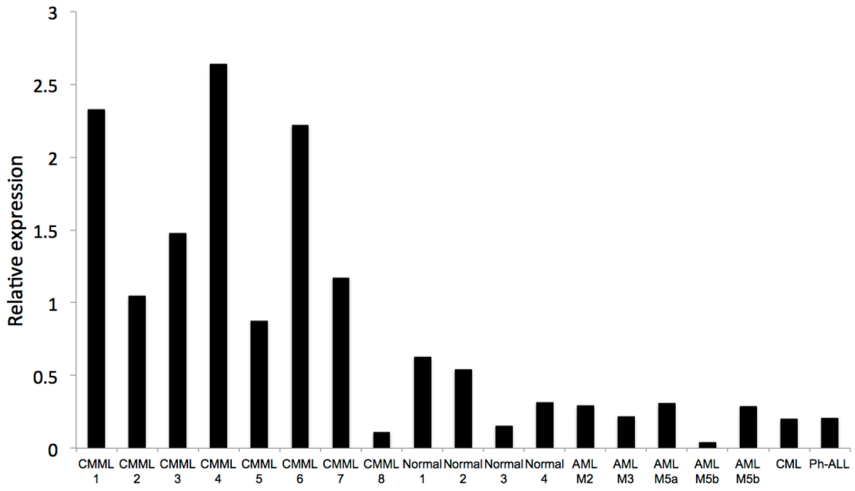
74　難治性白血病の分化異常を標的とした治療法の開発	黒川　峰夫

【目的】慢性骨髄単球性白血病（CMML）は難治性の血液がんであり、効果的な治療法開発に至る適切な病態モデルが存在しない。われわれは疾患特異的 iPS 細胞化技術を活用してヒト CMML 疾患モデルを構築し、マルチオミクス解析から病態候補遺伝子である *SLITRK4*（SLIT and NTRK like family member 4）を同定した。本研究の目的は、*SLITRK4* の機能や制御遺伝子群について解析し、これまで未解明であった CMML の発症および分化異常の制御に関わる機構を解明し、新規治療薬の開発につなげることである。

【方法】ヒト臨床検体を用いて *SLITRK4* の発現量について確認した。正常骨髄マウス細胞、ヒト白血病細胞株に SLITRK4 を過剰発現させ、増殖能、形態、シグナル伝達経路の活性度について評価した。また、CMML 細胞由来 iPS 細胞、正常骨髄細胞由来 iPS 細胞それぞれについて、RNA 干渉による転写抑制実験を通じて血球分化に及ぼす影響を解析した。

【結果】正常マウスの骨髄より採取した幼若造血細胞に SLITRK4 を過剰発現させメソカルトで培養したが、コロニー形成能、形態、細胞表面抗原についていずれも変化は見られなかった。また、ヒト白血病細胞において SLITRK4 を過剰発現させ、いくつかのリン酸化シグナル経路について評価したが有意な差は認めなかった。iPS 細胞を血球分化させ、造血前駆細胞（HPC）に *SLITRK4* の shRNA を導入し転写を抑制させると、正常骨髄細胞由来 HPC ではノックダウンの効果がほとんど見られなかったのに対して、CMML 由来 HPC ではコロニー形成能が落ちることを確認した。

ヒト検体での *SLITRK4* の発現量



74. 難治性白血病の分化異常を標的とした治療法の開発

黒川　峰夫

東京大学 大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学

Key words：慢性骨髄単球性白血病，iPS 細胞，標的治療

緒　言

慢性骨髄単球性白血病（CMML）は、病態について未解明な部分が多く、効果的な治療法が確立していない予後不良の疾患である。 CMML は単クローン性の造血幹細胞腫瘍であり、骨髄異形成（MDS）/骨髄増殖性腫瘍（MPN）に分類される。その主な特徴は、末梢血中の単球増加・顆粒球系細胞の異形成といった血球の分化異常と、急性白血病への進展などである。しかしながら、その病態について未解明な部分が多く、造血幹細胞移植以外に CMML に対する効果的な治療法は確立していない。

造血器腫瘍の病態解明と治療法探索にはこれまで主に細胞株・マウスモデル・患者検体が使われてきたが、それぞれに問題点があり十分な病態解明に至っていない。まず、細胞株については MDS/MPN に分類されるものが存在しない。次にマウスモデルについては、これまで Nras、Kras 変異のノックインマウス［1，2］、NF1 のコンディショナルノックアウトマウス［3］、Notch シグナルの不活性化マウスにより進行性の MPN モデル、CMML モデルが作製された報告があるが［4］、必ずしもヒトと同じ遺伝子発現プロファイルが再現されないことから、マウスモデル単独の解析では、病態解明・治療開発に限界があると考えられる。最後に、患者検体は細胞株やマウスモデルの欠点を克服できるものの、細胞数に限りがあり網羅的な遺伝子解析や薬剤スクリーニング、繰り返しの実験を行うことは困難である。

従来の病態モデルの限界を打破し CMML の病態を明らかにするために、われわれは iPS 細胞化技術を活用し、ヒト CMML 疾患モデルを構築した。CMML 患者の骨髄検体より世界に先駆けて CMML 細胞由来 iPS 細胞（CMML-iPSC）を樹立し、*in vitro* および *in vivo* で CMML の病態を反映することを明らかにした。同時に、CMML-iPSC 由来疾患モデルを用いて、従来極めて困難であったヒト CMML 細胞でのマルチオミクス解析を行い、CMML の病態遺伝子候補である *SLITRK4*（SLIT and NTRK like family member）を同定した。CMML-iPSC において *SLITRK4* をノックアウトしたところ、CD34 陽性 CD43 陽性造幹・前駆細胞の分化効率が著明に減少することを見出した。この結果から、*SLITRK4* は CMML の病態形成における鍵遺伝子であるとともに、*SLITRK4* およびその関連遺伝子が有望な治療方法であることが強く示唆される。

本研究開発の目的は、iPS 細胞化技術を用いて確立した CMML 疾患モデルより同定した CMML 病態遺伝子候補 *SLITRK4* を解析し、これまで未解明であった CMML の発症および分化異常の制御に関わる機構を解明し、新規治療薬を開発につなげることである。

方　法

1. ヒト検体における *SLITRK4* の発現量

定量 PCR 法を用いて、CMML と正常骨髄、その他の白血病における CD34 陽性細胞における *SLITRK4* の発現量を調べた。

2. 正常マウスを用いた SLITRK4 の機能解析

SLITRK4 の白血病発症や分化異常に与える影響を検証するために、正常マウスの骨髄より採取した幼若造血細胞にレトロウイルスベクターで SLITRK4 を導入した。半固形培地で培養し、コロニー形成能や長期間増殖能の変化を調べた。また、細胞形態を観察し、表面抗原の解析を行った。

3. SLITRK4 下流シグナルの探索

OCI-AML3 は *SLITRK4* のノックダウンにより細胞増殖能が低下することをすでに示している。また、SLITRK4 は細胞内ドメインにチロシン残基を有することから、MAPK 経路、PI3K/Akt 経路などのリン酸化シグナル経路の活性度について違いがないかをウエスタンブロット法により評価した。また、*SLITRK4* の発現量の低いヒト白血病細胞株を用いて SLITRK4 を過剰発現させ、同じようにリン酸化シグナル経路の活性度について評価した。

4. iPS 細胞を用いた SLITRK4 の機能解析

RNA 干渉による転写抑制が血球分化に及ぼす影響を解析した。iPS 細胞において shRNA を導入した場合、細胞毒性の影響で評価できなかったため、iPS 細胞を Sac 法により血球分化させた後に shRNA を導入し、CD34 陽性 CD43 陽性分画の造血前駆細胞においてコロニー形成能を評価した。

結　果

1. ヒト検体における *SLITRK4* の発現量

ヒト CMML 検体での *SLITRK4* の発現量が正常骨髄、その他の白血病と比較して高いことを確認した（図 1）。

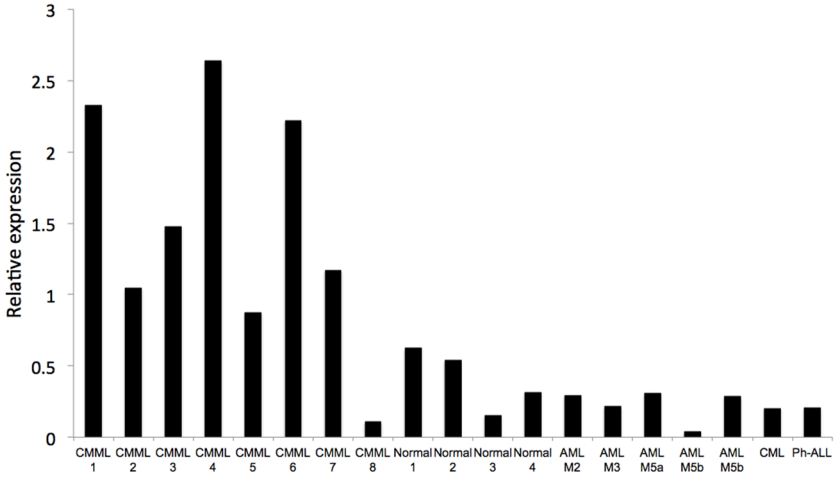


図 1.　ヒト臨床検体での *SLITRK4* の発現量

ヒト臨床検体（CMML 8 例、正常骨髄 4 例、その他白血病 7 例）の CD34 陽性細胞の *SLITRK4* の発現量を調べた。CMML において、正常骨髄と比較して *SLITRK4* の発現量が高かった（ウェルチの検定 $p = 0.009$）。

2. 正常マウスを用いた SLITRK4 の機能解析

正常マウス骨髄の幼若造血細胞に SLITRK4 を過剰発現させメソカルトで培養したが、コロニー形成能、形態、細胞表面抗原についていずれも変化は見られなかった（図 2）。

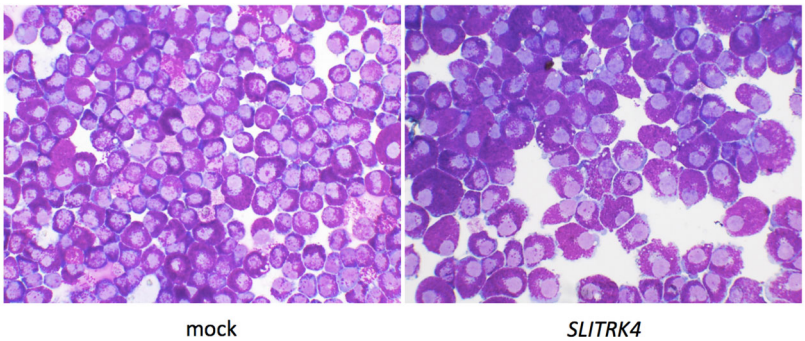


図 2.　正常マウス骨髄での SLITRK4 高発現の形態に与える影響

正常マウス骨髄においてヒト SLITRK4 を高発現させたが、形態に変化は見られなかった。

3. SLITRK4 下流シグナルの探索

ヒト白血病細胞株 OCI-AML3、THP1 において *SLITRK4* の発現を抑制させ、MAPK 経路、Akt 経路の活性度について評価したが、いずれも変化は見られなかった（図 3）。また、*SLITRK4* の発現量の低い HEL 細胞を用いて SLITRK4 を過剰発現させたが、増殖能に違いは見られなかった（図 4）。同様に主要なリン酸化経路の活性度に違いは見られなかった。

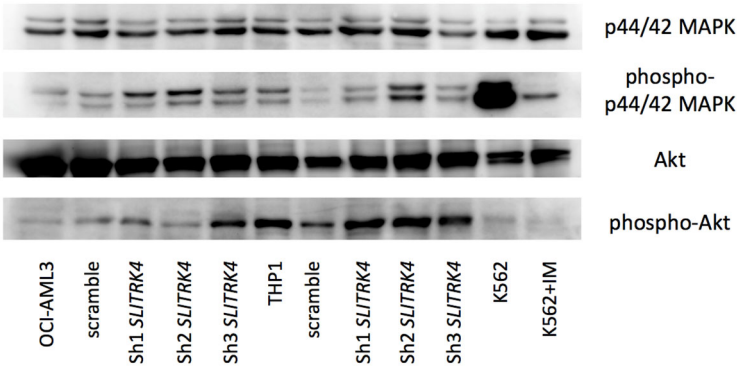


図 3. *SLITRK4* の発現抑制によるリン酸化シグナルへの影響
ヒト白血病細胞株において *SLITRK4* の発現を抑制させ、MAPK 経路、Akt 経路についてリン酸化シグナルの活性度の変化を調べたが変化は認めなかった。

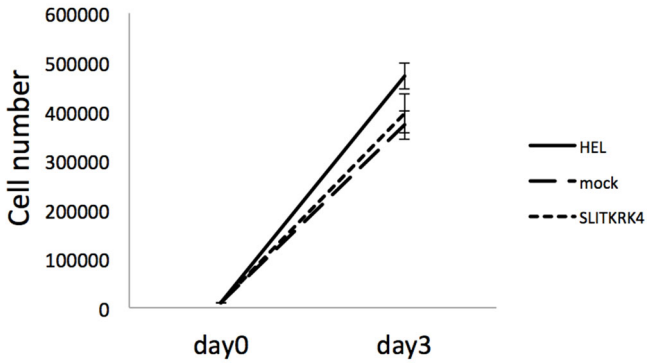


図 4. ヒト白血病細胞株での SLITRK4 高発現の増殖に与える影響
SLITRK4 の発現量の低いヒト白血病細胞株 HEL において、SLITRK4 を高発現させ、増殖能について調べたが変化を認めなかった（対応のある t 検定 $p = 0.74$）。

4. iPS 細胞を用いた SLITRK4 の機能解析

CMML-HPC、Normal-HPC それぞれにおいて、*SLITRK4* の発現を抑制してコロニー形成能を調べたところ、CMML のみでコントロールと比較してコロニー形成能が落ちた（図 5）。

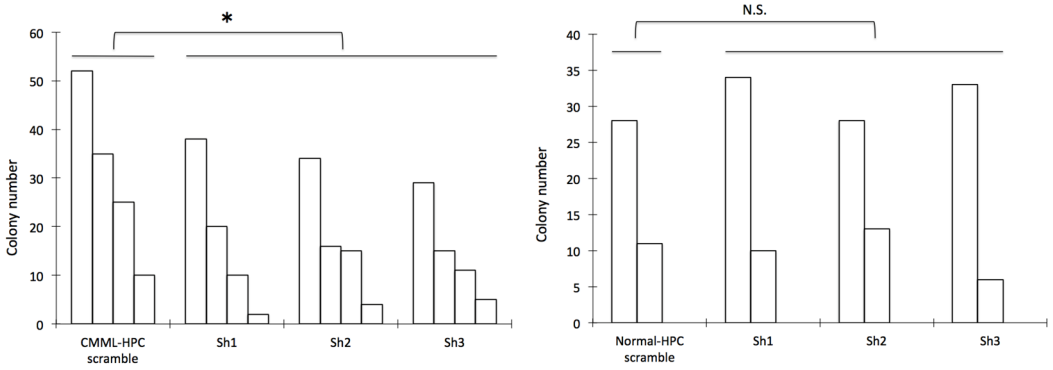


図 5. *SLITRK4* の発現抑制による HPC のコロニー形成能

CMML-HPC、Normal-HPC に Sh SLITRK4 を導入し、コロニー形成能を調べた。CMML-HPC ではコントロールと比較して、発現抑制によりコロニー形成能が落ちたが、Normal-HPC では変化が見られなかった（対応のある t 検定 CMML-HPC p = 0.005(Sh1)、0.024(Sh2)、0.03(Sh3)、Normal-HPC p = 0.53(Sh1)、0.42(Sh2)、1(Sh3)）。

考　察

本研究では難治性の血液がんである CMML に対して、新たな疾患モデルを駆使して同定した病態候補遺伝子 *SLITRK4* を手掛かりに、これまで未解明であった CMML の発症および分化異常の制御に関わる機構の解析を進めた。

ヒト臨床検体を用いた解析において CMML は正常対照群と比べ *SLITRK4* が高発現であることを見出すとともに、CMML-HPC を用いた *SLITRK4* の発現抑制時のコロニー形成能評価において、Normal-HPC と比較してコロニー形成能の減弱することを見出した。これらの結果は、SLITRK4 が CMML に特異的かつ正常との window を有した治療標的として有望であることを示唆している。

一方で、SLITRK4 の制御シグナルを検索するために正常マウス骨髄における SLITRK4 の強制発現を行ったところ形態学的変化は認めなかった。さらに、SLITRK4 を強制発現した白血病細胞株におけるリン酸化シグナル評価においては有意な変化を見出すに至らなかった。

本研究の結果、SLITRK4 の CMML に対する治療標的としての有効性についてさらなる知見を積み上げることができた。今後、SLITRK4 の制御する下流シグナルおよび制御遺伝子群の検索を継続することで、標的治療の最適化を図り、CMML の克服する新規治療薬の開発を推進していく。

文　献

1） Wang J, Liu Y, Li Z, Wang Z, Tan LX, Ryu MJ, Meline B, Du J, Young KH, Ranheim E, Chang Q, Zhang J. Endogenous oncogenic Nras mutation initiates hematopoietic malignancies in a dose- and cell type-dependent manner. Blood. 2011 Jul 14;118(2):368-79. Epub 2011 May 17. PMID:21586752 DOI:10.1182/blood-2010-12-326058.

2) Lyubynska N, Gorman MF, Lauchle JO, Hong WX, Akutagawa JK, Shannon K, Braun BS. A MEK inhibitor abrogates myeloproliferative disease in Kras mutant mice. Sci Transl Med. 2011 Mar 30;3(76):76ra27. PMID:21451123 DOI:10.1126/scitranslmed.3001069.

3) Chang T, Krisman K, Theobald EH, Xu J, Akutagawa J, Lauchle JO, Kogan S, Braun BS, Shannon K. Sustained MEK inhibition abrogates myeloproliferative disease in Nf1 mutant mice. J Clin Invest. 2013 Jan;123(1):335-9. Epub 2012 Dec 10. PMID:23221337 DOI:10.1172/JCI63193.

4) Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle I, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E, Liu C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Efstratiadis A, Taghon T, Michor F, Levine RL, Aifantis I. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. Nature. 2011 May 12;473(7346):230-3. PMID:21562564 DOI:10.1038/nature09999.