-Lyn 融合遺伝子による骨髄線維化マウスモデルの再構築を行うためにクローニングベクターに載っている TEL-Lyn 融合遺伝子を切り出してレトロウイルスベクターへの載せ替えを行った。

これらのレトロウイルスベクターを、293gp 細胞に PEI (Polyethylenimine) 法でトランスフェクションし、レトロウイルスを作成し、良好なウイルス力価が得られる事を確認した。PEI 法によるトランスフェクションは従来行っていたリン酸カルシウム法に比べると効率が良く、一方でリポフェクション試薬に比べるとやや効率は落ちるが試薬にかかる費用が圧倒的に安いので、以後は PEI 法によるトランスフェクションを行う事とした。

Smad3 ノックアウトマウスを用いた移植実験を行う上で、回収してきた骨髄細胞においてどのシグナルを解析すべきか、また、阻害薬などを用いた実験が行えないかを予測することを目的として、まず白血病細胞株において、TGF- $\beta$  の発現に関する経路の確認を行う事とした。PEI 法にて作成したレトロウイルスを用いて、各種白血病細胞株に TEL-Lyn 融合遺伝子を強制発現させる事に成功した。マウス Ba/F3 細胞株において、下流のシグナルの解析を行ったところ、STAT3, STAT5 および Akt のリン酸化を起こしている事が明らかとなった (図 1)。しかし、TGF- $\beta$  の発現をリアルタイム PCR 法にて測定したところ TEL-Lyn の有無に関わらず変化を認めておらず、その他の白血病細胞株を用いて追加解析を行った。その後測定を行った U937, K562, Jurkat のいずれにおいても有意な TGF- $\beta$  の発現亢進を認められなかったため (図 2) その

他の白血病細胞株も用いてみたが、現段階では適切な細胞株が見つからず、引き続き白血病細胞株における検討を行うのと同時に、骨髄線維症において重要な役割を果たしていると考えられているのが巨核球であることに注目し、iPS 細胞から作成した巨核球細胞株を用いて検討を行っている (図 3)。

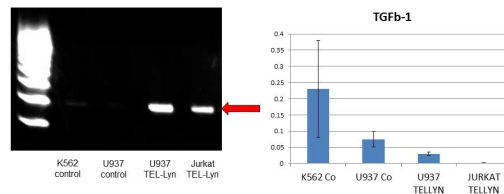
#### Analysis of downstream target of TEL-Lyn in Ba/F3 cells



TEL-Lyn induces constitutive phosphorylation of STAT3, STAT5 and Akt

(図 1: TEL-Lyn によるマウス白血病細胞株 Ba/F3 における下流シグナルの解析)

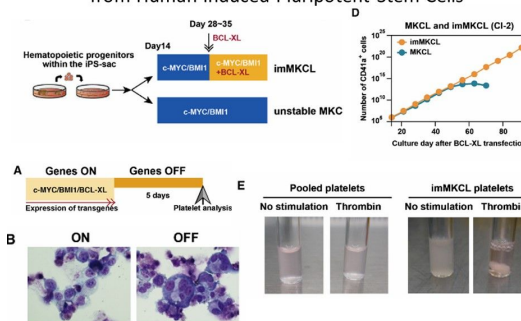
#### Re-construction of retroviral Tel-Lyn expression system



Cell origin: K562→CML, U937→AML (M5), Jurkat→T-ALL

(図 2 白血病細胞株における TEL-Lyn 融合遺伝子による TGF- $\beta$  発現の変化)

#### Expandable Megakaryocyte Cell Lines from Human Induced Pluripotent Stem Cells



Nakamura S. et al. Cell Stem Cell 14, 535-48, 2014

(図 3: iPS 細胞から作成された巨核球細胞株の機能解析)

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

武内正博, 中世古知昭. 第3章 診断 「その他の骨髄増殖性腫瘍の診断」. 診断と治療のABC 113 慢性骨髄性白血病・骨髄増殖性腫瘍, 企画: 木村文彦, 最新医学社, 大阪, 223 ページ (p85-91), 2016 (単行本)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武内 正博 (TAKEUCHI, Masahiro)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50466702

### (2) 研究分担者

中世古 知昭 (NAKASEKO, Chiaki)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 30323398

大和田 千桂子 (OHWADA, Chikako)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80436352

### (3) 連携研究者

横手 幸太郎 (YOKOTE, Koutaro )  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20312944

岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi )  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 70244126

### (4) 研究協力者

該当なし ( )