

前白血病クローンの経時的追跡による白血病の病態解明

福島県立医科大学医学部 輸血・移植免疫学講座
植田 航希

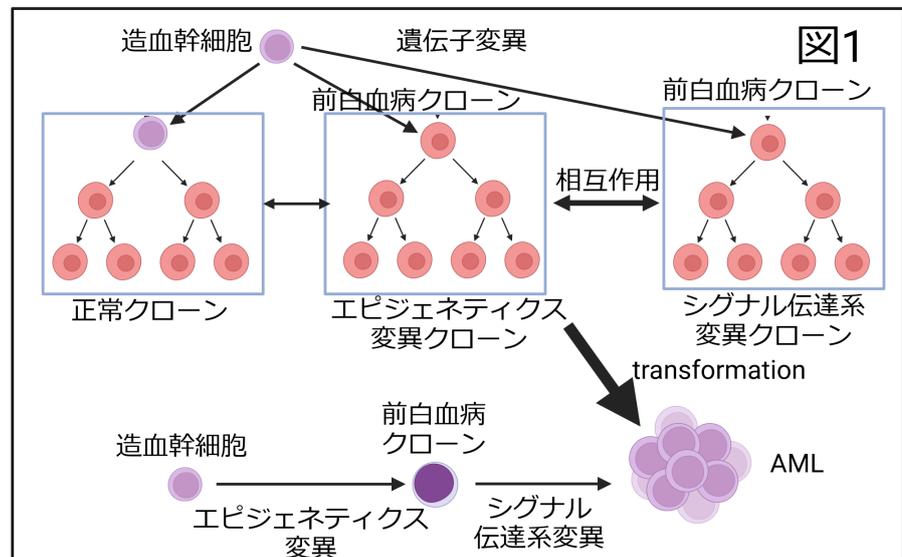
1. 研究の目的

本研究は、クローン性造血(CH)や骨髄増殖性腫瘍(MPN)をはじめとする前白血病病変が急性骨髄性白血病(AML)に進行する過程における造血幹細胞の変化について、遺伝子変異以外のnon-geneticな要素を中心に解明することを目指したものである。さらに、non-geneticな変化をもたらす要素として、最終的に白血病幹細胞に進化するクローンとそれ以外のクローンの細胞間コミュニケーションに注目して実験計画を立てた。

2. 研究の背景

我々の考えるnon-geneticなAML発症モデルを簡略化すると、図1のようになる。これまで報告されているAML患者検体を用いた研究から、多くの患者はAML発症の数年以上前から造血細胞に遺伝子変異を持っていることがわかっている(Nature.559:400-408,2018)。このうち症状や血算の異常がない群をCHと定義しているが、CHからAMLへ進行するのは数%にとどまる。このような病態進行は、すでに遺伝子変異を持っている造血細胞に新たな変異が加わることで生じると長年考えられてきた。しかし近年のシングルセルレベルの解析により、必ずしも前白血病期に多数を占める変異クローンに新たな変異が生じて白血病幹細胞(LSC)へ進化するのではなく、LSCが前白血病期には非常に小さな(あるいは検出感度以下の)クローンから発生するケースも多いことがわかった。この中には細胞増殖を強く活性化するような遺伝子変異(例えばシグナル伝達系遺伝子変異)を獲得することで一気に拡大するようなクローンも存在するが、変異プロファイルだけではクローンの急速な拡大と白血化を説明し得ない症例も多く存在する(Nat Commun.12:1366, 2021)。

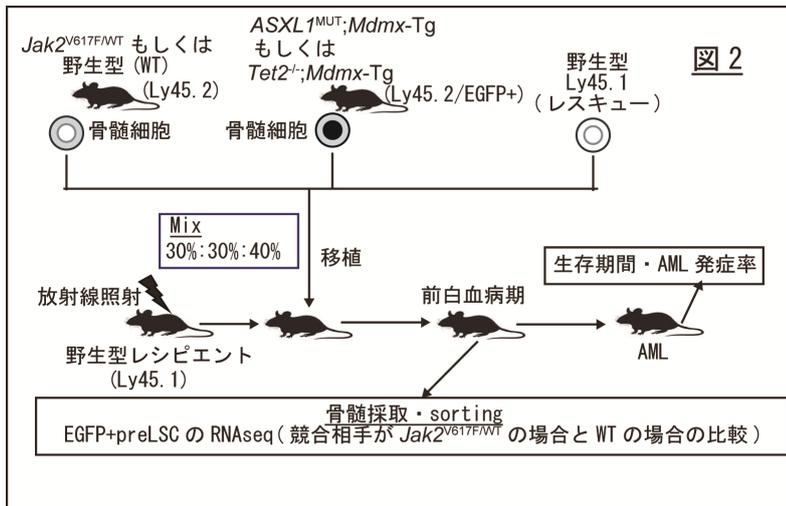
そのことから我々は、cell extrinsicな要素が病態の進行に影響すると考えた。Cell extrinsicな要素として、造血幹細胞と造血ニッチを構成する細胞の相互作用などがよく研究されているが、前白血病細胞同士の相互作用・細胞間コミュニケーションはほとんど研究されていない。そこで、複数の異なる遺伝子変異クローンを同時に持つ前白血病からAMLを発症するマウスモデルを樹立することから研究を開始した。



3. 研究計画

3-1. マウスモデルの樹立

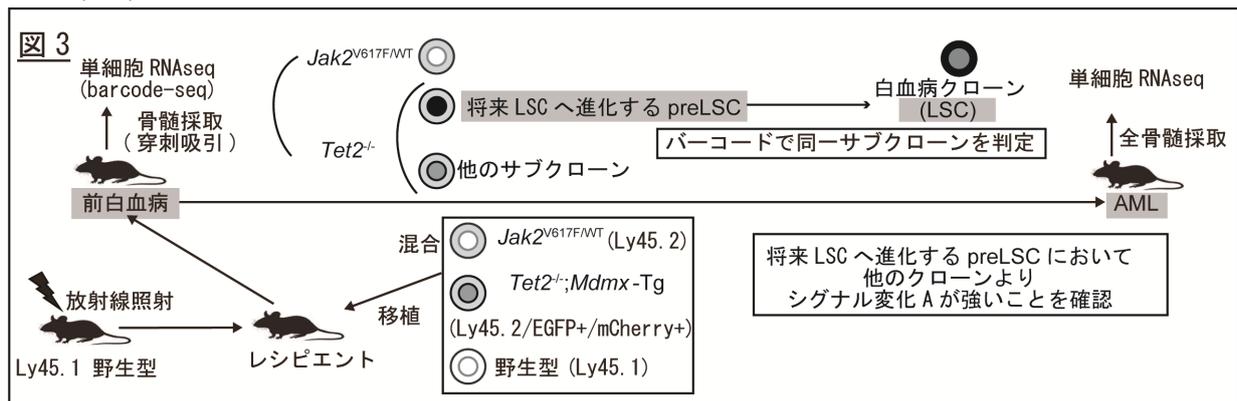
前白血病クローン同士のコミュニケーションが病態を悪化させることを確かめるために、2種類の前白血病マウス、すなわちシグナル伝達系遺伝子変異を持つ *Jak2*^{V617F/+}マウス(Ly45.2)とエピジェネティクス因子変異モデルである *Tet2*^{-/-}マウス(Ly45.2/CAG-EGFP+)もしくは *ASXL1*^{MUT}マウス(ヒト *ASXL1*-p.E357RfsX15変異体(IRES-GFP)を *ROSA26* にノックインしたマウス)の骨髄を様々な比率で混合して、致死量放射線照射した野生型レシピエントマウス(Ly45.1)に移植した。AML発症率を高めるため、申請者自身の知見(Cancer Cell.39:529-547,2021)に基づき、エピジェネティクス変異マウスと *p53* 抑制因子である *MDMX* を過剰発現するマウス(*Mdmx*-Tg)を *Tet2*^{-/-}マウスおよび *ASXL1*^{MUT}マウスと交配し、これらのマウスの細胞を *Jak2*^{V617F/+}細胞または野生型細胞と同時に移植した(図2)。



3-2.細胞バーコードを用いた検討

図2の検討において、後述するように前白血病期に *Jak2*^{V617F/+} クローンと競合的に存在した *Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* または *ASXL1*^{MUT}; *Mdmx-Tg* クローンがAMLの発症母地となったことから、*Jak2*^{V617F/+} クローンは自らがAMLに進化するのではなく、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* または *ASXL1*^{MUT}; *Mdmx-Tg* クローンの形質転換を支持する役割を果たしたと考えられた。また、前白血病期の *Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* 造血幹細胞分画(すなわち前白血病幹細胞(pre-LSC))を

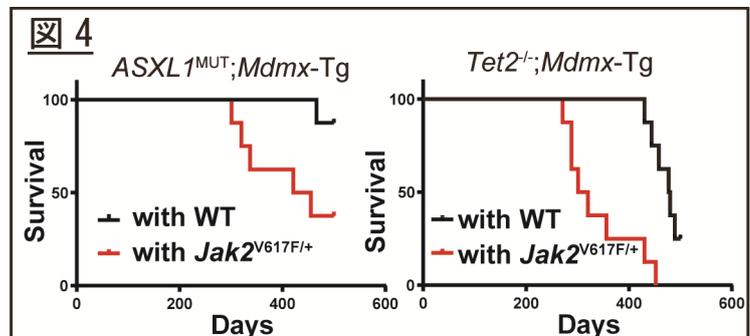
RNAシーケンスすることで、*Jak2*^{V617F/+} クローンが競合的に存在した場合にシグナルAおよびBの亢進が見られた。このシグナルAとBが、真にpre-LSCからLSCへの進化を惹起していることを示すためには、シングルセルレベルでpre-LSCを追跡し、シグナルA・Bが亢進しているpre-LSCがLSCへ進化することを確認する必要がある。そこで、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* 細胞をレシピエントマウスに移植する前にレンチウイルスによる細胞バーコード(SPLINTR: Nature.607;125-131,2022)を付加し、移植後前白血病期とAML発症後に経時的に骨髄を採取して単細胞RNAシーケンス(scRNA-seq)を行い、バーコードの照合から最終的にLSCに進化したpreLSCクローンを抽出、その細胞でシグナルA・Bの亢進が他の細胞よりも強いかを検討する(図3)。



4. 研究成果

4-1. 前白血病クローン同士の細胞間コミュニケーションによるAML発症が推定されるモデルの樹立

3-1に記載した移植モデルの生存曲線を図4に示す。前述したように、*Jak2*^{V617F/+} クローンを同時に移植した方が高確率・短時間でAMLを発症した。AMLを発症したすべてのマウスでAML細胞はEGFP陽性であり、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* または *ASXL1*^{MUT}; *Mdmx-Tg* クローンがLSC(AMLの発症母地)であった。つまり、前白血病期の *Jak2*^{V617F/+} クローンの存在はAML発症に重要な役割を果たしていることが示唆される一方で、発症時にはほぼ消失してしまっていることがわかった。これはすなわち、*Jak2*^{V617F/+} クローンが *Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* または *ASXL1*^{MUT}; *Mdmx-Tg* クローンにcell extrinsicな影響を及ぼすことでAML発症に寄与していることを示唆している。



そこで、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg* と *Jak2*^{V617F/+} または WT(野生型)を同時に移植したマウスにおいて、移植後2ヶ月の前白血病期に骨髄を採取して、EGFP陽性(*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg*)のLSK分画をソーティングし、RNAシーケンスを行った。この時点ではレシピエントマウスのEGFP陽性細胞数に差は認めないが、RNAシーケンスでは *Jak2*^{V617F/+} を同時に移植した群でシグナルA・B(マスク)の亢進が認められた(図5)。

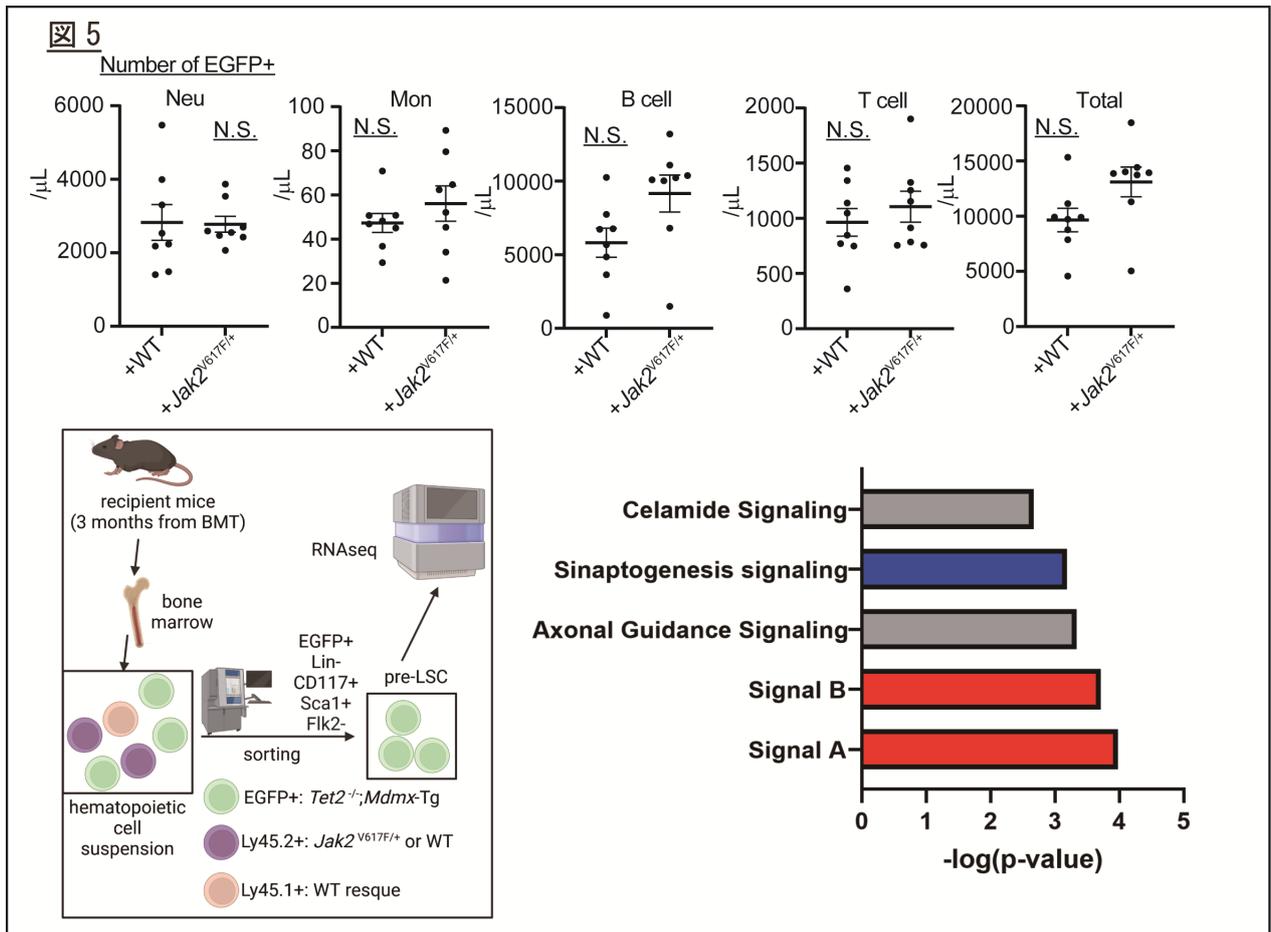


図5: 右下はRNAシーケンスの結果をIPAのcanonical pathway解析で検討したもので、赤は+*Jak2*^{V617F/+}で亢進、青は減弱、グレーは一方方向性ではない動きを示すpathwayを表す。シグナルA・BはこれまでAMLのLSC分画における亢進が報告されているシグナル変化であるが、現時点ではマスクする。

4-2. 将来LSCに進化するpreLSCにおいてシグナルA・Bの亢進が強いことを証明するための実験

シグナルA・BはpreLSC/LSCの細胞増殖に必須であると予想されるため、阻害剤を使用すればAML発症が抑制されると予想されるが、それをもってシグナルA・Bが細胞間コミュニケーションによるAMLの発症に必須であると断定することはできない。(細胞間コミュニケーション以外の理由で上昇している可能性もあるため)

そこで3-2で説明したように、細胞バーコードとscRNA-seqを用いたクローンの追跡により、将来LSCに進化するpreLSCが前白血病期からシグナルA・Bの亢進を示していることを証明し、さらに*Jak2*^{V617F/+}側の細胞のscRNA-seqも行っており、細胞間相互作用解析ツール(CellChatなど)を用いてどのような相互作用によってシグナルA・Bの亢進が生じるのかを明らかにする計画を進めている。

本実験においては、バーコードを感染させた細胞の幹細胞性が低下するためか、AML発症率が低下し、条件検討に時間を要した。

まず、申請時の研究計画書ではASXL1^{MUT}; *Mdmx-Tg*に細胞バーコードを感染させるとしていたが、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg*の方がAML発症率が高い(図4)ため、*Tet2*^{-/-}; *Mdmx-Tg*を使用することにした(これによって研究の趣旨は特に変化しないため)。さらに、scRNA-seqの前にバーコードのdistributionのみを測定する目的で、PCRによるバーコード増幅と次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、バーコードを感染させる際にレンチウイルスの感染効率が良すぎると複数のバーコードが挿入される可能性が高いこと、バーコードのクローン数が多すぎるとscRNA-seqで全クローンを網羅できないために、LSCに進化するクローンが発症前のサンプルから漏れてしまう可能性があることがわかった。これらの条件を調整し、感染効率5%程度でSPLINTR(mCherry陽性)を感染させて50000細胞程度のmCherry陽性細胞をソーティングし、7日ほど培養してから移植することで、約2000-5000種類のバーコード(つまり前白血病クローン)がレシピエントに生着することがわかった。この方法でもAML発症率は100%ではないが、およそ40-50%のマウスはAMLを発症することがわかったので、この移植条件を用いて、今後の研究を進めていく。