

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部 医学域小児科学講座
職名・氏名	医学研究員 玉井望雅 ㊞

1 研究テーマ

ヒト iPS 細胞を用いた急性巨核球性白血病モデルの樹立

2 研究の目的

ダウン症候群を伴わない CBFA2T3-GLIS2(以下 CG2)融合遺伝子陽性急性巨核球性白血病(Acute megakaryoblastic leukemia; AMKL)は 1 歳未満の乳児に好発する予後不良な疾患である。本研究の目的は健康人由来 iPS 細胞に CRISPR-Cas9 を用いて実際の病態を精確に再現した融合遺伝子 CG2 を、胎児由来細胞の single cell RNAseq データより予想した AMKL の起源となる特定の細胞集団に誘導することで、AMKL 細胞を樹立しその後マウスへ移植することで AMKL 発症モデルを成立させることである。本研究によって得られる AMKL の in vitro および in vivo モデルを利用して、疾患発症の病態解明のみならず、大規模な薬剤スクリーニングを行うことで AMKL の予後を改善する新規薬剤の発見を目指す。

3 研究の方法

【AMKL の起源となる細胞の特定】

はじめに、ヒトの異なる発生段階の組織の single cell RNAseq 公開データを用いて AMKL の起源となる細胞集団を予想した。

【iPS 細胞を用いた Primitive hematopoiesis(PH)誘導】

次に、AMKL の起源として予想した Primitive hematopoiesis(PH)由来巨核球 (Megakaryocyte; Meg)(以下 P-Meg)を、ヒト多能性幹細胞(human pluripotent stem cells: hPSCs)を用いて分化誘導する手法について条件検討した。

【CRISPR-Cas9 を用いた融合遺伝子誘導】

CRISPR-Cas9 を用いて DNA 二重鎖切断を発生させ、その修復機構にて生じる実際の AMKL でみられる CG2 を誘導し、実際に誘導した CG2 が細胞に増殖能力を付与するかどうか検討した。

4 研究の成果

【AMKL の起源としての P-Meg の同定】

ヒトの各発生段階の胎児卵黄嚢および肝臓由来細胞の single cell RNAseq 公開データを用い、妊娠 4 週の

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

卵黄囊、妊娠 9 週および 16 週の肝臓細胞より巨核球クラスターを分類し、遺伝子発現差解析を行った。妊娠 4 週の卵黄囊由来巨核球クラスターでは妊娠 9 週および 16 週の肝臓細胞の巨核球クラスターと比べて、ITGA2B(CD41)と PTPRC(CD45)の発現において、CD41 の発現は変わらないが、CD45 の発現は有意に低値であった。発生初期のこの CD45-CD41+細胞集団が P-Meg である。さらに、この妊娠 4 週の卵黄囊由来巨核球クラスターでは GATA1 の発現レベルが妊娠 16 週の肝臓細胞に比べて有意に高発現していた。既報によれば発生初期の GATA1 高発現の造血幹細胞が CG2 を獲得した際に AMKL を発症することが予想されており、以上の解析結果から GATA1 高発現の未分化な P-Meg が AMKL 発症の細胞集団であることが想定された。

【iPS 細胞を用いた P-Meg 誘導】

次に、既報の血球系分化プロトコルを用い、hPSCs を P-Meg へ分化させた。本プロトコルでは IWP2 (Wnt-β catenin 阻害薬)と Activin A を用いることで、効率良く PH を誘導する。CD34-CD43+および CD34+CD43+細胞をそれぞれ FACS(fluorescence-activated cell sorting)にて回収し、サイトカイン含有半固形培地(MethoCult)培養によるコロニー形成能を評価した。同 hPSCs より、CFU-E (colony-forming unit-erythroid)や BFU-E (burst-forming unit-erythroid)などの赤血球系前駆細胞や CFU-GM (CFU-granulocyte, -macrophage)・CFU-G (CFU-granulocyte)・CFU-M (CFU-macrophage)などの P-Meg の原型となる顆粒球系前駆細胞が得られた。なお CD34+CD43+細胞からは CFU-GM・CFU-G・CFU-M が豊富に得られることが確認された。

【CRISPR-Cas9 を用いた CG2 の誘導】

HEK293T 細胞において、CBFA2T3 遺伝子のイントロン 11 と GLIS2 遺伝子のイントロン 2 に対して CRISPR-Cas9 を用いて DNA 二重鎖切断を引き起こしたところ、両部位における遺伝子融合を認めた。ヒト白血病細胞から樹立したサイトカイン依存性増殖能を持つ TF-1 へ同様の手法を用いて CG2 を誘導したところ、サイトカイン非依存性に増殖するサブクローンを樹立することができた。

5 今後の展望

本研究では AMKL の起源と予想される集団をヒトの異なる発生段階の single cell RNAseq 公開データを用いて同定し、hPSCs をその細胞集団へ分化させる手法を確立した。さらに、ゲノム編集を用いた全く新しい手法で、実際の AMKL 患者症例に見られる CG2 を導入する方法論を確立した。これらを組み合わせることで、hPSCs を用いた AMKL 発症モデルを樹立することが今後の研究目標である。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

本研究により精度の高い AMKL 発症モデルを樹立することができた際には、国際論文を発表し世界へ発信する予定である。また、日本血液学会学術集会、日本小児血液・がん学会学術集会、American Society of Hematology Annual Meeting にて演題発表する予定である。さらに国際論文が受理された際にはプレスリリースとして発信する。また新型コロナウイルスの感染状況を考慮し、山梨県民の方々へ向けた聴講会を検討する。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。