

公益財団法人 中山人間科学振興財団 研究助成金 報告書 2014

【老化のヒューマンサイエンス】

2014(平成26)年度「海外渡航助成」

白血病幹細胞の探究

および

抗体を用いた新規白血病治療法開発に関する基礎研究

中内 祐介

Yusuke Nakauchi MD, PhD

スタンフォード大学医学部

Stanford University School of Medicine, California, USA

ポスドクトラルフェロー

Postdoctoral Fellow

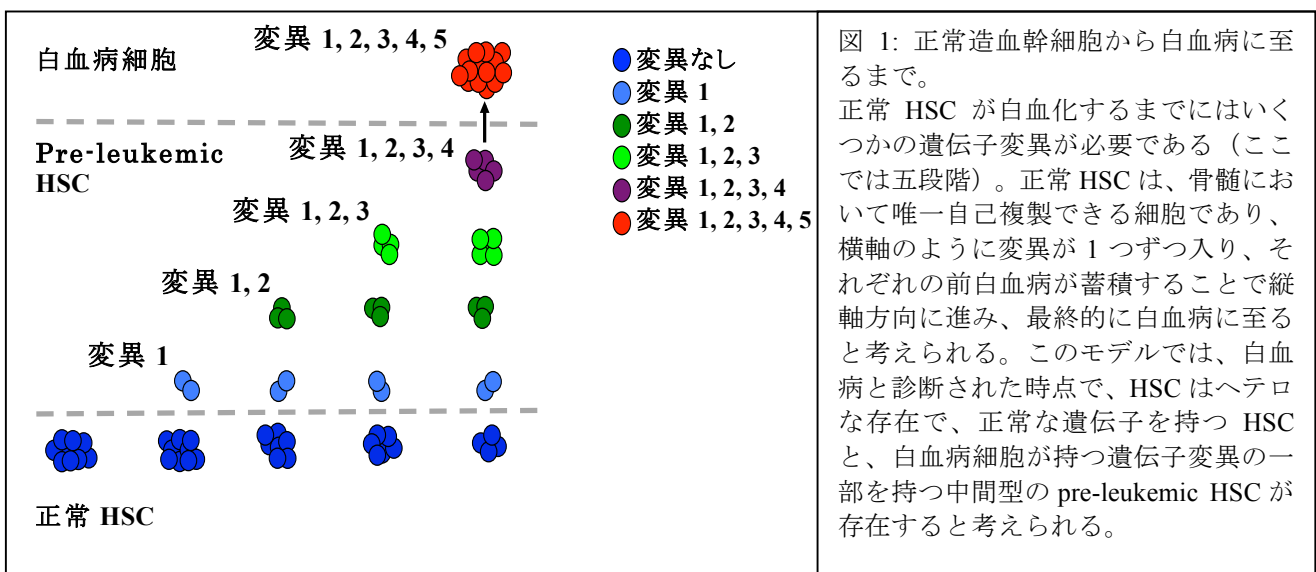
活動報告

[背景]

我が国では少子高齢化が進み、遺伝子異常の蓄積による白血病などの病気が増加している。特に私が専門とする急性骨髄性白血病 (AML; acute myeloid leukemia) は代表的な血液悪性疾患であり、5 年生存率は平均して 30-40%と、多くの新規治療法・治療薬が登場しているとはいえ、未だ予後は悪い。そこでより安全で有効な治療法・治療薬の開発を目指して、世界中の臨床医・研究者が日夜研究を続けている。

現在私が研究している AML に関して、その発症機序には、自己複製能を有する造血幹細胞 (HSC; hematopoietic stem cell) に遺伝子変異が生じて白血病化する場合と、分化した造血前駆細胞が遺伝子変異により自己複製能を再獲得して白血病幹細胞システムを形成する場合がありますと考えられている。次世代シーケンサーの発展もあり、最近では AML を含めた腫瘍遺伝学分野において容易にその原因遺伝子が特定できるようになり、白血病に関しても造血幹細胞・造血前駆細胞 (hematopoietic stem/progenitor cells; HSPC) における遺伝子変異をより深く解析することが可能となった¹。

私が所属する Majeti 研究室では、患者検体を用いて、白血病になる前段階で、白血病細胞が持つ遺伝子変異の一部を持つ HSC である前白血病幹細胞 (pre-leukemic HSC) を世界に先駆けて同定し、その遺伝子変異について報告した (図 1)²。最近では実際の患者検体を用いて、一人の患者の初発→寛解 (抗がん剤による治療後)→再発に至るまでを詳細に解析した報告も他のグループからされている³。



これまで多くの白血病研究は、がん細胞そのものに焦点を当ててきたが、留学先であるスタンフォード大学の Majeti 研究室では、pre-leukemic HSC に着目し、患者検体を用いた白血病のメカニズム解明、および、治療法の開発を目指している。白血病において、病態だけではなく、早期診断と予防的治療の対象としての pre-leukemic HSC の存在が益々注目を集めている。

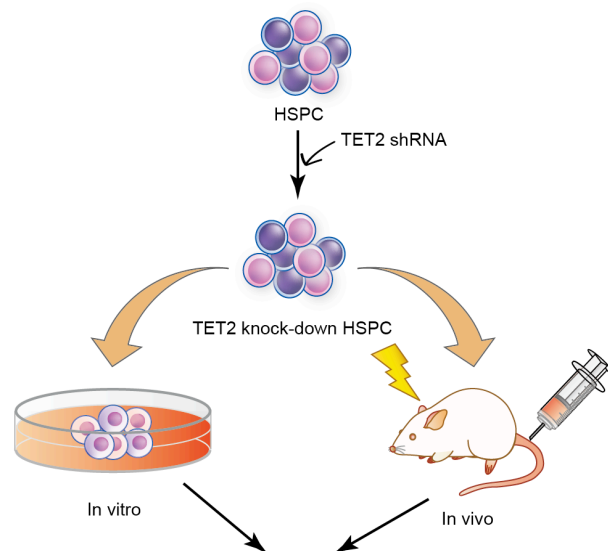
[研究目的]

白血病発症に関わる遺伝子変異のうち、最近の我々の報告から、Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase-2 (TET2) 遺伝子変異が、単独では細胞の腫瘍化や異形性をきたさないが、前がん状態/前白血病状態の形成に重要である可能性を示唆するデータが得られている⁴。TET2 は、DNA の「第 5 の塩基」とも言われる 5-メチルシトシン (5mC) を酸化して 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) のような誘導体にする反応を触媒する酵素であり、その異常により遺伝子発現を変化させることがある。特に血液悪性疾患ではこの TET2 遺伝子に極めて高頻度に機能欠損型変異がみられることが報告され、白血化の早い段階に獲得される遺伝子異常ではないかと考えられている。そこで私は白血化に大きく関与していると考えられるこの TET2 遺伝子に注目し、ヒト HSPC および白血病幹細胞 (pre-leukemic HSC を含む) におけるその役割について、以下 2 つのテーマを遂行することを目的として研究を開始した (図 2)。

- 1) TET2 shRNA を作製し、HSPC の中で TET2 をノックダウンした時の *in vitro/in vivo* における遺伝子発現および phenotype の違いを明らかにする。
- 2) TET2 遺伝子変異による腫瘍化の機構について明らかにする。

研究室に配属されてから間もないため、残念ながらいずれのテーマもまだ詳細なデータが得られていないが、これまでに行った実験の結果および今後の予定について、私が大学院時代に樹立したアレル特異的抗 human leukocyte antigen (HLA) 細胞障害抗体を用いた治療⁵への応用も含め、簡単に述べたいと思う。

図 2 研究の概略



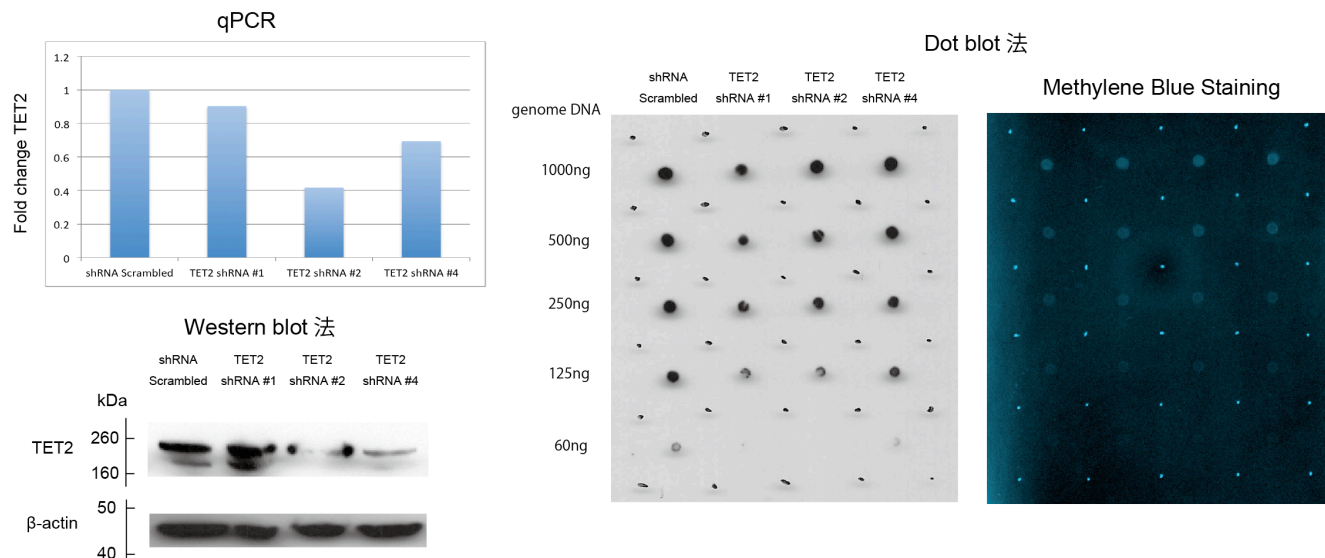
正常 HSPC の自己複製能・増殖能・分可能の評価
様々な shRNA を用いた腫瘍化のメカニズムの解明

[研究方法・結果]

- 1) TET2 shRNA を作製し、HSPC の中で TET2 をノックダウンした時の *in vitro / in vivo* における遺伝子発現および phenotype の違いを明らかにする。

Majeti 研究室に配属後、まず TET2 shRNA の作製を行い、レンチウイルスを用いて細胞株 (HEK293T) に形質導入し、細胞株に対する TET2 ノックダウンの影響について解析した (図 3)。

図3 TET2 shRNA の作製 (形質導入後の HEK293T 細胞を使用)



ここでは、HEK293T 細胞における TET2 ノックダウンの状態を、Western blot 法 (TET2 タンパク質の発現低下を確認)、qPCR (TET2 の mRNA レベルでの低下の確認)、および Dot blot 法 (抗 5hmC 抗体を用いて、TET2 の発現低下による 5-hmC 低下の確認) で確認した。次に正常 HSPC に TET2 shRNA を導入し、自己複製能、増殖能、分化能に与える影響を明らかにすることを目標とした。これにはまず、正常臍帯血 CD34 陽性 (造血幹・前駆) 細胞に TET2 shRNA を形質導入し、培養する (ベクターには遺伝子の動態を追跡するために GFP あるいは RFP を加え、さらに doxycycline で shRNA の発現を外部からコントロールできるようにする予定である)。その後、超免疫不全マウス (NSG) に 1 次・2 次移植を行い、臍帯血由来遺伝子導入細胞を生着させることで HSC の自己複製能についての評価ができると思う (*in vivo* 実験)。

続いて、TET2 遺伝子変異が HSC の増殖に与える影響について *in vitro* で検討する。臍帯血 CD34 陽性細胞と、それとは別に、より厳密にフローサイトメーターで回収した臍帯血 HSC (Lineage-CD34+CD38-CD90+CD45RA-; lineage = 分化細胞マーカー) に上記同様、レンチウイルスを用いて TET2 変異遺伝子を導入する。その後、GFP あるいは RFP 陽性細胞のみを採取し、血清なしでサイトカイン (臍帯血 HSC と前駆細胞を維持するために必須のもの) を含む培地で培養し、HSC の増殖能および生存能を測定する予定である。

分化能に関して、まず上記増殖能の評価の際に使用した形質導入された臍帯血 HSC と CD34 陽性細胞の CD34/CD38 の発現を調べることで評価が可能であるといえる。特に CD34+/CD38- 細胞の割合は GFP 陽性/陰性細胞の分画に左右され、TET2 変異遺伝子が HSC と、極めて HSC に近い前駆細胞の分化に与える影響を評価する上で重要である。単に CD34 陽性細胞に対する TET2 のノックダウンが与える影響に関してはすでいくつか報告があり、TET2 遺伝子をノックダウンすることで myeloid 系統に分化が偏ることが知られているが⁶、当該研究はより細かく細胞を分け (HSPC レベル)、機能解析まで行う点で大きく異なる。

HLA は身体のほとんど全ての細胞表面で発現している抗原であり、その主な働きは、自然免疫の制御、獲得免疫における T 細胞への抗原提示である。これまで正常・がん細胞問わず、様々な細胞に関して HLA の発現が調べられてきたが、白血病細胞に関して、HSPC レベルで詳細に解

析したものは私の知る限りない。このため、まずは各細胞系統における発現を、汎抗 HLA Class I/II 抗体を用いて確認する。HLA の発現は腫瘍細胞で低下しているという考えが一般的だが、pre-leukemic HSC における発現についてはいまだ不明のままである。もし発現を認めるのであれば(厳密には pre-leukemic HSC は腫瘍ではないため、十分に HLA を発現している可能性がある)、私が大学院時代に作製したアリル特異的抗 HLA 細胞障害抗体⁵を用いて、その治療モデルの開発も可能であると考え。さらに、TET2 変異遺伝子のペプチドがどの程度 HLA 上に載るのかの評価を行い、患者がこのペプチドに対するキラーT細胞(cytotoxic T cells; CTL)を有するか、それに対するCTLを誘導することができるかなどを 特定のHLAを発現するヒト細胞を用いて評価し、免疫療法の可能性を明らかにしたい。また、この手法を他の変異を持つペプチドに対しても応用し、pre-leukemic HSC の同定・治療につなげたい。

2) TET2 遺伝子変異による腫瘍化の機構について明らかにする。

例えば、患者検体において、TET2 変異遺伝子と JAK2 遺伝子変異を持つ細胞では変異の起こる順序によりその phenotype が変わること⁷、また TET2 変異遺伝子は AML 全体の約 8% で生じ、さらにそのうち FLT3 や NPM1 との結びつきが強いことが知られている⁸。その他、マウスを用いたモデルでは、遺伝子変異による腫瘍化の機構の解明に関する論文が数多く報告されている。Majeti 研究室では TET2 の shRNA 以外に、DNMT3A や IDH1/2 など、白血病細胞で認める遺伝子変異の shRNA をすでにいくつか保有しており、これらの shRNA と TET2 shRNA を様々な組み合わせでヒト細胞に形質導入し、*in vitro* / *in vivo* でどのような変異を加えたら白血化を促進することができるかどうかの評価をしたい。

[結論]

TET2 の遺伝子変異に注目し、これまでの研究活動に関して簡単に報告した。TET2 に関する論文はこれまで白血病細胞そのもの、および白血病幹細胞を主な標的として基礎研究および臨床応用が行われてきたが、我々の研究では前白血病段階にある pre-leukemic HSC に注目してヒト検体を用いた研究を行っている。残念ながらいまだ予備実験の段階にいるため、詳細なデータをここでは示すことができなかったが、本研究が進展することで、白血病の病態解明だけでなく、CTL を用いた新規白血病治療法開発への発展も十分に望めると考えている。特に pre-leukemic HSC を白血病発症前に封じ込めることができれば、そのインパクトは極めて大きいといえる。

[今後の目標]

私の研究者としての大きな目標は、前白血病段階に認める遺伝子変異が HSPC や白血病幹細胞・pre-leukemic HSC に与える影響を明らかにし、現時点での血液悪性疾患の根治療法である造血幹細胞移植に頼らない画期的な白血病の治療法につながる成果をあげることである。大きな目標に向かって異国の地でその第一歩を踏み出したわけだが、私が今いるスタンフォード大学は

私の専門とする分野に限らず、世界中からトップレベルの研究者たちが集まり研究を行っている世界有数の研究機関である。この大学に来て特に素晴らしいと感じたことは、異なる分野の研究者同士が垣根を超えて協力することで生物学の難題に取り組む **Stanford Bio-X** というプロジェクトがあることや、各分野の著名人を招いてのセミナーが毎日のようにキャンパス内のどこかで開催されていることである。このような環境に身を置くことで、単に一流の研究者と知り合いになることができるだけでなく、一つのことに縛られず、物事を様々な角度から見る目を常に養うことができる。このような経験は、いずれ自分の研究室を持つ時に大きな意味を持つものと考ええる。

臨床医を離れ、基礎研究者として海外の研究室での勤務を決めたことは、私にとって大きな決断であった。しかし、血液内科医として何もできずに多くの大事な患者を失ったことへの責任を決して忘れてはいない。私の大きな目標である医学研究者として世界に貢献する上で、そして何より血液疾患で苦しむ患者を一人でも多く救命する上で、スタンフォード大学の **Majeti** 研究室はそれを実現するための環境を提供してくれると確信している。

[参考文献]

1. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–37 (2013).
2. Jan, M. *et al.* Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science translational medicine* **4**, 149ra118 (2012).
3. Shlush, L. I. *et al.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328–33 (2014).
4. Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W.-J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C. & Majeti, R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 2548–53 (2014).
5. Nakauchi, Y. *et al.* Effective treatment against severe graft-versus-host disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized mouse model. *Experimental Hematology* **43**, 79–88.e4 (2015).
6. Pronier, E. *et al.* Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood* **118**, 2551–5 (2011).
7. Ortmann, C. a. *et al.* Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *The New England journal of medicine* **372**, 601–612 (2015).
8. Patel, J. P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **366**, 1079–89 (2012).

謝辞

留学に際し、ご支援をいただきました中山人間科学振興財団に深く感謝申し上げます。また東京大学医科学研究所幹細胞治療分野の中内啓光、山崎聡の各氏、スタンフォード大学の **Ravindra Majeti**、**Daniel Thomas** の各氏ほか、共同研究者をはじめ、お世話になりました全ての方にこの場をお借りして厚くお礼申し上げます。