

F 研究成果報告書

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。本研究の目的は健常人由来 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. 研究の背景

【急性巨核球性白血病(Acute megakaryoblastic leukemia; AMKL)について】

AMKL は小児急性骨髄性白血病(Acute myeloblastic leukemia; AML)のおおよそ 10%、成人の AML の 1%を占める急性白血病である。AMKL はダウン症候群に合併する AMKL(Down syndrome-AMKL; DS-AMKL)とダウン症候群を伴わない AMKL(non-DS-AMKL)の 2 群に大別される。DS-AMKL の予後が 80%程度と比較的良好であるのに対し、non-DS-AMKL の予後は 50%以下と不良である。近年、小児 non-DS-AMKL における遺伝子異常の網羅的解析が行われ、CG2 が最も頻度の高い遺伝子転座であることが明らかになった(de Rooij, JD. et al. Nat Genet. 2017 Mar;49(3):451-456)。CG2 陽性の AMKL 症例は予後不良であり、5 年全生存率は 15~30%と報告されている。CG2 陽性 non-DS-AMKL 症例の予後を改善するために本疾患の病態のより深い理解とより良い標的を求めた治療法の開発が必要不可欠である。

【当該分野における研究状況】

これまで CG2 陽性 non-DS-AMKL の病態解明および治療法開発のために、マウス造血幹細胞にレトロウイルスを用いて CG2 cDNA を強制発現させる実験系が用いられた(Gruber, TA, et al. Cancer Cell. 2012 Nov 13;22(5):683-97.)。CG2 cDNA を導入された細胞は半固形培地におけるコロニー形成能を認め、複数回の継代を経てもそのコロニー形成能が保たれたが、マウスへ移植しても急性白血病転化することはなかった。CG2 以外の遺伝子変異の獲得の必要性が想像されるが、Gruber らは同論文中で CG2 を有する AMKL の症例では CG2 以外の遺伝子変異の合併率は低く、AMKL 発症において CG2 は単一の遺伝子変異であるはずとも述べている。このようにウイルスベクターによる CG2 cDNA の強制発現系では AMKL を発症させることができない。近年 Doxycycline 誘導性に CG2 cDNA が強制発現する遺伝子改変マウスによる AMKL モデルが提唱された(Lopez, CK, et al. Cancer Discov. 2019 Dec;9(12):1736-1753.)。後述するように、CG2 を強制発現したマウスでは発生段階によって異なるタイプの白血病が発症した。この実験系では異種間の問題はあるが、CG2 cDNA を強制発現させることで AMKL を発症させることに成功している。その後、同グループはヒトにおける実験結果の検証を行うために、健常人由来 iPS 細胞に CG2 cDNA を遺伝子導入して巨核球(Megakaryocyte; Meg)へ分化させるモデルを提唱した(Bertuccio, SN, et al. Hemasphere. 2020 Jan 22;4(1):e319.)。iPS 細胞が用いられるのは、CG2 を有する AMKL の症例では発症年齢が 0~4 歳と早く、多くが 1 歳未満という乳児発症であると報告されており (Masetti, R, et al. Haematologica. 2014 Aug;99(8):e127-9.)、AMKL の発症が血球系の発生異常に起因すると考えられるためである。Bertuccio らは早期の血球分化マーカーである CD43 のプロモーター配列の下流に CG2 cDNA を配置

して iPS 細胞の AAVS 領域(エピジェネティックな遺伝子抑制を受けない領域)に遺伝子導入した。この細胞は巨核球系分化異常を示したが、GATA1 や ERG といった主要な転写因子の発現レベルにおいて AMKL の患者検体とは大きく異なり、さらに半固形培地におけるコロニー形成能は 2 回の継代で失われた。そこで本研究では AMKL の起源となる細胞を見直し、CG2 の発現方法について検討した。

4. 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】

さらに、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。

5. 研究の成果

【AMKL の起源としての P-Meg の同定】

前述の Lopez らの報告によると E 12.5、生後 1-2 週、生後 8 週のマウス造血幹細胞に CG2 cDNA を発現させ免疫不全マウスへ移植すると、急性白血病を発症したマウスのうち、E 12.5 由来では全て AMKL であったのに対し、生後 8 週由来では全て AML であり、生後 1-2 週由来ではそれらの中間であった。さらに発生段階が進むにつれ GATA1 の発現が低下していくことが表現型の差異を決定付ける要因であると考えられた。これより発生の初期段階において GATA1 高発現の造血幹細胞が CG2 を獲得した際に AMKL を発症する可能性が示唆された(図 1-1)。

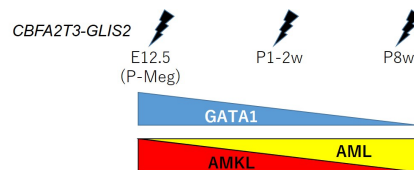


図 1-1 発生段階と表現型の関連

一方、この E 12.5 はヒトでは妊娠 6 週に相当し、肝臓において Primitive hematopoiesis(PH)および Definitive hematopoiesis(DH)の混成造血が行われている。PH は妊娠 2-3 週頃より卵黄嚢で起こり、造血の場を肝臓へ移してやがて衰退していく造血であり、赤血球・巨核球・単球の産生能を持つが、リンパ球の産性能が欠如する。一方、DH は妊娠 4 週頃より AGM(aorta-gonads-mesonephros)領域で起こり、その後造血の場を肝臓、骨髄へと移行し一生涯の造血能を司る (Ditadi, A, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Jan;18(1):56-67.)。PH 由来巨核球(P-Meg)は 2 核細胞であり、4 核以上の核を持つ D-Meg とは形態的に異なるのみならず、P-Meg が CD45-CD41+細胞から分化するのに対し、D-Meg は CD45+CD41+細胞から分化する (Cortegano, I, et al. Haematologica. 2019 Sep; 104(9): 1853-1865.)。CD45(PTPRC)は成熟した種々の血球において発現する細胞表面抗原であり、CD41(ITGA2B)は巨核球のマーカーの一つである。この事実を踏まえ、UK の研究チームが中心になり行われた各発生段階のヒト胎児卵黄嚢および肝臓由来細胞の single cell RNAseq データ (E-MTAB-7407, Popescu, DM, et al. Nature. 2019 Oct;574(7778):365-371.)を用い、妊娠 4 週の卵黄嚢、妊娠 9 週および 16 週の肝臓細胞より巨核球系マーカー (ITGA2B, PF4)を用い巨核球クラスターを分類し(図 1-2、矢印)、遺伝子発現差解析を行った。巨核球クラスターに関して、各発生段階の ITGA2B(CD41)と PTPRC(CD45)の発現を見ると、ITGA2B(CD41)の発現は変わらないが、PTPRC(CD45)の発現は妊娠 4 週の卵黄嚢由来巨核球クラスターにおいて有意に低値であった(図 1-3, 1-4)。

発生初期の段階におけるこの CD45-CD41+細胞集団が P-Meg である。さらに、GATA1 の発現レベルを見ると、妊娠 4 週の卵黄嚢由来巨核球クラスターでは 16 週の肝臓由来巨核球クラスターに比べて有意に高発現していた (図 1-5)。前述の既報と併せて考察すると、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。

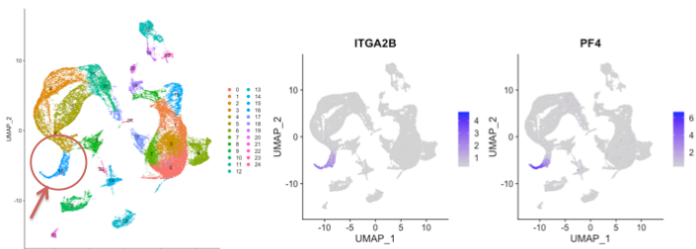


図 1-2 巨核球クラスターの同定

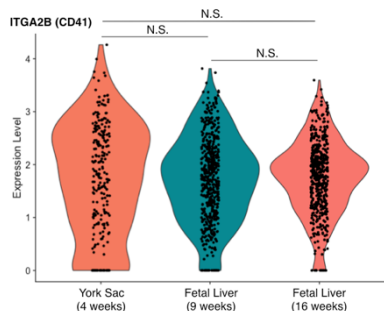


図 1-3 ITGA2B(CD41)発現

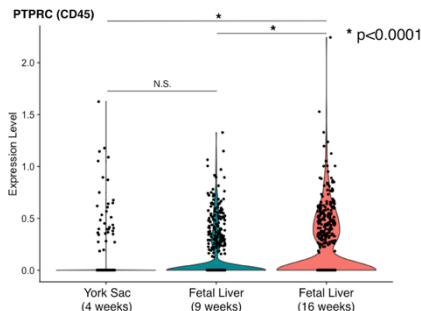


図 1-4 PTPRC(CD45)発現

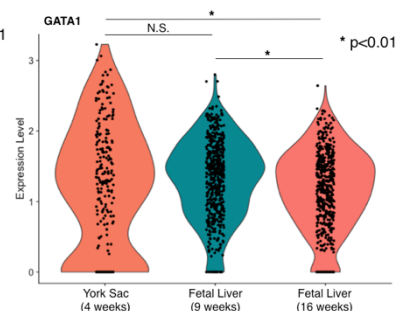


図 1-5 GATA1 発現

【iPS 細胞を用いた P-Meg 誘導】

次に、PH への分化において最適化された血球分化誘導プロトコル(Sturgeon, CM, et al. Nat Biotechnol. 2014 Jun;32(6):554-61.)を利用し、hPSCs の P-Meg への分化誘導を試みた。γ線照射したマウス胎児線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts: MEFs)上で培養および継代したヒト iPS 細胞株 HPS0063(201B7)(図 2-1)を複数個の細胞よりなる細胞塊とし、超低接着プレートにて BMP4 (Bone morphogenetic protein-4)含有液で培養した(Day0)。次に bFGF(basic fibroblast growth factor)を添加した(Day1)。さらに PH を誘導するために IWP2 (Wnt-bcatenin 阻害薬)と Activin A を添加し、一方でコントロールとして DH を誘導する CHIR99021 (Wnt-bcatenin agonist)と SB431542(Activin 阻害薬)を添加した(Day1.75~3)。本手法は細胞塊を超低接着プレートで培養しながら分化誘導することで、Embryonic Bodies(EBs)を形成させる。これに、さらに PH への分化を促進させる VEGF (vascular endothelial growth factor)・SCF (stem cell factor)・EPO (erythropoietin)・IGF1 (insulin-like growth factor)・IL6 (interleukin-6)・IL11・IL3・TPO (thrombopoietin)・FLT3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand)などのサイトカインを図に示すようなタイミングで添加した(図 2-2)。この一連の分化誘導

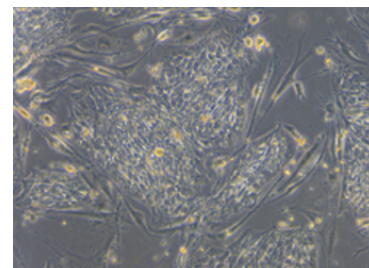


図 2-1 MEF 上で培養した hPSCs

により、分化誘導後 9 日目に血球系前駆細胞である CD34-CD43+および CD34+CD43+細胞が出現していることを確認した。次に、これらをそれぞれ FACS(fluorescence-activated cell sorting)にて採集し、サイトカイン含有半固形培地 MethoCult にて培養することでコロニー形成能を評価した。赤血球系前駆細胞である CFU-E (colony-forming unit-erythroid)・BFU-E (burst-forming unit-erythroid)や顆粒球系細胞である CFU-GM (CFU-granulocyte, -macrophage)・CFU-G (CFU-granulocyte)・CFU-M (CFU-macrophage)といった細胞分化を確認した(図 2-3)。特に、

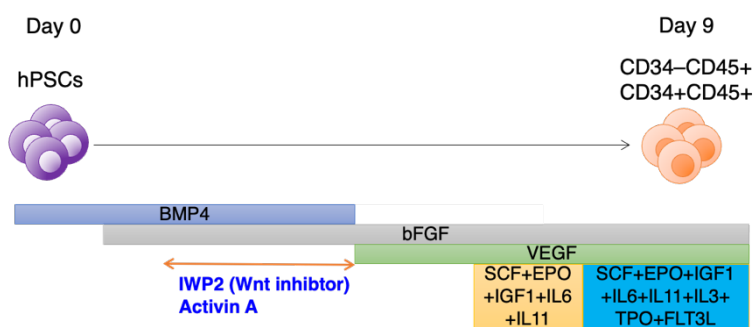


図 2-2 hPSCs を用いた PH への分化誘導プロトコル

CFU-E (colony-forming unit-erythroid)・BFU-E (burst-forming unit-erythroid)や顆粒球系細胞である CFU-GM (CFU-granulocyte, -macrophage)・CFU-G (CFU-granulocyte)・CFU-M (CFU-macrophage)といった細胞分化を確認した(図 2-3)。特に、

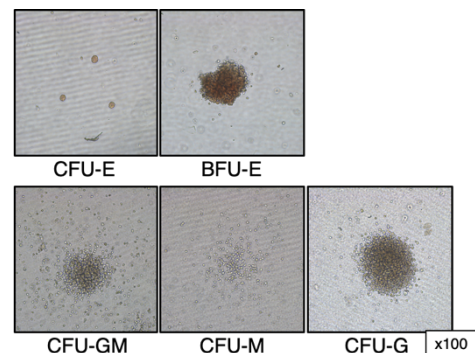


図 2-3 コロニー形成の例

CD34-CD43+ 細胞は赤血球系前駆細胞への分化能に優れ、CD34+CD43+細胞は顆粒球系細胞への分化能に優れていた(図 2-4)。この CD34+CD43+細胞由来の CFU-GM・CFU-G・CFU-M が P-Meg の原型であり、本手法により iPS 細胞を用いた P-Meg への誘導系を確認した。

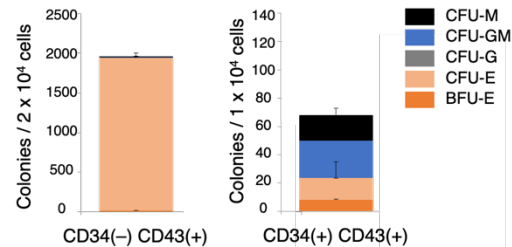


図 2-4 コロニー形成能の差異

【CRISPR-Cas9 を用いた CG2 の誘導】

これまで CG2 の機能解析はクローニングされた CG2 cDNA をウイルスベクターで発現させる手法や、CG2 cDNA を細胞のゲノムに組み込む手法が用いられた。前者の手法ではウイルスベクターによる遺伝子発現はしばしば発現レベルが強すぎる問題や、細胞分化に従ってウイルスのプロモーターのサイレンシングされることにより遺伝子発現が抑制されるなどの問題があった。後者の手法では早期の血球分化マーカーである CD43 のプロモーター配列の下流に CG2 cDNA を配置することで、血球分化に従った発現調整を可能にしたが、CBFA2T3 遺伝子プロモーターによる発現調節を受けないため、実際の CG2 発現レベルを再現することができなかった。さらに両者のように cDNA を導入する手法では、イントロン領域や 3'末端などの non-coding DNA 領域の潜在的な寄与を完全に無視せざるを得ず、実際の状況を精確に再現しているとは言い難い。そこで、本研究では CRISPR-Cas9 を用いて、実際の症例でみられる CG2 をより精確に再現する手法について検討した。ほとんどの CG2 陽性 AMKL 症例では CBFA2T3 のエクソン 1~11 と GLIS2 のエクソン 3~6 が融合することで CG2 を形成している(図 3-1)。そこで、CBFA2T3 のイントロン 11 と GLIS2 のイントロン 2 を標的とした 2 種類の gRNA をデザインし、ヒト胎児腎細胞(Human embryonic kidney: HEK) 293T 細胞にこれらの gRNA と Cas9 cDNA を共に発現させた。導入後 48 時間時点において、HEK293T 細胞より genomic DNA を抽出し、予想される CG2 のゲノム領域に対して PCR 反応を行った。すると、標的の gRNA と Cas9 cDNA を導入した細胞において CG2 形成が確認された(図 3-2)。次に、今回形成されることが確認された CG2 が実際に白血病化に関与するかどうかをサイトカイン依存性白血病細胞株である TF-1 細胞株を用いて検討した。TF-1 は Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) の存在下でのみ増殖することが知られている。TF-1 に対して HEK293T の時と同様に、標的の 2 種類の gRNA と Cas9 cDNA を共に発現させ、GM-CSF 下で細胞を 1 週間培養した後に、GM-CSF 無添加の培養液に交換した。すると、gRNA と Cas9 cDNA を導入した細胞において、GM-CSF に依存しない細胞増殖を認めた(図 3-3)。以上の結果から、CRISPR-Cas9 を用いた DNA 二重鎖開裂により機能的な CG2 を導入することに成功した。

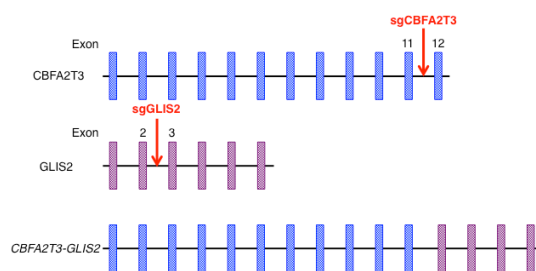


図 3-1 CBFA2T3-GLIS2 遺伝子転座

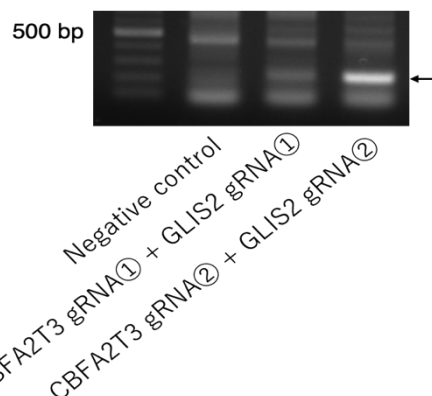


図 3-2 HEK293T における CG2 導入

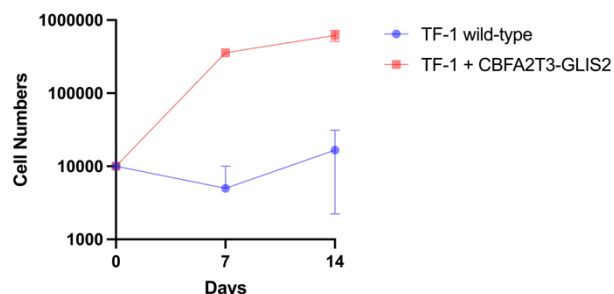


図 3-3 TF-1 における CG2 導入

6. 今後の展望

本研究では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た AMKL の起源と予想される集団を、hPSCs から分化させる手法を確立した。さらに、実際の AMKL 患者症例に見られる CG2 を、ゲノム編集技術を用いた手法で導入する方法論を確立した。これらの技術を組み合わせることで、hPSCs から分

化させた P-Meg に対してゲノム編集技術を用いて CG2 導入することで可能になり、AMKL 発症モデルとして期待された。本研究により hPSCs を用いて AMKL の病態をより精確に再現した細胞が供給できるようになり、マウスへの移植による in vivo モデルが樹立されれば AMKL 発症の病態解明および治療法開発に大きく貢献できる。つまり、in vitro AMKL モデルを用いて網羅的な薬剤スクリーニングを行い、有望な薬剤について in vivo AMKL モデルを用いてさらなる効果の検証を行うことが想定される。小児白血病は希少疾患であり、中でも治療法改善が求められる難治性白血病はさらに希少であり、本研究のような hPSCs を用いた疾患モデルの樹立は治療法開発において非常に重要な試みである。本手法を応用し、種々の先天性白血病モデルが樹立されることが期待される。