

細胞間相互作用に着目した、骨髄増殖性腫瘍やクローン性造血から急性白血病への進展予防法の開発

福島県立医科大学 医学部 輸血・移植免疫学講座・講師

植田 航希

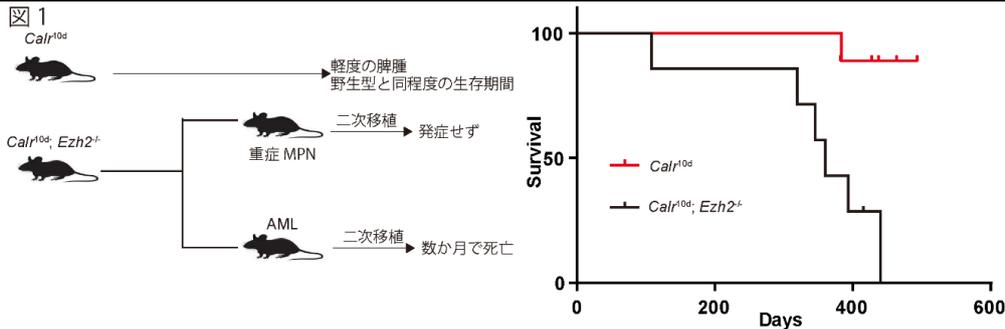
背景・目的

急性骨髄性白血病(AML)は高齢者に多く予後不良な造血器腫瘍であり、多くはクローン性造血や骨髄増殖性腫瘍(MPN)などの前白血病状態を経て発症する。近年、患者が前白血病から AML へ進行する過程で経時的に造血細胞を採取して単細胞遺伝子解析を行う研究が多数行われ、一つのクローンに遺伝子変異が蓄積することで悪性度が増していく **linear model** と、複数の変異クローンの中から一つのクローンが増殖優位性を獲得して白血病幹細胞(LSC)に形質転換する **selection model** の両方が存在することが明らかになってきた。また、同じ変異を持つクローンの中にも転写状態などの **non-genetic** な多様性があり、LSC への形質転換頻度や治療抵抗性に違いがあることも明らかになってきた。こうした現象を再現したマウスモデルを確立して解析し、LSC へ進化するクローンに共通の **non-genetic** 因子を治療標的とすることを目指して研究を開始した。

助成期間の成果

1. *Calr*10d/*Ezh2*^{-/-}マウスを用いた AML 発症(**linear model**) (図 1)

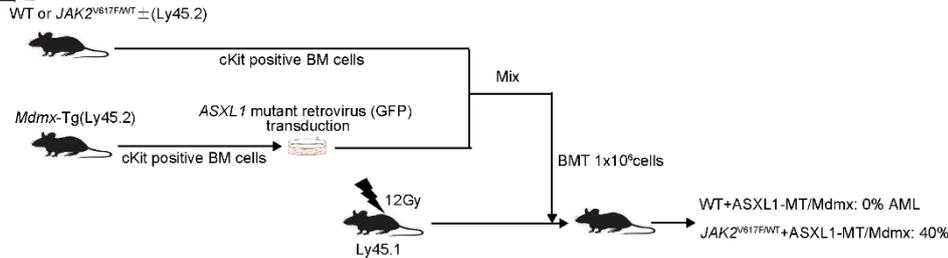
我々が樹立した、代表的な前白血病状態である MPN のドライバー変異を保有する *Calr* 変異マウス (*Calr*-10d)は、単独では軽症の MPN 表現型を呈し(軽度の脾腫、白血球の **myeloid skew**、骨髄の造血幹・前駆細胞分画(LSK)で **JAK-STAT** 系の亢進)を認めるのみで、生存期間は野生型と有意差を認めないため、他の遺伝子変異が加わることで MPN から AML へ進行する **linear model** として使用するのに適している。そこで、MPN 患者に高頻度に発生し、予後不良因子として報告されている **EZH2** の機能喪失型変異を再現する *Ezh2*^{-/-}マウスと *Calr*-10d マウスを交配して病態の変化を観察した。*Calr*-10d;*Ezh2*^{+/+}マウスに対して、生後数ヶ月でタモキシフェンを投与して **EZH2** を欠損させた。*Calr*-10d;*Ezh2*^{-/-}および *Calr*-WT;*Ezh2*^{-/-}マウスでは 20 ヶ月以内に死亡するマウスは稀であったが、*Calr*-10d;*Ezh2*^{-/-}マウスは生後 1 年以降死亡するマウスが多く、死因の多くは重症 MPN であったが、一部は骨髄細胞サイトスピンドで芽球の増生を認め、AML を発症していると考えられた。AML を発症していると考えられるマウスの骨髄を二次移植されたレシピエントマウスは短期間で死亡した。*Calr*-10d;*Ezh2*^{-/-}マウスにおいて MPN の重症化のみで死亡するマウスと AML を発症するマウスが存在するのは、おそらく AML 発症には更なる遺伝子変異などに起因するシグナル異常が必要だからであると考えられる。現在我々は *Calr*-10d;*Ezh2*^{-/-}マウスおよび *Calr*-10d/*Ezh2*^{+/+}マウスの造血幹・前駆細胞の RNA シークエンスなどにより、*Ezh2* 欠損が *Calr* 変異クローンの増殖優位性獲得に及ぼす作用の全容解明、AML 発症には更にもどのようなシグナル異常が必要であるかの検証を行っている。さらに、AML 発症には *Calr*-10d と *Ezh2* 欠損に加えて新たな遺伝子変異が必要であるという仮説を検証するため、実際に MPN から二次性 AML を発症した患者で急性転化の最終段階で高頻度に生じる遺伝子異常(**NRAS** 変異や **MDMX** 過剰発現)が加わることでより短期間・高頻度に AML を発症するか否かを検証している。また *Ezh2*^{-/-}マウスに代わって、**EZH2** 機能喪失型変異と並ぶ MPN における予後不良因子である **ASXL1** 変異を持つマウスを用いた実験も行っている。



2. 複数の遺伝子変異骨髄の競合移植モデルを用いた AML 発症(selection model) (図 2)

まず、*JAK2*V617F 変異を持つマウスの骨髄細胞(*Jak2*^{V617F/+})および p53 抑制因子 MDMX を過剰発現するマウス(*Mdmx*-Tg)の骨髄細胞に *ASXL1* 変異体をレトロウイルスで感染させた細胞(*ASXL1*-MT/*Mdmx*)を、競合的に野生型レシピエントに移植した。*ASXL1*-MT/*Mdmx* と野生型細胞を競合的に移植した場合や *ASXL1*-MT/*Mdmx* のみを移植した場合にはほとんど AML を発症しなかったのに対して、*ASXL1*-MT/*Mdmx* と *Jak2*^{V617F/+} を競合的に移植した場合は、約 40% のマウスが AML を発症し、AML の芽球細胞は *ASXL1*-MT/*Mdmx* 由来の細胞であった。すなわち、競合相手が *Jak2*^{V617F/+} であった場合のみ、*ASXL1*-MT/*Mdmx* 細胞が急性転化して AML を発症した。これは、AML 発症時には outcompete されてしまう *JAK2* 変異細胞が、前白血病期において *ASXL1*-MT/*Mdmx* 細胞の悪性を補助する役割を果たしていたことを示唆する。現在我々は、このような現象をもたらす細胞間相互作用

図 2



がどのようなものであるかを解明することを試みている。

考察・今後の展望

我々は MPN から AML への進行を再現するマウスモデルとして、linear model と selection model の2つを樹立しつつある。Linear model においては、実際の患者の場合には変異が蓄積したクローンが徐々に正常細胞を駆逐して拡大していくのに対して、マウスモデルでは全造血細胞が初めから遺伝子変異を持っているために表現形が強くなりすぎる傾向があり、これが前白血病から AML への進行過程を再現するためのネックになっていた。*Calr*-10d マウスは、MPN の表現形が軽度であるために寿命が長く、実際に MPN 患者で生じている他の遺伝子変異が加わった場合の造血の経過を観察するのに適していた。今後は AML 発症マウスと MPN で死亡するマウスの差異から分子機構の解明を進めていきたい。

Selection model に関しては、複数のクローンがモデルマウスの骨髄内に共存するという、実際の前白血病患者の多くで生じている病態を再現するものであり、一部とはいえ AML 発症に至ったことは今後の研究の進展を期待させる結果であった。一方で、レトロウイルスを用いた実験はウイルス挿入部位によっては病態の再現性が悪いなどの問題があるため、現在 *ASXL1* 変異体のノックインマウスを入手して *Mdmx*-Tg マウスと交配し、同様の実験を行っている。本モデルを活用して、前白血病期におけるクローン競合状態から、AML 発症時の白血病幹細胞へとどのように形質転換するのか、その分子機構を解明し、AML の発症を阻止するような治療法の開発に繋げていきたい。