

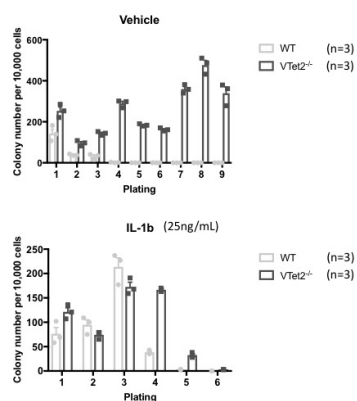
クローン造血制御による新規白血病予防法の創成

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科
國本 博義

1. IL-1 β 刺激はTet2欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しない

本研究では、Tet2欠失骨髄マクロファージが産生するIL-1 β により、正常造血幹細胞は幹細胞機能が低下して正常造血クローンが縮小する一方、Tet2欠失造血幹細胞は幹細胞機能が維持又は増強されTet2欠失血球クローンが骨髄内で相対的に増殖するのではないかとという仮説を立てた。本仮説を検証するため、まずTet2欠失造血幹細胞の幹細胞機能（自己複製能）に対するIL-1 β シグナルの影響を調べた。賦形剤またはIL-1 β を25ng/mLの濃度で添加してメチルセルロース軟寒天培地上で造血幹細胞を含む野生型またはTet2欠失マウス骨髄細胞を連続継代培養したところ、賦形剤添加群に比べてIL-1 β 添加群でTet2欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった(図1)。以上から、IL-1 β 刺激によりTet2欠失造血幹細胞の幹細胞機能が維持又は増強されるという仮説は成立しないことが判明した。

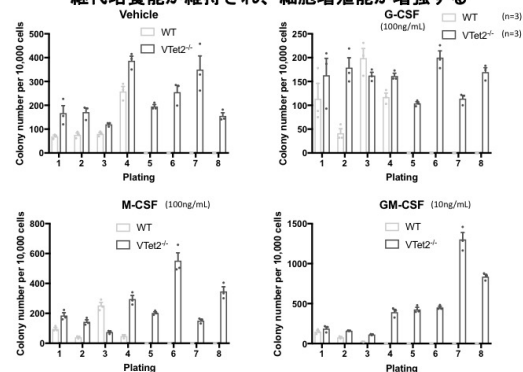
図1. IL-1 β はTet2欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しない



ヒトTET2変異は造血器腫瘍の中でもとりわけ単球の増加を伴う慢性骨髄単球性白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)で変異頻度が高く(Smith et al. Blood 2010)、血球系列特異的Tet2欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を伴うCMML様の病態を呈することから(Moran-Crusio et al. Cancer Cell 2011)、TET2の機能喪失は造血幹細胞の自己複製能を増強させるのみならず骨髄単球系へ分化を誘導すると考えられる。骨髄単球系への血球分化・成熟には顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(Macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)が深く関与していることが知られているが、これら骨髄単球系サイトカインに対するTet2欠失細胞の挙動については不明な点が多い。

そこで申請者らは、骨髄単球系サイトカイン(G-CSF、M-CSF、GM-CSF)をそれぞれ単独で添加して野生型またはTet2欠失マウス骨髄細胞をメチルセルロース培地上で連続継代培養を行なった。その結果、GM-CSF(10ng/mL)を添加した場合には、サイトカイン非存在下に比べて野生型細胞はコロニー形成能が減弱する一方、Tet2欠失細胞はコロニー形成能・継代培養能が継代培養を重ねるごとに増強することが確認された(図2)。以上より申請者らは、骨髄単球系サイトカインGM-CSFがTet2欠

図2. Tet2欠失細胞はGM-CSF慢性刺激で継代培養能が維持され、細胞増殖能が増強する



失造血幹細胞の自己複製能(幹細胞機能)を増強させるとともに、GM-CSFに対する感受性が異なるために野生型に比べてTet2欠失細胞は骨髄単球系へ分化がシフトしやすいのではないかと考えた。本仮説を検証するため、申請者らはまず同数の野生型またはTet2欠失造血幹前駆細胞を賦形剤またはGM-CSF

10ng/mL存在下で培養し、培養後のCD11b陽性単球細胞数、Annexin V陽性アポトーシス細胞数及び各細胞周期(G0, G1, S/G2/M)に存在する細胞数をフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型では賦形剤添加群に比べてGM-CSF添加群でCD11b陽性単球細胞数の増加を認めたのに対して、*Tet2*欠失細胞ではGM-CSFを添加してもCD11b陽性単球の増加はみられなかった(図3)。また野生型では賦形剤添加群に比べてGM-CSF添加群でAnnexin V陽性アポトーシス細胞数やS/G2/M期に誘導された細胞数が増加したのに対して、*Tet2*欠失細胞ではGM-CSFを添加してもこれらの細胞の増加はみられなかった(図3)。以上から、*Tet2*欠失造血幹前駆細胞は野生型に比べてGM-CSFに対する反応性が低下していることが示唆された。野生型に比べて*Tet2*欠失細胞でGM-CSFに対する反応性が低下するメカニズムを明らかにするため、申請者らは野生型または*Tet2*欠失造血前駆細胞分画におけるGM-CSF受容体 α 鎖(GM-CSFR α)の細胞表面発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型と*Tet2*欠失細胞でGM-CSFR α の発現レベルに有意差はみられなかった(図4)。以上より、野生型と*Tet2*欠失細胞の間のGM-CSFに対する反応性の相違は受容体の発現レベルの違いからではなく、受容体下流のGM-CSFシグナル活性が何らかのメカニズムで変化していることが原因として考えられた。

これまでの研究結果から、*Tet2*欠失細胞は野生型に比べてGM-CSF刺激を加えても単球系細胞への分化やアポトーシスが誘導されにくいことが示唆され、*TET2*変異陽性細胞はGM-CSF刺激に対する抵抗性を示して未分化性を維持することで結果的に骨髓単球系前駆細胞段階での分化停止、不死化を招き、白血病発症に寄与するのではないかと考えられた(図5)。今後、野生型と*Tet2*欠失細胞をGM-CSFで刺激した際に、JAK2/STAT5やPI3K/AKTシグナルなどのGM-CSFシグナル活性に違いがみられるのかをウェスタンブロット法や細胞内リン酸化フローサイトメトリーで明らかにしていく。

