

急性リンパ性白血病の発症メカニズムの解明

東京理科大学 生命医科学研究所 免疫アレルギー部門
伊川 友活

【目的】

急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia : ALL) は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、その大半を B 前駆細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) が占める。染色体の転座の結果生じる融合蛋白が B-ALL の一因であることが知られているが、これら融合蛋白がどのように B 前駆細胞段階で分化を破綻させ B-ALL を発症させるのか明らかでない。

我々は最近、マウスおよびヒトの造血幹・前駆細胞を無限に増幅することのできる方法を開発した。この細胞は T, B リンパ球とミエロイド系細胞への分化能を持つため iLS (induced Leukocyte Stem) 細胞と名づけた (特許取得済, Ikawa et al. Stem Cell Reports 2015)。iLS 細胞を用いるとわずか 7 日間で多能前駆細胞から B 細胞系列への分化を誘導することが出来る。この方法を用いて経時的に網羅的遺伝子発現解析およびエピゲノム解析を行い、B 細胞系列への運命決定における転写ネットワークを明らかにした (Miyai et al. Genes Dev 2018)。

そこで本研究では、17;19 転座型 ALL の原因遺伝子であり、極めて予後不良な *TCF3-HLF* に着目し、まず iLS 細胞へ *TCF3-HLF* を導入することにより、*TCF3-HLF* を発現する iLS 細胞を作製する。次に、この細胞を放射線照射したマウスへ移植することにより、B-ALL を発症するか確かめる。また、*TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞を *in vitro* で B 細胞へ分化誘導し、*TCF3-HLF* が分化を阻害するか検証する。このようにして、B-ALL を発症するモデル系を確立するとともに、*TCF3-HLF* による B 細胞性腫瘍発生の初期プロセスを明らかにする。次に、*TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞をマウスへ移植する系を用いて、preleukemic な段階の細胞を経時的に採取し、白血病化の初期に起こる遺伝子発現を正常な細胞と比較することにより、白血病発症の分子機構を分化異常の観点から明らかにする。最後に、この知見をヒト B-ALL 細胞株を用いて検証し、分化異常を引き起こす因子を標的とした新しい診断・治療法の開発につなげることを目指す。

【方法】

1. *TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞の樹立

多能前駆細胞株としてタモキシフェンによって分化誘導可能な iLS 細胞を用いる。iLS 細胞の作製には、Id3-ERT2 (改変エストロゲン受容体) レトロウイルスを用いる。Id3-ERT2 をマウス骨髄の造血幹細胞へ導入し、タモキシフェンを作用させながら TSt-4 ストローマ細胞上で培養する。TSt-4 細胞は、通常は B 細胞への分化を支持するが Id3 が B 細胞分化に必須の転写因子である E2A の機能を阻害するため、初期の段階で分化が停止し、多能前駆細胞 (iLS 細胞) として増幅する。この細胞を継代、増幅させることによって培養 1 ヶ月ほどで均質な iLS 細胞を大量に作製することができる。次に *TCF3-HLF* をレトロウイルスを用いて iLS 細胞へ導入し、感染細胞をセルソーターを用いてソート、培養することにより、*TCF3-HLF* 陽性 iLS 細胞を作製する。また、この細胞が iLS 細胞を維持する条件で安定して増幅するのかを検討する。さらに、B 細胞へ分化誘導し、分化障害を引き起こすか調べる。

2. *TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞による B-ALL 発症の検証

TCF3-HLF 陽性 iLS 細胞が B-ALL を発症する能力を持つかどうかを検証するために、*TCF3-HLF* 陽性 iLS 細胞を 1×10^6 個ずつ 4Gy の放射線を照射した B6 マウスへ尾静脈から移植する。移植 4 週から 16 週後までマウスの健康状態や生存率をモニターする。また、4 週間毎にマウス数匹ずつを解剖し、末梢血や骨髄細胞、脾臓、リンパ節などをフローサイトメーター (FCM) を用いて解析する。また、骨髄の B-ALL 様細胞を採取し、培養するとともに、放射線照射した B6 マウスへ 2 次移植することにより、白血病幹細胞が存在するか確かめる。

次に、B-ALL で頻繁に認められる *NRAS G12D* 変異が白血病発症を促進するかどうか調べるために、作製した *TCF3-HLF* 陽性 iLS 細胞に *MSCV-NRAS G12D-Kusabira Orange* をレトロウイルスを用いて感染させ、*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 iLS 細胞を作製する。この細胞を同じ条件で培養することにより大量に増幅する。続いて、*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 iLS 細胞を放射線照射した B6 マウスへ移植し、B-ALL 発症が促進されるかどうかを確認する。また、*TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞を B 細胞へ分化誘導後、*NRAS G12D* を導入した細胞 (*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 CD19 陽性細胞) を作製し、B-ALL 発症能力を比較検討する。

3. *TCF3-HLF* の標的遺伝子の探索

TCF3-HLF による B-ALL 発症メカニズムを解明するため、*TCF3-HLF* 陽性 iLS 細胞をマウスに移植して得られ

た B-ALL 様細胞を採取し、qRT-PCR で遺伝子発現を解析する。

【結果及び考察】

1. *TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞の樹立

TCF3-HLF 発現 iLS 細胞を作製することに成功した。この細胞は iLS 細胞と同じ培養条件で安定して増殖し、表面抗原マーカーの発現も変わることはなかった。このことから、*TCF3-HLF* は iLS 細胞の増殖に影響しないことが明らかとなった。

次に、*TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞を *in vitro* で B 細胞へ分化誘導したところ、CD19 陽性細胞の割合・細胞数ともコントロールと比べて顕著に減少し、多くの Mac1 陽性細胞が生成された (図1)。従って、*TCF3-HLF* は多能前駆細胞から B 細胞への分化を阻害することが明らかとなった。

2. *TCF3-HLF* 発現 iLS 細胞による B-ALL 発症の検証

TCF3-HLF 陽性 iLS 細胞を 1×10^6 個ずつ 4Gy の放射線を照射した B6 マウスへ尾静脈から移植すると、移植 3~4 ヶ月後にすべてのマウスが B-ALL を発症し死亡した。死亡直前のマウスを解析すると、骨髄、脾臓、リンパ節において $B220^+CD19^+IgM^+CD43^+$ pro-B ALL 様の細胞が異常増殖していることが確認された (図2)。また、骨髄由来の pro-B ALL 様の細胞をソーティングし、培養すると増殖因子や TSt-4 細胞非依存的に増殖した。この pro-B ALL 様細胞を放射線照射した B6 マウスへ 2 次移植すると、移植後 1 ヶ月ほどですべてのマウスが B-ALL を発症し死亡した。2 次移植したマウスでは、骨髄、脾臓、リンパ節において B-ALL 様細胞が浸潤していた。興味深いことに、この B-ALL 様細胞は $B220^+CD19^+IgM^+CD43^-$ pre-B 細胞の表現型を示した。一般的に、pro-B ALL よりも pre-B ALL 細胞の方が悪性度が高いとされているため、この発症モデルは患者に近い病態を再現していると考えられた。

次に、*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 iLS 細胞を作製したところ、iLS 細胞と比べて細胞の増殖速度が極めて遅く、維持している間に Mac1 陽性のミエロイド系細胞への分化が認められた。意外なことに、この細胞を放射線照射した B6 マウスへ移植しても B-ALL を発症しなかった。これは *NRAS G12D* により、多能前駆細胞から B 細胞へ分化が完全に阻害されたためと考えられる。

そこで、iLS 細胞を CD19 陽性細胞へ分化誘導した後に、*NRAS G12D* を導入した。この、*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 pro-B 細胞を放射線照射した B6 マウスへ移植すると、2 ヶ月以内にすべてのマウスが B-ALL を発症し死亡した。このことから、B-ALL 発症を促進する *NRAS G12D* 変異は pro-B 段階以降に起こることが示唆された。

3. *TCF3-HLF* の標的遺伝子の探索

TCF3-HLF 陽性 iLS 細胞における遺伝子発現を qRT-PCR で解析したところ、正常な iLS 細胞と比べて *TCF3-HLF* の標的遺伝子とされる *Lmo2* や *Bcl6* の発現が上昇していたが、*Snai1/2* の発現には変化がなかった。一方、*TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 iLS 細胞では、*Snai1/2* や *Bcl6* の発現が顕著に上昇していたが、*Lmo2* の発現は *TCF3-HLF* 陽性 iLS 細胞よりも低下していた。また、腫瘍化に関わる *Myc* の発現は正常な pro-B 細胞よりも *TCF3-HLF* 発現 pro-B ALL 細胞のほうが高く、*TCF3-HLF* 発現 pro-B ALL 細胞よりも *TCF3-HLF/NRAS G12D* 発現 B-ALL 細胞の方が高かった。一方、B 細胞分化に重要な転写因子である *Pax5*, *Ikzf1*, *Ebf1* などの発現は低下していたが、ミエロイド系細胞への分化に重要な転写因子 *Cebpb* の発現は顕著に上昇していた。これらの結果から、B-ALL への進行に伴い B 細胞関連因子の発現が低下し、分化が停止すること、また、*Myc*, *NRAS* など細胞の増殖を促進する遺伝子の活性化は pro-B 段階以降に起こることが示唆された (図3)。

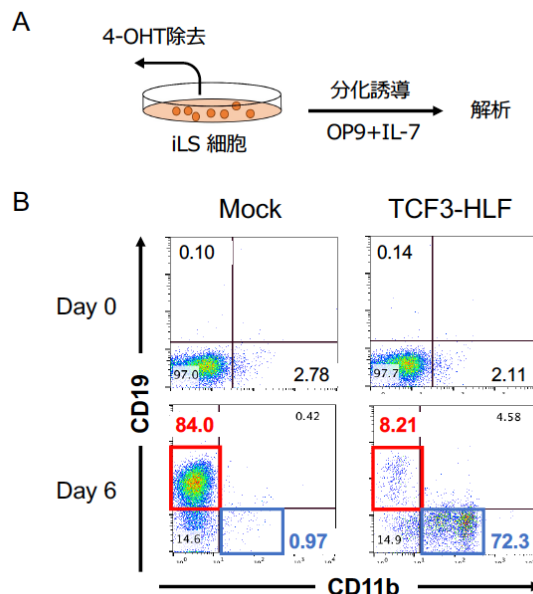


図1. *TCF3-HLF*陽性iLS細胞のB細胞への分化能

A. iLS細胞からB細胞への分化誘導の模式図。iLS細胞は4-OHT依存的に自己複製するが、培地から4-OHTを除去すると、B細胞への分化が誘導される。 B. B細胞への分化誘導前後のFACSパターン。数字はゲート内の細胞の割合を示す。

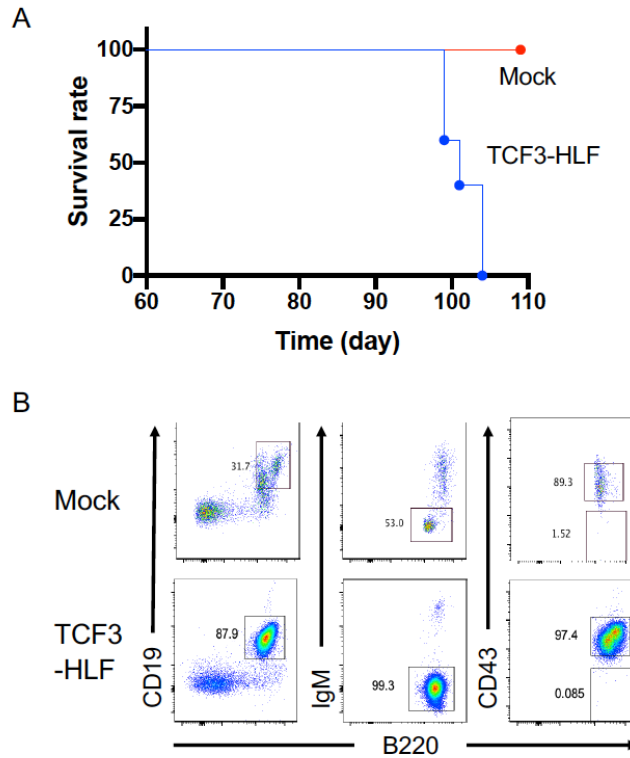


図2. *TCF3-HLF*陽性iLS細胞からのB-ALL発症

A. 移植マウスの生存曲線。 B. B-ALLを発症したマウス骨髄のFACSパターン

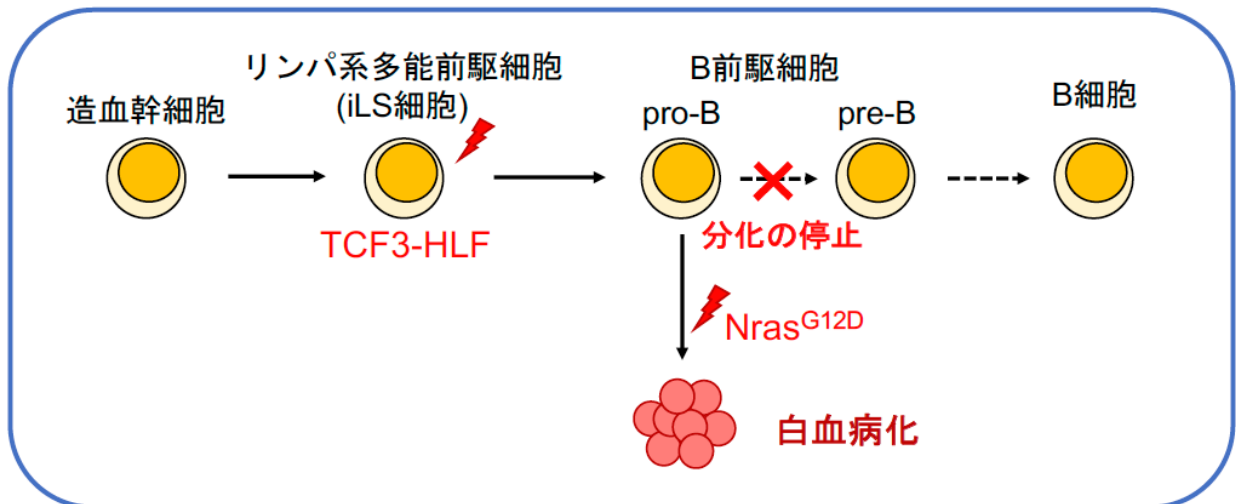


図3. *TCF3-HLF*によるB-ALL発症のモデル

リンパ系多能前駆細胞 (iLS細胞) の段階で、染色体転座により *TCF3-HLF*が生じる。*TCF3-HLF*はB細胞分化に重要な転写因子の発現を抑制することにより分化を抑制し、pro-B細胞段階で分化が停止する。*TCF3-HLF*を発現するpro-B細胞は*Nras*や*Myc*などに変異が入ることにより自己複製能を獲得し、白血病細胞になると考えられる。