

研究経過・成果報告書

1. *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスにおける若年性骨髓単球性白血病・慢性骨髓単球性白血病様病態の再現

本研究は、ヒト *TET2* の機能喪失型変異と *NRAS^{G12D}* 変異が如何に協調して造血器腫瘍の発生に至るのか、その分子メカニズムおよび治療標的を明らかにすることを目的とした。そのために、我々は造血系特異的な *Tet2* の欠失と *Nras^{G12D}* 変異を有する *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスを解析に使用した。マウスの作製には、インターフェロン誘導性に Cre リコンビナーゼを発現し *Tet2* 遺伝子の第 3 エクソンが相同組換えにより欠失する *Tet2^{f/f}* マウスと、同様に *Nras* 遺伝子上流の転写抑制型カセットが欠失して変異型 *Nras^{G12D}* を発現する *Nras^{+/G12D}* マウスを交配させた¹⁻²⁾。生まれてきた *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスにインターフェロンを誘導するポリイノシン・ポリシチジン酸 (poly I:C) を投与し、同一個体内で *Tet2* 欠失と変異型 *Nras^{G12D}* を誘導させ、以後定期的に末梢血の血球算定およびフローサイトメトリー解析を行った。poly I:C 投与後 3 カ月 (9 カ月齢) のマウスから末梢血を採取し、赤血球溶血後に単球系マーカー (Mac1) と顆粒球系マーカー (Gr-1) に対する抗体で染色しフローサイトメトリー解析を行った結果、野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}* マウスに比較して *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスでは末梢血中の Mac1⁺/Gr1⁺ 分画 (成熟顆粒球分画) および Mac1 単独陽性分画 (成熟単球分画) が増幅していることが明らかとなった (図 1A)。これらのマウスを殺処分し、脾臓を確認したところ、野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}* マウスに比較して *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスでは脾臓が著明に腫大していることを確認した (図 1B)。また骨髄中の造血幹細胞・前駆細胞分画 (Lineage- Sca-1⁺ c-Kit⁺、LSK 分画) が *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスにおいて有意に増幅していた (図 1C)。さらに poly I:C 投与後のマウスを長期にわたって観察したところ、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスは白血病様病態の発症により *Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}* マウスに比較して有意に全生存率が低下していることが明らかとなった (図 1D)。以上の所見から *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスはヒト若年性骨髓単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia、JMML) ・慢性骨髓単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia、CMML) 様の病態を再現しうることが示唆された。

2. *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞における MAPK、PI3K/AKT シグナルの活性化

Tet2 欠失と *Nras^{G12D}* 変異が如何に協調して血液細胞を白血病細胞へ形質転換させるのか、その詳細な分子メカニズムを明らかにするため、野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウス (白血病発症) からそれぞれ脾臓を採取し、MAPK、PI3K/AKT シグナル因子のリン酸化状態をウェスタンプロット法で解析した。その結果、野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}* 細胞に比較して *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞および移植後に白血病を発症した *Tet2^{f/f}*

Nras^{+/G12D} レシピエント細胞でリン酸化 Erk、リン酸化 Akt の著明な上昇を認めた（図 2A）。これらの脾臓細胞を用いたリン酸化フローサイトメトリー解析においてもウェスタンプロットと同様、白血病細胞が濃縮していると考えられる Mac1 陽性脾臓細胞分画において野生型、*Nras^{+/G12D}* 細胞に比較して白血病を発症した *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞で高いリン酸化 Erk、リン酸化 Akt レベルを認めた（図 2B）。一般的にサイトカインシグナルにより受容体型チロシンキナーゼが活性化すると、GDP 結合型（不活性型）Ras はグアニンヌクレオチド交換因子の働きによって GTP 結合型（活性型）Ras へ変換され、その後 MAPK シグナルや PI3K/AKT シグナルといった様々な下流シグナル経路を活性化することが知られている³⁾。一方 GTP 結合型（活性型）Ras は GTPase 活性化タンパクにより GDP 結合型（不活性型）Ras に戻される。GTP 結合型（活性型）Ras を定量解析するため、上記脾臓細胞を用いて GTP 結合型（活性型）Ras プルダウンアッセイを行った。その結果、野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}* 細胞に比較して *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞で高い GTP 結合型（活性型）Ras の発現を認めた（図 2C）。以上から、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 脾臓細胞では GTP 結合型（活性型）Ras の蓄積により、その下流シグナル経路である MAPK シグナルと PI3K/AKT シグナルが活性化していることが示唆された。

3. *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞における GM-CSF に対する感受性亢進

前述の通り、poly I:C 投与後の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスは末梢血中の骨髄単球系細胞の増幅、著明な脾腫が進行して致死性の白血病様の病態を呈することから、ヒト JMML/CMMML 様の病態を再現していることが示唆された。実際、ヒト CMMML では約 50% の症例で *TET2* の機能喪失型変異がみられることが報告されている⁴⁾。さらにヒト JMML では *NF1*、*NRAS/KRAS*、*PTPN11* や *CBL* といった RAS シグナル経路に関わる遺伝子の体細胞変異が約 90% の症例に認められ、それらの変異による RAS シグナルの活性化が病態の本質であることが明らかとなっている⁵⁾。従って、我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスがヒト JMML/CMMML 様の病態を再現しうることは、分子学的にみても道理にかなうものと考えられた。ヒト JMML では、患者から採取した血液細胞をメチルセルロース寒天培地上で培養してコロニーアッセイを行うと、骨髄系前駆細胞が GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor) に対して高い感受性を示すことが特徴の一つとされている⁶⁾。我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウス細胞も特定のサイトカインに対して高い感受性を示すのか否かを明らかにするため、野生型、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ骨髄を採取し、サイトカイン非添加無血清のメチルセルロース寒天培地に様々な濃度の GM-CSF (0ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL) を添加して、これらの骨髄細胞を 1 週間培養した。培養開始 7 日目の時点で形成されたコロニー数を測定し、各 GM-CSF 濃度で得られたコロニー数と GM-CSF 10ng/mL で得られたコロニー数の比率を比較したところ、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞は野生型、*Nras^{+/G12D}* 細胞に比較し

て低濃度の GM-CSF にも反応して相対的により多くのコロニーを形成していることが明らかとなった（図 3A、B）。同様の実験を IL-3、SCF (Stem Cell Factor)、TPO (Thrombopoietin) を用いて行ったが、これら 3 つのサイトカインに対しては野生型、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞の間でコロニー形成能に有意差はみられなかった（データ非開示）。また、サイトカイン刺激後の MAPK シグナル、PI3K/AKT シグナルの動態を明らかにするため、野生型、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞を Vehicle (賦形剤) または GM-CSF で刺激してタンパクを抽出し、Erk、Akt のリン酸化状態をウェスタンプロット法で解析した。その結果、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞では GM-CSF による刺激がない状態で（Vehicle 群において）高いリン酸化 Erk、リン酸化 Akt レベルを認めた。さらに GM-CSF で短時間刺激すると、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞では野生型、*Nras*^{+/G12D} 細胞に比べてより高いリン酸化 Erk、リン酸化 Akt の発現を認めた。以上から *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞は、GM-CSF に対して特異的に高い感受性を示すとともに、サイトカイン依存性および非依存性に MAPK シグナルと PI3K/AKT シグナルの活性化が亢進していることが示唆された。

4. *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞における Spry2 プロモーター領域の高メチル化とサイレンシング

Tet2^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞においてサイトカイン依存性および非依存性に Ras シグナルが活性化する分子メカニズムを明らかにするため、我々は Ras シグナルの負の制御因子である Dual specificity phosphatase (Dusp)/Sprouty (Spry) ファミリーに着目した。Dusp ファミリーはセリン、スレオニン、チロシン残基の脱リン酸化を担うタンパク群で構成され、主に Erk、p38、JNK などの脱リン酸化を介して MAPK シグナルを負に制御することが知られている⁹⁾。一方 Spry ファミリーは主に Ras または Raf の活性化を抑制することで受容体型チロシンキナーゼ依存性の MAPK シグナルを負に制御することが報告されている⁸⁾。まず野生型、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し、様々な Dusp/Spry ファミリー因子の発現量を RT-PCR 法で解析した。その結果、野生型、*Nras*^{+/G12D} 細胞に比べて *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞において Neurofibromin (Nf1) や複数の Dusp/Spry ファミリー因子の発現量が有意に低下していることが明らかとなった（図 4A）。このうち Spry2 は *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} 細胞において最も大きい発現量の低下を認めた。Spry2 はヒト B 細胞リンパ腫およびマウス B 細胞リンパ腫モデルにおいて、エピジェネティックなサイレンシングにより発現が抑制されており、その結果 B 細胞における MAPK シグナルの活性化と増殖能の亢進がみられることが報告されているが⁹⁾、骨髄系腫瘍においては報告がない。そこで我々は、野生型、*Tet2*^{f/f}、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し、脾臓細胞における Spry2 タンパクの発現をウェスタンプロット法で解析したところ、野生型、*Tet2*^{f/f}、*Nras*^{+/G12D} 細胞に比べて *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f}

Nras^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）の細胞において Spry2 タンパクの発現が低下していることを確認した（図 4B）。さらに Spry2 のプロモーター領域のメチル化状態を明らかにするため、脾臓細胞から DNA を抽出してバイサルファイト処理後に Spry2 プロモーターに存在する CpG アイランド領域に対してバイサルファイトシーケンスを行った。その結果、白血病発症のみられた *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞において特異的に Spry2 プロモーター領域が高メチル化していることが明らかとなった（図 4C）。また当研究室で交配、作製、解析が行われた *Tet2^{f/f} Flt3^{ITD}* 白血病モデルマウス¹⁰⁾から採取した脾臓を用いて同様のバイサルファイトシーケンスを行ったが、*Tet2^{f/f} Flt3^{ITD}* 細胞では Spry2 プロモーター領域のメチル化は認めなかった。以上から *Tet2* 欠失と *Nras^{G12D}* 変異は特異的に協調して Spry2 プロモーター領域のメチル化を引き起こし、これにより *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞においてサイトカイン依存性および非依存性に Ras シグナルが活性化することが示唆された。本仮説をさらに検証するため、我々は現在 Spry2 cDNA コンストラクトを *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞に発現させ、Ras シグナルの抑制および移植後の白血病発症が抑制されるか否かを検討する実験を進めている。

5. *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 白血病モデルにおける MEK 阻害剤の有効性

野生型、*Nras^{+/G12D}* 細胞に比べて *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞においてサイトカイン依存性および非依存性に Ras シグナルが活性化しているという結果から、我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 白血病モデルは Ras の下流シグナルのいずれかを阻害する薬剤に感受性を示すのではないかと推測された。数多くの Ras 下流シグナルの阻害剤のなかでも、MAPK シグナル阻害剤のひとつである MEK 阻害剤は *Nras^{G12D}* 変異陽性急性骨髓性白血病モデルおよび *Nf1* 欠失骨髓増殖性腫瘍モデルにおいて有効性が報告されており¹¹⁻¹²⁾、我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 白血病モデルに対しても MEK 阻害剤の有効性を検討することとした。我々の研究室と共同研究を行っている製薬企業から MEK 阻害剤である Binimetinib の提供を受け、まず白血病を発症した *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスの脾臓細胞を放射線照射後のマウスに移植し、レシピエントマウスに対して移植後 11 日目より 17 日間、Vehicle または Binimetinib (20mg/kg、BID) の経口投与による治療を行った。治療後にマウスを殺処分し脾臓を採取して観察したところ、Vehicle 治療群に比べて Binimetinib 治療群において著明な脾臓の縮小を認めた（図 5A）。また Vehicle または Binimetinib 治療後のマウス肝臓、脾臓、肺の病理所見を確認したところ、Vehicle 治療群ではいずれの臓器においても異型を示す骨髄系細胞の浸潤を認めたのに対し、Binimetinib 治療群においてはこれらの異型細胞の浸潤が消失し正常な組織構築がみされることを確認した（図 5B）。さらに同様のレシピエントマウスに対して移植後 4 日目より 10 日間、Vehicle または Binimetinib (20mg/kg、BID) の経口投与による治療を行った後、マウスを殺処分して骨髄および脾臓中のキメリズム（ドナー由来 CD45.2 陽性白血病細胞の割合）をフローサイトメトリーで解析した結果、骨髄、脾臓いずれにおいても Vehicle 治療群

に比べて Binimetinib 治療群において著明なキメリズムの低下を確認した（図 5C）。これらのマウスから骨髄を採取し、赤血球溶血後に Ki67 に対する抗体染色および DAPI 染色を行って細胞周期解析を行った結果、Vehicle 治療群に比べて Binimetinib 治療群において S/G₂/M 期（細胞増殖期）に属するドナー白血病由来の骨髄細胞の割合（CD45.2⁺ DAPI⁺ Ki67⁺細胞の割合）が有意に低下しており、一方で G₀/G₁ 期（細胞静止期）に属する同細胞の割合（CD45.2⁺ DAPI⁺細胞の割合）が有意に増加していることを確認した（図 5D）。なお Annexin V と DAPI 染色によるアポトーシス解析を行ったが、Binimetinib 治療によるアポトーシスの亢進は認めなかった（データ非開示）。最後にこれらの *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 細胞レシピエントマウスに対して移植後 19 日目より 21 日間、Vehicle または Binimetinib（20mg/kg、BID）の経口投与による治療を行い全生存曲線の解析を行ったところ、治療終了後全てのマウスが白血病発症により死亡したものの、Vehicle 治療群に比べて Binimetinib 治療群において有意な全生存期間の延長を認めた（図 5E）。以上から MEK 阻害剤の Binimetinib は我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 白血病モデルに対して全生存期間の延長を含む著明な臨床的効果を示し、少なくともその効果の一部は細胞増殖の抑制によるものと考えられた。

6. *Tet2* 欠失と *Nras^{G12D}* 変異の協調による白血病進展モデル

本研究でこれまで得られたデータをもとに、*Tet2* 欠失と *Nras^{G12D}* 変異の特異的な協調による白血病進展モデルについて考えてみたい。これまでの研究から *Tet2* は DNA のメチル化シトシン（5mC）を水酸化して 5 ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）へ変換する酵素活性を有することが知られている¹³⁾。さらに *Tet2* は 5hmC を 5 フォルミルシトシン（5fC）、5 カルボキシルシトシン（5caC）へ変換し、最終的に 5caC は塩基除去修復反応によりシトシン（C）へ脱メチル化されることが報告されており¹⁴⁾、*Tet2* は DNA の脱メチル化を介して様々な遺伝子発現制御に関わっていると推測されている。*Tet2* を欠失したマウスでは、造血幹細胞・前駆細胞の増幅と自己複製能の亢進がみられ、*Tet2* を欠失した造血クローニーは骨髄内で増幅することにより造血器腫瘍の発生母地となりうると考えられている^{1, 15-16)}。以上から *Tet2* を欠失した（ヒトの場合は *TET2* の機能喪失型変異が生じた）未分化な造血クローニーにおいて、*Spry2* を含む様々な遺伝子プロモーター領域が高メチル化状態となり、これらの多様な高メチル化状態を呈する造血クローニーが骨髄や脾臓において増幅すると考えられる（図 6）。増幅した *Tet2* 欠失クローニーにおいて *Nras^{G12D}* 変異が加わると、多様な高メチル化状態を呈するクローニーのなかでも特に *Spry2* プロモーターが高メチル化してサイレンシングを起こしているクローニー（*Spry2* 高メチル化クローニー）において Ras シグナルが活性化して、その結果 *Spry2* 高メチル化クローニーが選択的に増幅して白血病進展に寄与すると考えられる（図 6）。本モデルをさらに検証するため、我々の *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* 白血病モデルおよびヒト急性骨髓性白血病細胞株を用いて、*Spry2* の Ras シグナル抑制効果や白血病発症抑制効果を検討していく予定である。

(参考文献)

1. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih AH, et al: *Tet2* loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20: 11-24, 2011
2. Li Q, Haigis KM, McDaniel, et al: Hematopoiesis and leukemogenesis in mice expressing oncogenic *Nras*^{G12D} from the endogenous locus. *Blood* 117: 2022-2032, 2011
3. Schubbert S, Shannon K, Bollag G: Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 295-308, 2007
4. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, et al: *TET2* gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 94: 1676-1681, 2009
5. Chang TY, Dvorak CC, Loh ML: Bedside to bench in juvenile myelomonocytic leukemia: insights into leukemogenesis from a rare pediatric leukemia. *Blood* 124: 2487-2497, 2014
6. Emanuel PD, Bates LJ, Castleberry RP, et al: Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 77: 925-929, 1991
7. Murphy T, Hori S, Sewell J, et al: Expression and functional role of negative signalling regulators in tumour development and progression. *Int J Cancer* 127: 2491-2499, 2010
8. Edwin F, Anderson K, Ying C, et al: Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease. *Mol Pharmacol* 76: 679-691, 2009
9. Frank MJ, Dawson DW, Bensinger SJ, et al: Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood* 113: 2478-2487, 2009
10. Shih AH, Jiang Y, Meydan C, et al: Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 27: 502-515, 2015
11. Burgess MR, Hwang E, Firestone AJ, et al: Preclinical efficacy of MEK inhibition in *Nras*-mutant AML. *Blood* 124: 3947-3955, 2014
12. Chang T, Krisman K, Theobald EH, et al: Sustained MEK inhibition abrogates myeloproliferative disease in *Nf1* mutant mice. *J Clin Invest* 123: 335-339, 2013
13. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930-935, 2009
14. Ito S, Shen L, Dai Q, et al: Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333: 1300-1303, 2011
15. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al: TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20: 25-38, 2011

16. Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M, et al: Tet2 disruption leads to enhanced self-renewal and altered differentiation of fetal liver hematopoietic stem cells. *Sci Rep* 2: 273, 2012

図説

図 1

- (A) 野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスにそれぞれポリinosin・poly I:C 投与後、3カ月時点の末梢血フローの解析結果を示す。(解析時のマウスは9カ月齢) 末梢血を採取して赤血球を溶血させ、单球系マーカー(Mac1)と顆粒球系マーカー(Gr-1)に対する抗体で染色した。
- (B) Poly I:C 投与後3カ月時点(9カ月齢)における、各遺伝子型マウスの脾臓所見を示す。
- (C) Poly I:C 投与後3カ月時点(9カ月齢)における、各遺伝子型マウスの骨髓有核細胞中の LSK 細胞の割合を示す。データは各遺伝子型マウスを3匹ずつ使用して得た。統計解析は T 検定を使用した。
- (D) *Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスの全生存曲線を示す。

図 2

- (A) 野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウス(白血病発症)からそれぞれ脾臓を採取し、脾臓細胞からタンパクを抽出したのち、Erk、リン酸化 Erk、Akt、リン酸化 Akt、Vinculin(ローディングコントロール)に対する抗体を使用して行ったウェスタンプロットの結果を示す。
- (B) 野生型、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}*(白血病発症前)、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウス(白血病発症後)の脾臓細胞を使ったリン酸化フローの解析結果を示す。各遺伝子型マウスから脾臓を採取して赤血球を溶血させ、Mac1、リン酸化 Erk、リン酸化 Aktに対する抗体で染色した。
- (C) 野生型、*Tet2^{f/f}*、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* マウスからそれぞれ脾臓を採取し、脾臓細胞からタンパクを抽出したのち Ras に対する抗体を使用して行った GTP 結合型(活性化型) Ras プルダウンアッセイの結果を示す。

図 3

- (A) 野生型、*Nras^{+/G12D}*、*Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウス(白血病発症)からそれぞれ骨髄を採取し、サイトカイン非添加無血清のメチルセルロース寒天培地上に様々な濃度の GM-CSF(0 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL)を加え骨髄細胞を培養して得られたコロニー数の比率を示す。データは各 GM-CSF 濃度群で3枚ずつ培養皿を使用して得た。統計解析は T 検定を使用した。(培養開始7日目に各 GM-CSF 濃度群における骨髄細胞 10000 個あたりのコロニー数を GM-CSF 10ng/mL 群のコロニー数で除した比率)
- (B) (A)の実験で得られたコロニーの写真を示す。(培養開始7日目に GM-CSF 1ng/mL 群で得られたコロニー)

(C) 野生型、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し、Vehicle（賦形剤）または GM-CSF 10ng/mL を添加した無血清培養液中で脾臓細胞を 15 分間培養しタンパクを抽出したのち、Erk、リン酸化 Erk、Akt、リン酸化 Akt、Vinculin（ローディングコントロール）に対する抗体を使用して行ったウェスタンプロットの結果を示す。

図 4

- (A) 野生型、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し脾臓細胞から RNA を抽出したのち、様々な Ras シグナルの負の制御因子（Dusp/Spry ファミリー）の発現量を RT-PCR 法で解析した結果を示す。データは 3 回の独立した実験結果から得た。統計解析は T 検定を使用した。
- (B) 野生型、*Tet2*^{f/f}、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し、脾臓細胞からタンパクを抽出したのち、Spry2、Vinculin（ローディングコントロール）に対する抗体を使用して行ったウェスタンプロットの結果を示す。
- (C) 野生型、*Tet2*^{f/f}、*Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D}、*Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウス（白血病発症）、*Tet2*^{f/f} *Flt3*^{ITD} レシピエントマウス（白血病発症）からそれぞれ脾臓を採取し、脾臓細胞から DNA を抽出してバイサルファイト処理後に Spry2 プロモーターに存在する CpG アイランド領域に対してバイサルファイトシーケンスを行った結果を示す。

図 5

- (A) 移植後に白血病を発症した *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウスから脾臓を採取し、致死線量の放射線照射後のマウスに脾臓細胞を移植した。（1 匹あたり脾臓細胞 5000 個）移植後 11 日目より 17 日間、Vehicle または Binimetinib（20mg/kg、BID）経口投与による治療後のレシピエントマウス脾臓所見を示す。（コントロールとして同週齢の野生型マウスの脾臓所見も示した）
- (B) (A)で記した Vehicle または Binimetinib 治療後のマウスの肝臓、脾臓、肺の病理所見を示す。
- (C) 移植後に白血病を発症した *Tet2*^{f/f} *Nras*^{+/G12D} レシピエントマウスから脾臓を採取し、致死線量の放射線照射後のマウスに脾臓細胞を移植した。（1 匹あたり脾臓細胞 2X10⁶ 個）移植後 4 日目より 10 日間、Vehicle または Binimetinib（20mg/kg、BID）経口投与による治療後のレシピエントマウス骨髄および脾臓のキメリズム（CD45.2 陽性細胞の割合）を示す。統計解析は T 検定を使用した。（Vehicle 治療群；N=3、Binimetinib 治療群；N=3）
- (D) (C)で記した Vehicle または Binimetinib 治療後のマウスから骨髄を採取して赤血球を溶血させ、Ki67 に対する抗体染色および DAPI 染色を行って

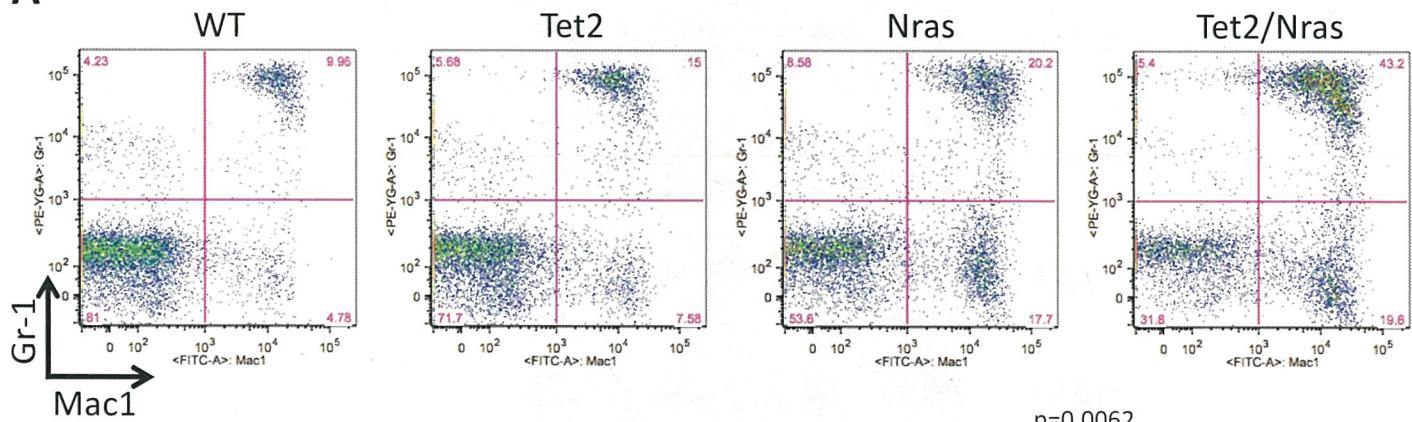
細胞周期解析を行った結果を示す。統計解析は T 検定を使用した。
(Vehicle 治療群 ; N=3、Binimetinib 治療群 ; N=3)

- (E) 移植後に白血病を発症した *Tet2^{f/f} Nras^{+/G12D}* レシピエントマウスから脾臓を採取し、致死線量の放射線照射後のマウスに脾臓細胞を移植した。（1匹あたり脾臓細胞 5000 個）移植後 19 日目より 21 日間、Vehicle または Binimetinib (20mg/kg、BID) 経口投与による治療を行った際の全生存曲線を示す。統計解析はログランク検定を使用した。（Vehicle 治療群；N=6、Binimetinib 治療群；N=6）

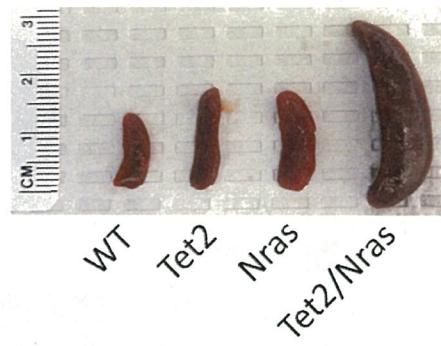
図 6

Tet2 欠失と恒常活性型 *Nras* 変異の協調による白血病進展モデルの模式図を示す。最初に未分化な血液細胞クローンに *Tet2* 欠失（ヒトの場合は *TET2* の機能喪失型変異）が生じると、様々な遺伝子のプロモーター領域がランダムに高メチル化状態となる。この状態を「エピゲノム不均一性」と呼ぶこととする。このエピゲノムの不均一なクローン集団のなかに、*Spry2* プロモーター領域の高メチル化状態を示すクローンが存在すると推定される。この *Spry2* プロモーター領域高メチル化クローンに恒常活性型 *Nras* 変異が加わると、このクローンにおいて特異的に Ras シグナル経路の活性化が引き起こされ、本クローンが選択的に増幅して白血病進展に寄与する。

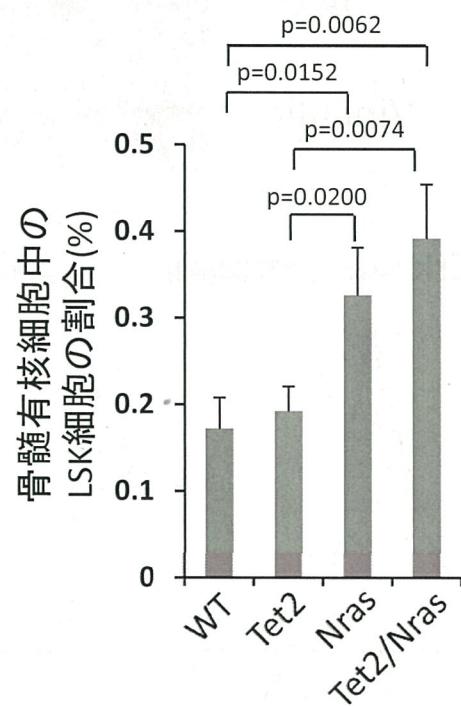
A



B



C



D

Survival proportions: Survival of mx nras tet2

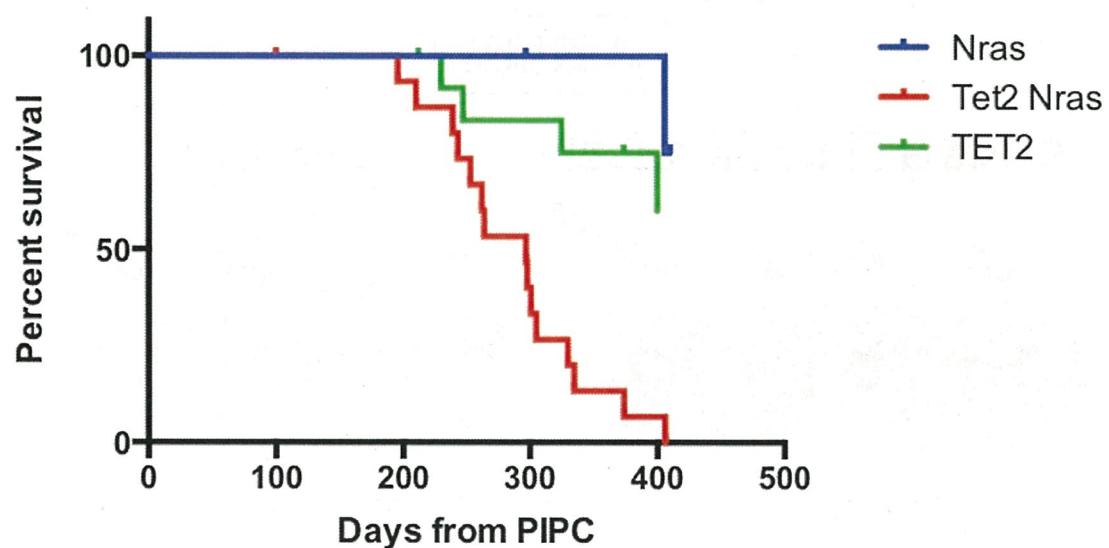
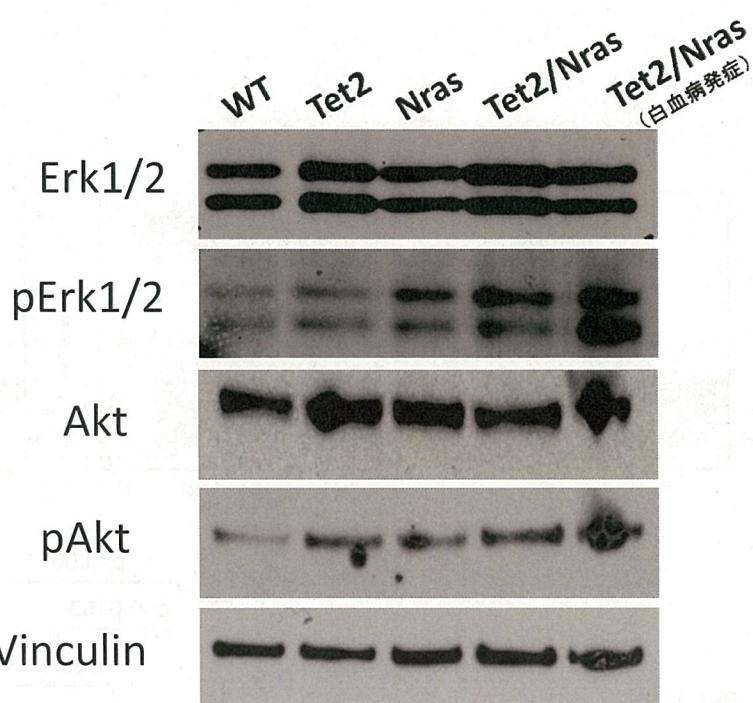
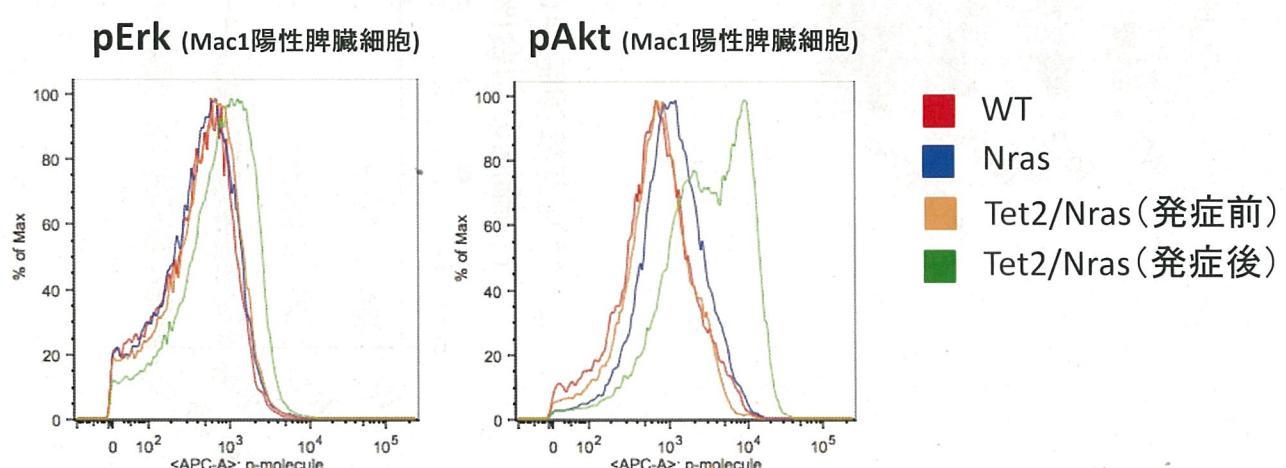


図2

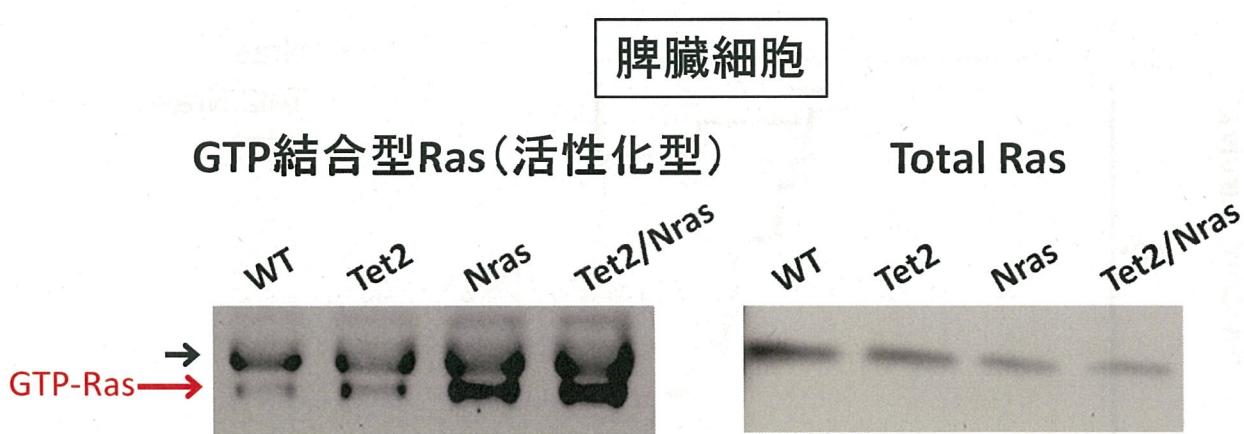
A



B



C



A

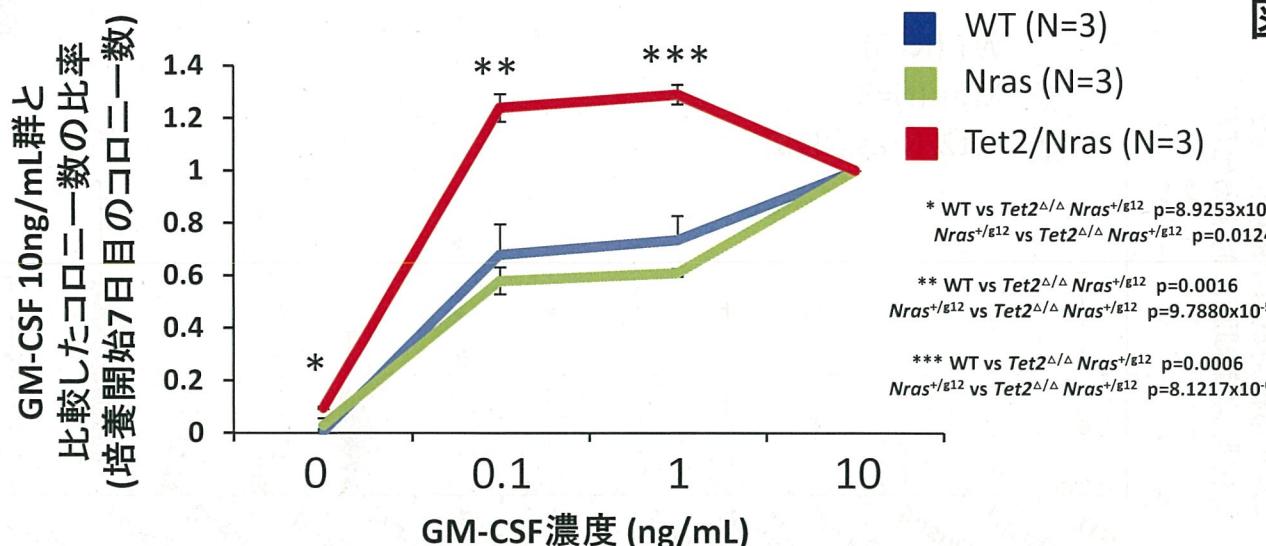
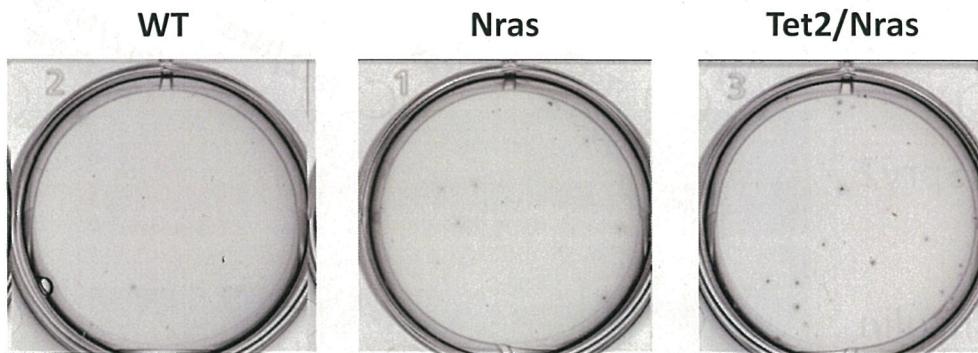


図3

B

メチルセルロース寒天培地上のコロニー (GM-CSF 1ng/mL)



C

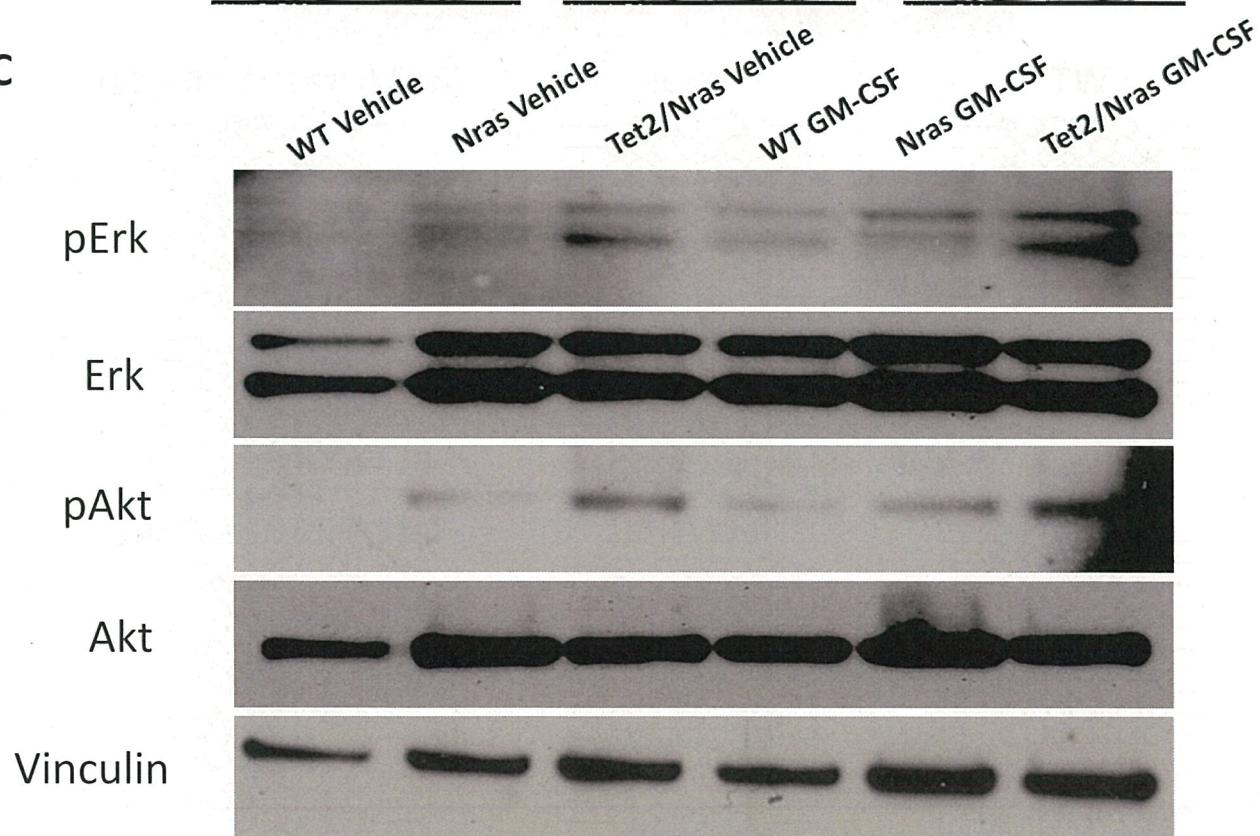


図4

A ハウスキーピング遺伝子(Gapdh又はActin)に対する相対的なmRNA発現量(野生型脾臓細胞に対する比率)

WT (N=3)
Nras (N=3)
Tet2/Nras (N=3)

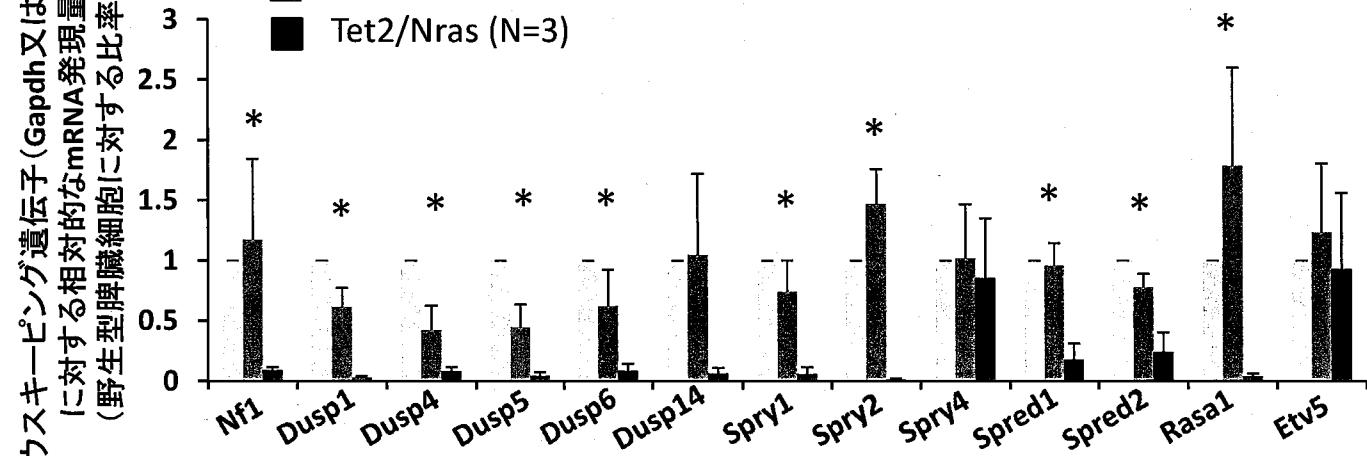
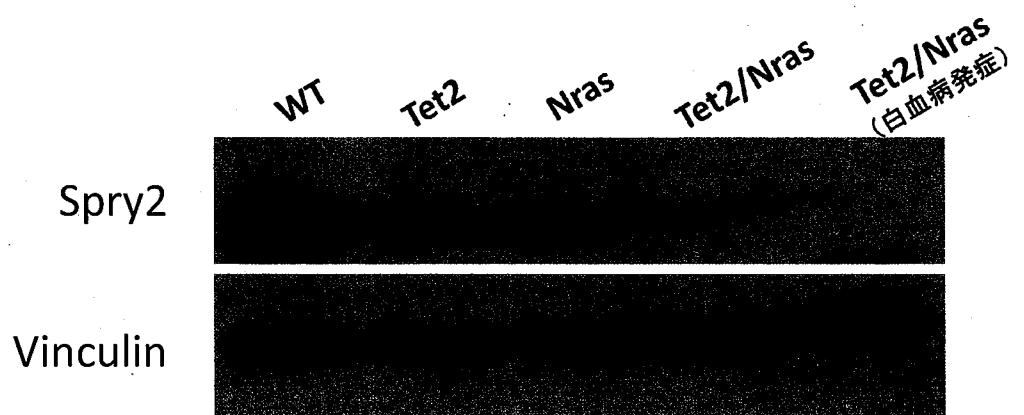
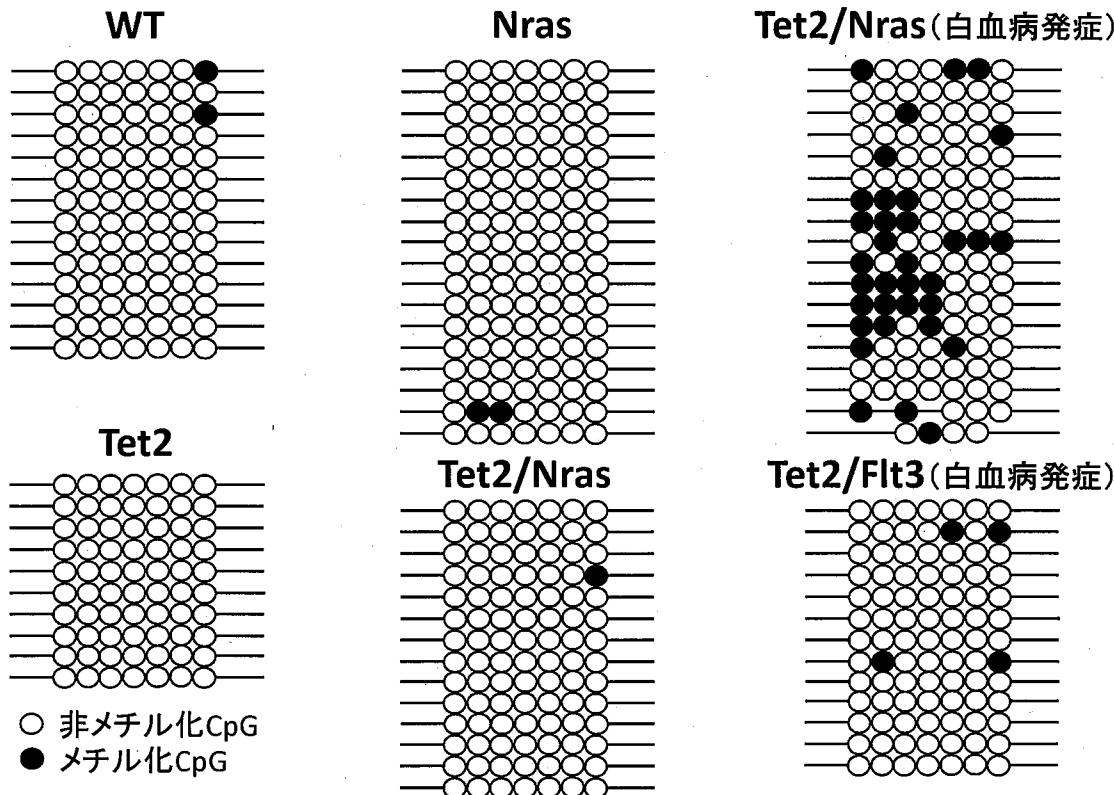
**B****C**

図5

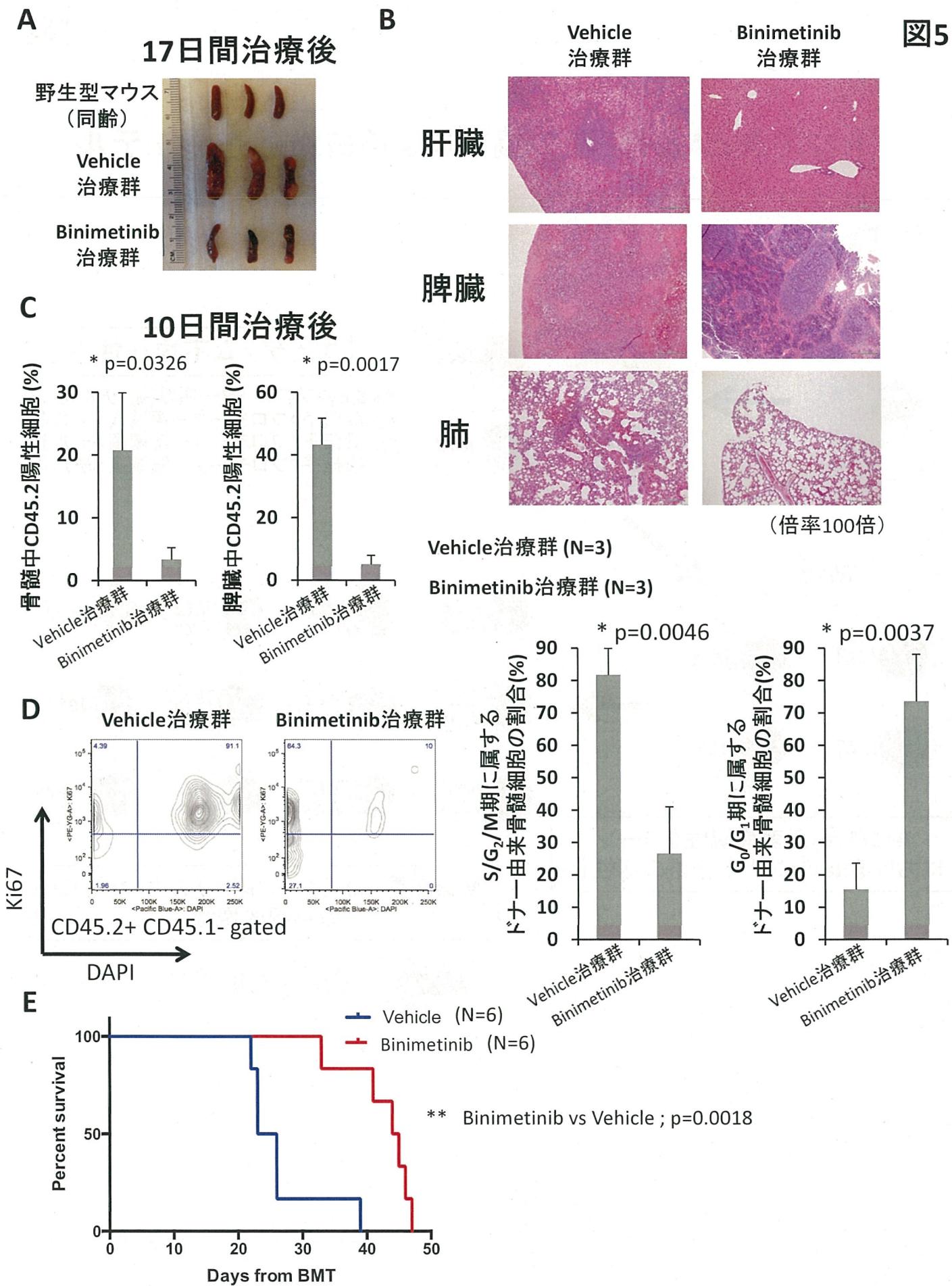


図6

Tet2欠失とNras変異の協調による白血病進展モデル

