

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860721

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍幹細胞のin vivo追跡と新規分子標的の同定

研究課題名(英文) In vivo stem cell tracking of myeloproliferative disease and identification of novel molecular targets

研究代表者

佐藤 智彦 (SATO, TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：90553694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Evi1-GFPレポーターKras変異マウスにCMMLを発症させたがGFP陽性(Evi1陽性)細胞が検出されなかった。

ASXL1変異ノックインマウスは、生後1年8か月経過後も白血病や骨髄異形成症候群は発症せず。成体ASXL1変異ヘテロ(KI/+)マウス骨髄細胞では骨髄球系分化への偏りを示した。幹/前駆細胞分画がKI/+で少なく、造血コロニー形成能はKI/+で2.3倍高く、5代まで連続継代可能。骨髄再構築能は、移植後8か月でKI/+と+/+で同等。レトロウイルスによるCMLモデルではKI/+と+/+で生存期間に有意差なく、IDH1変異導入ではKI/+群のみ約10か月で白血病発症を認めた。

研究成果の概要(英文)：In CMML-developed Evi1-GFP;Kras-mutant mice, no GFP(Evi1)-positive leukemia cells were detected.

Even after 20-month observation, Evi1-GFP;ASXL-mutant knock-in mice looked healthy with no apparent signs of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. ASXL-mutant knock-in BM cells showed a skewed differentiation to myeloid lineage. ASXL-mutant knock-in BM cells had 2.3-times higher hematopoietic colony formation capacity and higher replating capacity up to five times. These cells had a similar BM reconstituting capacity to wild type BM cells (eight-month observation). Retroviral CML induction to ASXL-mutant knock-in BM cells showed no acceleration of CML development, but recipients with IDH1-mutant transduced ASXL-mutant knock-in BM cells had leukemia development with 10-month duration while ASXL-wild counterparts showed no leukemia so far.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：白血病幹細胞 白血病モデルマウス 造血幹細胞 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞および白血病幹細胞の純化にはヒト、マウスともに多数の表面マーカーが必要で、白血病幹細胞を生体内でリアルタイムに追跡することが困難であった。少ないマーカーにより個体で白血病幹細胞を可視化することは今後の幹細胞研究に必須かつ重要なポイントである。幹細胞性を特徴とした遺伝子(stemness gene)はいくつも知られるが、造血幹細胞にのみ高発現する遺伝子はほとんどなく、多くは分化血球でも発現する。難治性白血病関連転写因子 Ecotropic viral integration site-1(Evi1)は造血幹細胞のみに高発現する特異な因子である。臨床的に急性骨髄性白血病(AML)・急性転化型慢性骨髄性白血病(CML-BC)・二次性骨髄性白血病などで高発現し、骨髄性造血器腫瘍の予後不良因子である。正常造血では Evi1 は造血幹細胞特異的に高発現し、幹細胞制御の必須因子である(Cell Stem Cell 2008)。Evi1 は stemness gene として、白血病幹細胞の存立にも密接に関わり、Evi1 高発現細胞の増加が予後不良なヒト白血病を規定すると推測される。

申請者は、Evi1 の GFP レポーターマウスを作製し、GFP(Evi1)陽性細胞のみが自己複製能を有する造血幹細胞をマークすることを示した。(Journal of Experimental Medicine 2011) このマウスは「世界初の造血幹細胞レポーターマウス」として非常に利用価値が高い。加えて、単マーカーで in vivo 追跡ができ、前方視的に分離可能な点は既存のマウスモデルにはない最大の特徴であり利点である。次に申請者は同マウスを用いて、慢性骨髄性白血病(CML)における幹細胞制御機構を解析した。BCR-ABL キメラタンパクによる幹細胞疾患 CML と、Evi1-GFP マウスを組み合わせると Evi1 レポーター-CML マウスを作製し、GFP(Evi1)陽性 CML 細胞は Lin-Sca1+c-Kit+(LSK)のマウス幹細胞表面マーカーを呈し、さらに Evi1 陰性 LSK より

も白血病原性が高いことを示した(Oncogene 2014)。また、ヒト CML 検体の単一細胞での発現解析により、幹細胞分画 CD34+CD38-CD90+細胞が CD34+CD38+細胞よりも Evi1 mRNA が高発現するデータと併せて、Evi1 は CML においても優れた幹細胞マーカーであることを明らかにした(投稿中)。正常 LSK と CML LSK において、Evi1 高発現群の遺伝子発現パターンは異なるが、Gene Ontology では似たパターンを呈し、正常と CML とで幹細胞に共通した機能群の存在が推測される。臨床的に予後不良の急性転化型 CML(CML-BC)でも Evi1 が高発現する。BCR-ABL と NUP98-HOXA9 共発現 CML-BC モデルマウスと Evi1-GFP マウスを組み合わせると、in vivo で Evi1 陽性細胞の明らかな増加を認めた。連続骨髄移植から Evi1 陽性 CML-BC 細胞のみに CML-BC 幹細胞が含まれることを示し、かつ BCR-ABL 阻害剤 Nilotinib 治療を加えた CML-BC 細胞でも Evi1 陽性細胞は白血病原性を示し、薬剤抵抗性も有することを明らかにした。in vivo で Evi1 陽性細胞の増加(発現上昇)を可視化した初のモデルで、Evi1 レポーターシステムが造血幹細胞・白血病幹細胞追跡システムとしての優れた有用性を強く示唆する。

2. 研究の目的

白血病幹細胞制御機構解明のために、既存の白血病モデルの詳細な解析と新規白血病モデルの導入を行う。従来の、白血病原因遺伝子を導入した骨髄の放射線照射マウスへの移植による白血病モデルは、放射線照射による骨髄環境への影響が大きいものに対して、トランスジェニックマウスによる白血病モデルは骨髄微小環境が保持される。CMML は、骨髄増殖型または骨髄異形成型の臨床病態及び複数の分子病態が混在した疾患であり、未解明な部分が多い。近年のゲノミクス解析により TET2, CBL, IDH1, JAK2, KRAS,

NPM, RUNX1, ASXL1, PTPN11 など種々の遺伝子異常が CMML の病態形成に関与することが明らかになり注目されている。TET2 変異は機能欠失型変異であり、IDH1 や JAK2、KRAS、RUNX1 などは機能獲得型変異である。ASXL1 変異は詳細な解析がまだ少なく、機能欠失型変異だとされるが未知の部分が多い。本研究では Evi1-GFP マウスをプラットフォームに骨髄増殖型 CMML で見られる Kras 変異及び ASXL1 変異ノックイン CMML モデルマウスでの幹細胞分画純化及び、白血病幹細胞マーカーとしての Evi1 の有用性を検討する。ヒト症例解析と合わせて新たな白血病幹細胞マーカーの同定を目的とする。

3. 研究の方法

CMML 幹細胞生成機構を解明するために、既存の優れた CMML モデルである Kras 変異ノックインマウスと、今回新規に作製した ASXL1 変異ノックインマウスをそれぞれ、幹細胞マーカーマウスである、Evi1-GFP ノックインマウスと組み合わせる。白血病マウスでの GFP の発現をマーカーに Evi1 の挙動を *in vivo* でトレースする。Evi1 発現の高低による白血病原性を *in vivo* で、増殖活性の高さや薬剤抵抗性を *in vitro* で検証するとともに、遺伝子発現パターン、メチル化パターンを統合して、白血病幹細胞(Evi1 高発現細胞)特異的マーカーの同定を行う。ヒト白血病症例において、白血病幹細胞が濃縮される CD34+CD38-細胞分画を純化し、マイクロアレイにて非幹細胞性白血病細胞や正常造血幹細胞と比較して、白血病幹細胞特異的に発現する遺伝子を同定する。

4. 研究成果

慢性骨髄単球性白血病(CMML)のモデルマウスとして、既存の Kras 変異、新規の ASXL1 変異ノックインマウスを本研究で用いた。ま

ずインターフェロン誘導性 Kras 変異ノックインマウスと Evi1-GFP ノックインマウス(造血幹細胞マーキングマウス)を交配し、Evi1-GFP レポーターKras 変異マウスを作製した。polyIpolyC による Kras 変異導入で CMML 発症を誘導したが、Evi1-GFP レポーターKras 変異 CMML マウス骨髄では GFP 陽性細胞が検出されなかった。KrasG12D 変異モデルマウスでは、白血病細胞の分化度が高い(造血幹細胞レベルからより分化している)ことが推測された。

次の CMML モデルとして、申請者のグループで新規に作製した ASXL1 変異ノックインマウスと Evi1-GFP ノックインマウスを交配し Evi1-GFP レポーターASXL1 変異マウスを作製した。ASXL1 遺伝子型はヒト白血病で見られる型を模してコンベンショナル ASXL11925dupG/+ マウス(KI/+マウス)と ASXL1+/+マウス(+/+マウス)の比較、観察を継続している。上記交配に先んじて ASXL1 変異マウスの白血病原性を解析するために、コンベンショナル KI/+マウスと+/+マウスを観察してきたが(最長で 84 週)、白血病発症には至っていない。そこで、Evi1-GFP レポーターASXL1 変異マウスの経過観察をしながら、コンベンショナル KI/+マウスの造血機能の解析を行った。なお、KI/+マウス同士の交配で ASXL11925dupG/1925dupG マウスはほとんどが胎生致死で(p=0.0001)、わずかに生じる仔体は体躯が明らかに小さく眼球も小さく、ヒト *de novo* ASXL 変異症例の先天疾患に類似していると考えられた。また、KI/+マウスは+/+マウスに比べて雌雄とも有意に低体重で、X 線上も長管骨の長径短縮を認めた。(関節異常は X 線上認めず)

約 12 週齢のマウス骨髄における血球分画の解析では、未分化細胞: LSK (Lin-Sca1+cKit+) 分画と LS-K (Lin-Sca1-cKit+; 前駆細胞)分画の細胞数が KI/+マウスで少なかった(p=0.023、

p=0.001)。LS-K の中では、CMP, MEP はいずれも KI/+マウスで少ない傾向があり(それぞれ p=0.08、 p=0.79)、GMP の割合は有意に高かった(p=0.02)。分化細胞では、骨髄中の Gr1+、Mac1+分画(Myeloid 系)の割合が KI/+マウスで有意に高く(p=0.0003)、その一方で B220+分画(Lymphoid 系)は+/+マウスで有意に割合が高かった(p=0.0009)。さらに、48-56 週齢(約1歳)のマウス末梢血ではKI/+マウスに白血球減少(p=0.03)、血小板増加(p=0.01)を認め、貧血は認められなかった。また、同週齢の骨髄では myeloid 系を中心に異型を伴う細胞が認められ、今後骨髄異型性症候群(MDS)様の進展を示す可能性が示唆された。さらに、12 週齢のマウス骨髄細胞の AnnexinV/DAPI 染色では、LSK 分画(11.5% vs 2.94%)や前駆細胞(CMP, GMP)(8.67% vs 2.14%, 11.2% vs 3.35%)で KI/+マウスにアポトーシスの亢進が確認された。

これらの結果から、KI/+マウスでは LSK 分画でアポトーシスが亢進する結果として LSK 細胞数の減少を認めており、myeloid 系統へ分化が偏ることと合わせて MDS 様の病態を呈していると考えられた。

KI/+マウス血球の機能解析として、in vitro コロニー形成能はKI/+マウス骨髄細胞で約 2.3 倍高く、かつ 5 代まで連続継代することができた(+/+マウス骨髄は 2-3 代まで)。in vivo での骨髄再構築能は、骨髄移植後 32 週の観察期間で両者ともほぼ同じキメリズムを示している。

上記に加えて、ASXL1 変異ノックインマウスに対して、他の遺伝子改変マウスとの交配もしくは、レトロウイルスによる oncogene の導入で白血病モデル作成を試みた。ASXL1 変異ノックインマウスと Kras 変異ノックインマウス、BCR-ABL トランスジェニックマウス、p53 ノックアウトマウスとの交配を行っており、ASXL1 変異ノックインマウス骨髄細胞にそれぞれ BCR-ABL、IDH1 変異、AML1-ETO

遺伝子を導入して骨髄移植している。ASXL1 KI/wt 細胞と wt/wt 細胞へのレトロウイルスによる BCR-ABL 導入では、両方とも骨髄移植後 3 週で慢性骨髄性白血病(CML)を発症し、死亡したため、生存に有意差は認めなかった。IDH1 変異導入では KI/+マウス血球のみ移植後 10 か月以降に AML を発症した。この AML は連続移植可能であった。

それ以外のモデルについては経過観察中である。また、ASXL1 分子が生化学的にヒストン修飾に関与することから、KI/wt 骨髄細胞と wt/wt 骨髄細胞でのヒストン修飾を確認したが、双方で H3K27me3、H3K9me3 そして H3K4me3 のいずれも変化を認めなかった。ASXL1 変異ノックインマウスの血球系の表現型解析と生化学的解析、他分子との協調による白血病モデルの解析を進めている状況であり、現在までは、ASXL1 変異による白血病発症機構、幹細胞への影響、そして明らかな分子機構を絞るところまでは到達していない。

今後、同マウス(ASXL1 変異ノックインマウス)の造血機能、白血病原性を解析しながら、本研究を通して白血病モデルとして確立した ASXL1 変異+IDH1 変異による白血病マウスの解析を進めていく。具体的には白血病幹細胞分画の同定、Evi1-GFP ノックインマウスとの交配による in vivo 追跡、Evi1 高発現/低発現細胞の骨髄移植である。それにより CMML 白血病幹細胞維持の鍵分子を同定のソースにする。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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.u-tokyo-hemat.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 智彦 (SATO, Tomohiko)

東京大学医学部附属病院輸血部・研究員

研究者番号：9 0 5 5 3 6 9 4