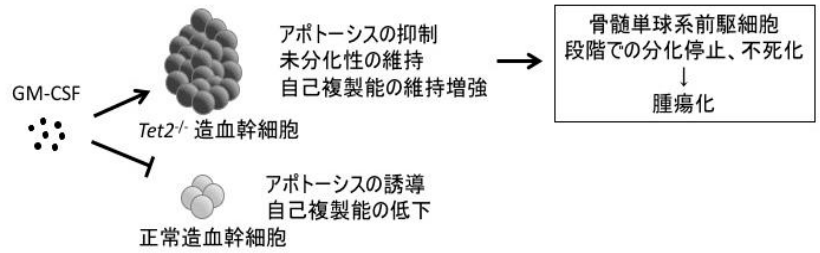
171　クローン造血制御を介した新規白血病予防法の創成	國本　博義

【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-1β 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-1β 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列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 stimulationg 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-1β 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-1β、IL-6、IFNγ）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列への分化、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* 欠失骨髄球系前駆細胞の細胞表面における GM-CSF 受容体 α 鎖の発現を比較するため、抗 GM-CSFRα 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-1β 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-1β 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）を添加した場合では、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



171. クローン造血制御を介した新規白血病予防法の創成

國本　博義

横浜市立大学 医学部 血液・免疫・感染症内科

Key words：クローン造血，TET2，炎症性サイトカイン，GM-CSF

緒　言

急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia：AML）は抗がん剤と骨髄移植を組み合わせた治療が行われるが、未だ 50%以上の例で治療後再発がみられ、現在の治療では治癒を見込めない患者にも有効な治療法の開発が急務である。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［1］、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。発見以来現在までに 1,600 件近くの関連論文が報告され、世界中で活発に研究されている TET2 であるが、これまで我々は *Tet2* 欠失マウスを用いた解析を行い、造血幹細胞機能（自己複製能）の亢進から *Tet2* 欠失血球クローンが骨髄内で増殖し、Tet2 の機能喪失が血球クローンの増幅拡大に寄与することを明らかにした［2，3］。また造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）からやや分化した造血前駆細胞は自己複製能を失っているとされるが、*Tet2* 欠失骨髄球前駆細胞は *in vitro* 培養系においてコロニー継代能が亢進しており、自己複製能を獲得していることを我々は報告した［4］。さらに *Tet2* を欠失した血液細胞に NrasG12D 変異が加わると Ras 下流で働く Mapk シグナルの相乗的な活性化　がみられマウス生体内で致死的な白血病を発症することを我々は報告した［5］。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-1β を産生して炎症を惹起することが明らかとなった［6］。持続的な IL-1β 刺激は正常造血幹細胞の骨髄球系への分化を促進する代わりに幹細胞機能を低下させることが知られているが［7］、*Tet2* 欠失造血幹細胞はマクロファージが骨髄内で IL-1β を産生するにも関わらず幹細胞機能が亢進して骨髄内で増殖作用を示す［2，4］。以上から、我々は *Tet2* 欠失骨髄マクロファージが産生する IL-1β 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いう仮説モデルを考えるに至った。本研究では上記仮説を検証するために、まずは *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能に対する IL-1β 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とした。

方法および結果

1.　IL-1β 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-1β 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-1β シグナルの影響を調べた。賦形剤または IL-1β 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-1β 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-1β 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。なお同じ炎症性サイトカインでも IL-6 は 25 ng/mL の濃度で慢性刺激下でも *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能は

維持され、IFNγは 100 ng/mL の慢性刺激では IL-1β と同じく *Tet2* 欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった（図 1）。

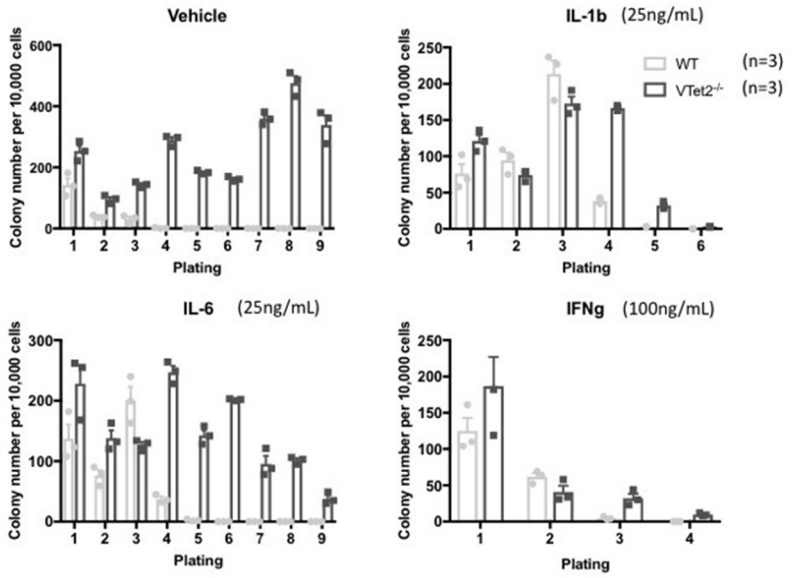


図 1. IL-1β は *Tet2* 欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しない
記載のサイトカイン存在下で野生型（WT）または *Tet2* 欠失（VTet2$^{-/-}$）骨髄細胞 10,000 個培養した際に形成されたコロニー数。横軸は継代培養回数を示す。

2. *Tet2* 欠失造血幹前駆細胞は GM-CSF 刺激に対して未分化性を維持する

ヒト *TET2* 変異は造血器腫瘍の中でも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［8］、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［9］、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列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 stimulationg 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。

そこで我々は、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（10 ng/mL）を添加した場合では、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）。以上より我々は、骨髄単球系サイトカイン GM-CSF が *Tet2* 欠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、我々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 10 ng/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。

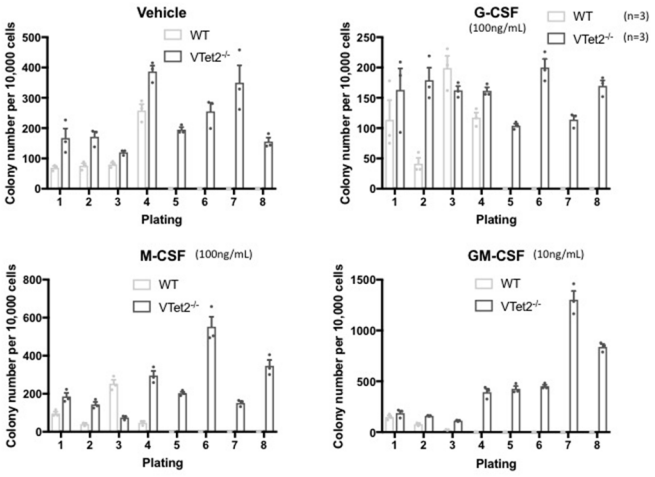


図 2. *Tet2* 欠失細胞は GM-CSF 慢性刺激で継代培養能が維持され、細胞増殖能が増強する
記載の骨髄単球系サイトカイン存在下で野生型（WT）または *Tet2* 欠失（VTet2$^{-/-}$）骨髄細胞 10,000 個を培養した際に形成されたコロニー数。横軸は継代培養回数を示す。

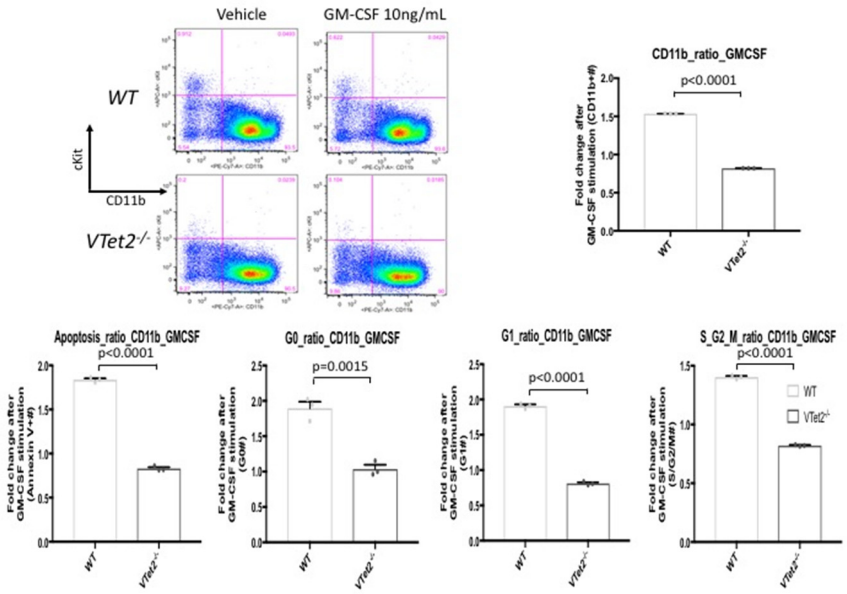


図 3. *Tet2* 欠失細胞は GM-CSF 刺激に対して抵抗性を示す
GM-CSF 存在下で野生型（WT）または *Tet2* 欠失（VTet2$^{-/-}$）骨髄細胞を培養後に CD11b^{+} 骨髄単球系分画の増加率（右上）、同分画のアポトーシス誘導率（下段最左側）、各細胞周期分画の増加率（下段右側 3 つ）を示す。p 値は Unpaired Student t-test 法で算出した。

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、我々は野生型または *Tet2* 欠失造血前駆細胞分画における GM-CSF 受容α鎖（GM-CSFRα）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-CSFRα の発現レベルに有意差はみられなかった。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。

考　察

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髄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。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。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、横浜市立大学医学部医学科の関根千裕さんの協力を得たことに謝意を表する。

文　献

1) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009 May 28;360(22):2289-301. PMID: 19474426 DOI: 10.1056/NEJMoa0810069
2) 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. 2012 Feb 17;2:273. PMID: 22355785 DOI: 10.1038/srep00273
3) Kunimoto H, McKenney AS, Meydan C et al. Aid is a key regulator of myeloid/erythroid differentiation and DNA methylation in hematopoietic stem/progenitor cells. Blood. 2017 Mar 30;129(13):1779-1790. PMID: 28077417 DOI: 10.1182/blood-2016-06-721977
4) Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M et al. Tet2-mutated myeloid progenitors possess aberrant in vitro self-renewal capacity. Blood. 2014 May 1;123(18):2897-2899. PMID: 24786459 DOI: 10.1182/blood-2014-01-552471
5) Kunimoto H, Meydan C, Nazir A et al. Cooperative epigenetic remodeling by TET2 loss and NRAS mutation drives myeloid transformation and MEK inhibitor sensitivity. Cancer Cell. 2018 Jan 8;33(1):44-59. PMID: 29275866 DOI: 10.1016/j.ccell.2017.11.012
6) Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. Science. 2017 Feb 24;355(6327):842-847. PMID: 28104796 DOI: 10.1126/science.aag1381
7) Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S et al. Chronic interleukin-a exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. Nat Cell Biol. 2016 Jun;18(6):607-618. PMID: 27111842 DOI: 10.1038/ncb3346
8) Smith AE, Mohamedali AM, Kusalekararaj A et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. Blood. 2010 Nov 11;116(19):3923-3932. PMID: 20693430 DOI: 10.1182/blood-2010-03-274704
9) Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. Cancer Cell. 2011 Jul 12;20(1):11-24. PMID: 21723200 DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.001