

【目的】2009年にAMLを始めとする広範な血液腫瘍において機能喪失型のTET2変異が初めて同定され、その後高齢者に多く白血病へ進展しやすいクローン造血においても高率にTET2変異が同定された。これまでの我々の研究から、TET2の機能喪失は造血幹細胞または前駆細胞を増殖させて前白血病状態であるクローン造血を直接的に引き起こすことが明らかとなったが、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。最近の研究により、*Tet2*欠失骨髄マクロファージは炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ を産生して炎症を惹起することが明らかとなった。そこで、まずは*Tet2*欠失造血幹細胞の幹細胞機能に対するIL-1 $\beta$ シグナルの影響を解析し正常造血幹細胞の挙動との違いを明らかにすることを目的に研究を行った。また血球系列特異的*Tet2*欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を伴う慢性骨髄単球性白血病様の病態を呈することから、TET2の機能喪失は骨髄単球系へ分化を誘導すると考えられる。そこで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)などの骨髄単球系サイトカインに対する*Tet2*欠失細胞の挙動を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】IL-1 $\beta$ を含む炎症性サイトカインあるいは骨髄単球系サイトカインの*Tet2*欠失造血幹細胞機能に与える影響を明らかにするため、まず炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN $\gamma$ )あるいは骨髄単球系サイトカイン(G-CSF、M-CSF、GM-CSF)存在下で野生型または*Tet2*欠失骨髄細胞をメチルセルロース軟寒天培地で継代培養し、各継代で形成されたコロニー数及び継代培養可能回数を比較した。骨髄単球系サイトカインのうちGM-CSFについては、GM-CSF刺激による*Tet2*欠失造血幹細胞の骨髄単球系への分化、アポトーシス、細胞周期に与える影響を明らかにするため、GM-CSF存在下で培養後の野生型または*Tet2*欠失骨髄細胞を用いて、フローサイトメトリーによる細胞表面形質解析、Annexin V/DAPI染色によるアポトーシス解析、およびKi67/DAPI染色による細胞周期解析を行った。さらに、野生型または*Tet2*欠失骨髄系前駆細胞の細胞表面におけるGM-CSF受容体 $\alpha$ 鎖の発現を比較するため、抗GM-CSFR $\alpha$ 抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

【結果】賦形剤またはIL-1 $\beta$ を25 ng/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 $\beta$ 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。一方、GM-CSF(10 ng/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のに対し、*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。GM-CSF存在下で野生型または*Tet2*欠失骨髄細胞を培養すると、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。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。

#### GM-CSFを介した*Tet2*変異陽性クローン造血・白血病の発症モデル

