

令和 2 年 8 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860191

氏 名 後藤 裕樹

(氏名は必ず自署すること)

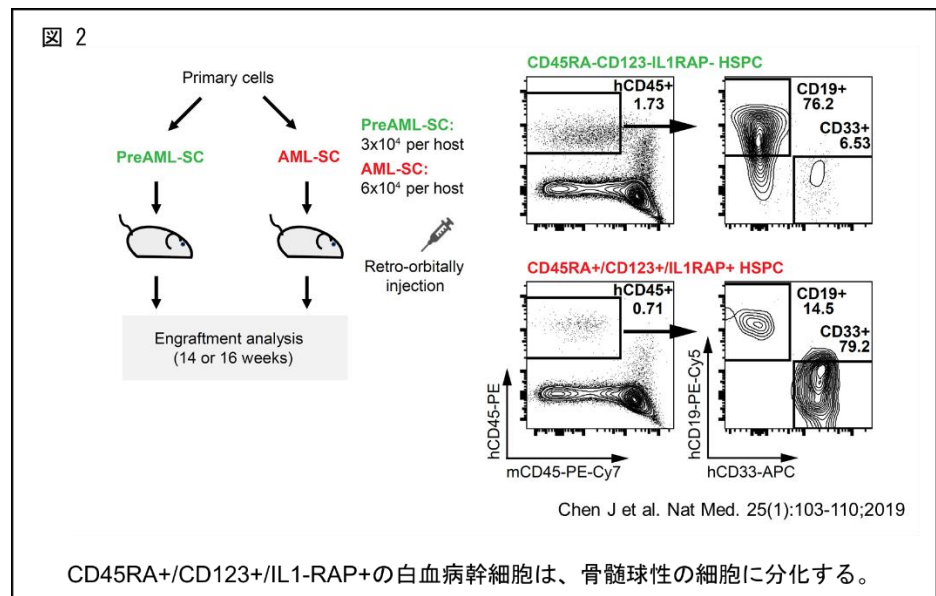
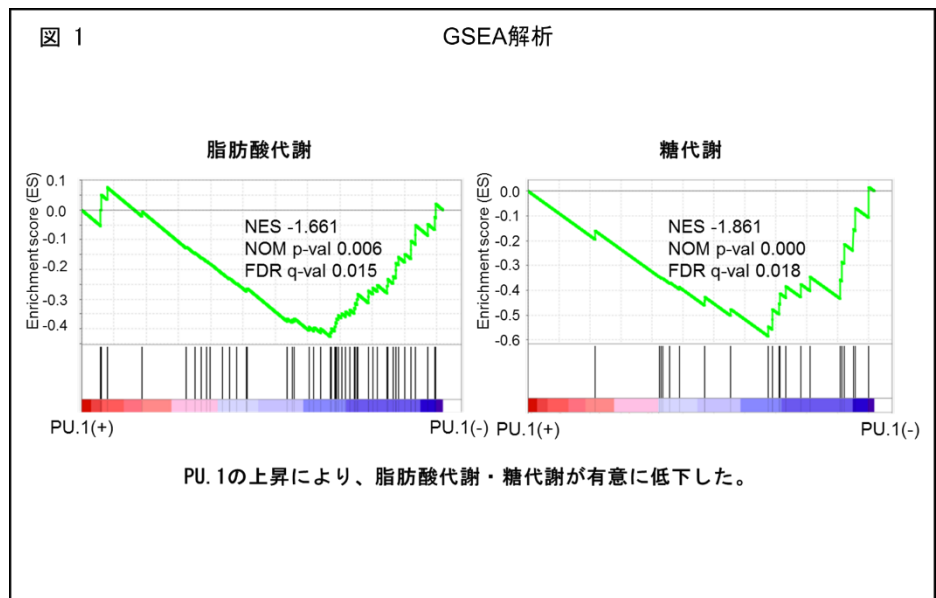
海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ニューヨーク （国名：米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
転写因子 PU. 1 による白血病代謝制御機構の解明及び治療応用
3. 派遣期間： 平成 30 年 8 月 1 日 ~ 令和 2 年 7 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Albert Einstein College of Medicine, Department of Cell Biology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

留学先の所属研究グループにより報告された転写因子 PU.1 のエンハンサー領域のヘテロ欠損と DNA 修復遺伝子 (MSH2) のホモ欠損による骨髓異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS)/急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia: AML) モデルマウス (Nat med, 2015) を利用して、まずは、PU.1 の発現が低下した MDS/AML モデルマウスでの研究を行った。このモデルマウスの利点は、MSH2 の欠損により、ヒトが生涯蓄積し MDS/AML 発症を促進する遺伝子変異を個体で模倣することができるため、短期間において、前白血病から白血病の分化段階における遺伝子変異を解析できる点が挙げられる。また、PU.1 の低下が 35%程度で PU.1 が完全に欠損していない点がヒト AML の転写活性及び下流シグナルにおいて類似しており、よりヒトの病態に近いモデルであると



考えらえる。留学前のデータとして、PU.1 の過剰発現により、ACSL1、ACSL4、ACADVL、ENO3、CPT2、SUCLA2、HADHB、LGALS1、LDHA、LDHC、UGP2、PAM、PYGB、PYGL、PPIA、ELF3、MIF、GYS1、GCLC などの代謝に関わる遺伝子を抑制するデータを細胞株で得ていた (図 1)。遺伝子の変化を解析し、実際、PU.1 の低下で、脂肪酸代謝・糖代謝に関わる遺伝子の発現が変化するという、留学前に予想された結果を得られた。

以上より、細胞株で得られた結果はマウスモデルの解析結果とある程度一致していると考えられた。しかしながら、実臨床の治療応用を考える上では、マウスの解析に留まることなく、実際のヒト患者検体での解析が重要であると考え、経時的に採取した MDS/AML 患者検体での遺伝子解析に取り掛かった。近年、白血病の治療抵抗性の原因として、白血病幹細胞の存在が注目されている。我々は、白血病幹細胞に、より遺伝子変化が蓄積しており、代謝制御を含めた治療抵抗性のメカニズムが存在していると仮説を立てた。所属研究室の過去の報告において (Nat med, 2019)、白血病幹細胞は、前白血病幹細胞に比べて、*in vivo* において、より骨髓球性の細胞に分化していたことから、AML を発症する主な細胞分画は、CD34+CD38-細胞中で CD123、CD45RA、IL-1RAP いずれか陽性の白血病幹細胞に存在すると考えられた (図 2)。我々が行った細胞分画の定義は、これまでの報告を一部参考にして、CD34+CD38-細胞中で CD123、CD45RA、IL-1RAP いずれか陽性のものを白血病幹細胞 (LSC: leukemic stem cell)、CD34+CD38-細胞中で CD123、CD45RA、IL-1RAP いずれも陰性のものを前白血病幹細胞 (preLSC: pre-leukemic stem cell)、CD34+CD38+細胞を前駆細胞 (Progenitor cell)、CD33+細胞を芽球 (Blasts) と定義した。CD34+細胞の割合は骨髓中では 1%前後と非常に少ないことから、CD34 ビーズを用いて、CD34 陽性細胞の純化を行い、CD34 陽性細胞、CD34 陰性細胞を別個に、高速セルソーター MoFlo Astrios を用いてソートした (図 3)。CD34 陰性細胞においては、CD45-細胞を非造血細胞として、CD3+細胞を T 細胞としてソートした (図 4)。これらの細胞は whole exome

sequencing(WES)/whole genome sequencing(WGS)を行う場合の germline control となり、治療前の検体からソートした。ソートした細胞から、DNA 及び RNA を抽出して、MDA(multiple displacement amplification)法を用いて増幅を行い、解析に十分な量の genomic DNA を得た上で、次世代シーケンサーで解析を行った。本研究では、発症時、治療中、治療終了後の経時的なサンプルを取得しており、治療に伴い、遺伝子変異がどのように変化したかを解析した。近年の報告により、前白血病段階である MDS から AML へと移行する過程で、PU.1 がさらに低下することが報告されている(Annals of Hematology, 2019)。使用している患者検体において、病勢が増悪し、白血病化する過程で、代謝に関わる遺伝子に変化が起こっていないか、解析を進め、PU.1 発現量との相関も検討する。現在、8 例の患者において、すでにデータの取得が完了しており、今後さらに症例数を増やしていく予定である。

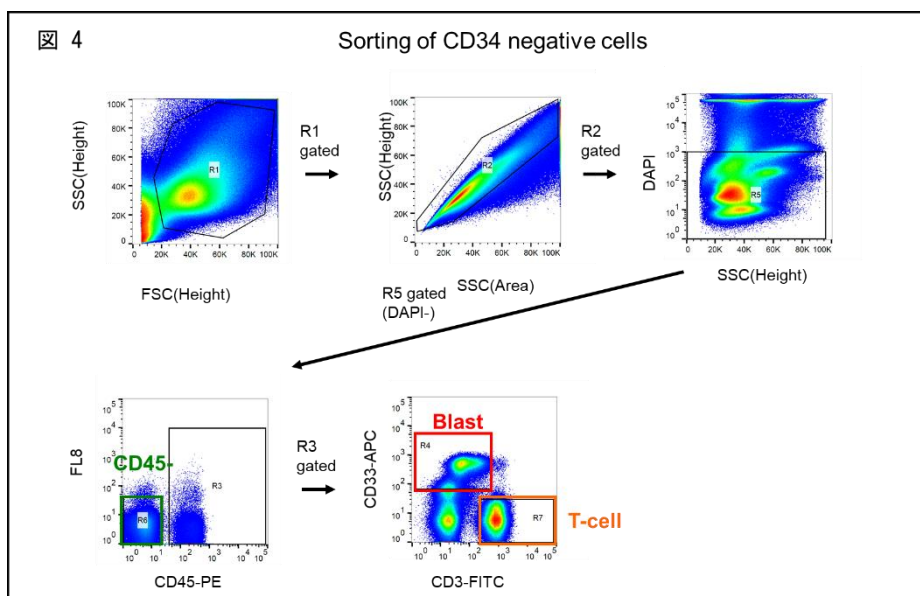
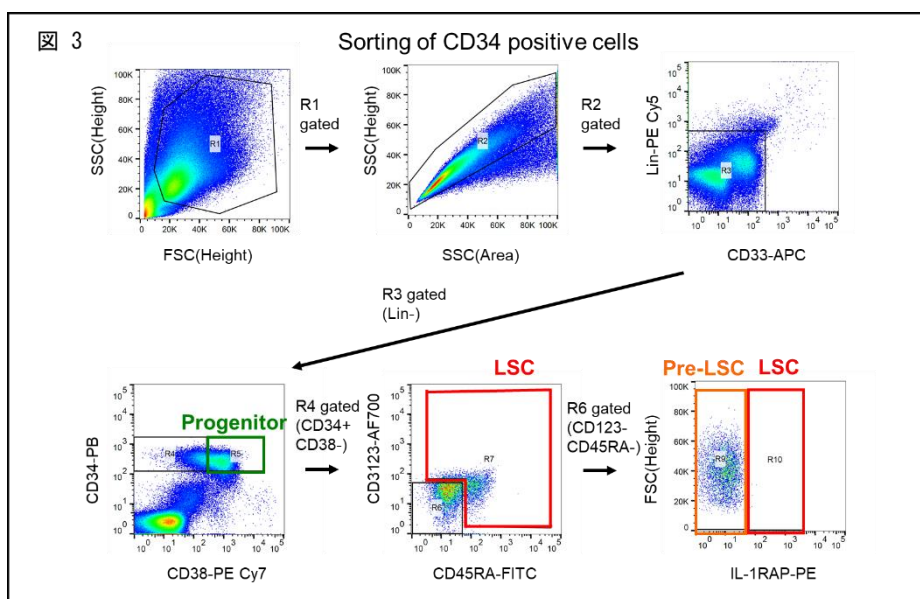
取得した DNA を用いて、Locus dropout testing を定量 PCR 法により行った。すなわち、増幅された DNA が代表的な染色体領域において、効率的に増幅されているか、白血病細胞株 THP-1 の非増幅 DNA をコントロールとして、解析を行った。増幅された DNA は非増幅の DNA と比べて、ほとんど変化を認めず、DNA は効率的に増幅されていることが予想された(図 5)。

また、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、増幅した DNA はすべて 20000bp 前後の分子量を有し、非特異的なバンドも認めていないことから、DNA が効率的に増幅されており、DNA の質も問題ないと考えられる(図 6)。

以上の解析から、DNA の質は問題ないと考え、WES/WGS を行った。WES のカバレッジを解析したところ、おおむね平均 300X ~ 500X で解析できていた。実際のヒト CD34+細胞の割合が骨髓中で 1%程度であることを考えると、通常の解析と比べたカバレッジは最大 50000X に達し、重要ではあるが頻度が少なくこれまでの研究報告では検出できていなかったと思われる遺伝子変異も十分検出できていると考える(図 7)。WGS の解析も併せて行っており、100X 程度のカバレッジになると考えられるが、より網羅的な遺伝子解析ができており、現在、解析を進めている。

今後は、発見された新規の変異遺伝子をクローニングし、試験管内で変異遺伝子を細胞に発現させ、どのように下流遺伝子や代謝を制御しているか検討し、白血病における治療標的となりうるかも含めて、解析をすすめていく。

現在までで、8 例の解析を行っているが、幹細胞から分化した前駆細胞や芽球と比べて、前白血病幹細胞及び白血病幹細胞で疾患に関わる遺伝子変異が蓄積していた。SciClone による解析では、遺伝子変異数のみならず、腫瘍クローンサイズも白血病幹細胞により多く存在していることから、白血病幹細胞のクローンは多様性に富んでおり、これらのクローンの一部に代謝制御の変化に富む



治療抵抗性の細胞が存在すると考えられた。今後の解析では、より白血病幹細胞に焦点をあて、代謝制御機構、遺伝子変異を解析していき、これらの白血病クローンを標的とした治療法の検討が望ましいと考えている。

現在、白血病幹細胞に焦点を当てた研究を行っていることから、別の研究グループから共同研究の依頼があり、クローン性造血を有する患者の幹細胞における網羅的な遺伝子解析に一部参画し、現在、共著者として投稿中である。

本研究も、患者検体、試験管内、マウスモデルの解析を精力的にすすめ、これらの解析が終わり次第、投稿準備に取り掛かる予定であり、論文投稿前には、併せて ASH annual meeting 等の学会にも発表予定である。

Hematopoiesis Club for the Northern NYC institutions が Columbia University と Albert Einstein College of Medicine の研究室を中心に 2018 年度から開始され、2019 年 3 月 22 日に行われた第 2 回の meeting は所属研究室を中心に、所属大学内で開催された。この meeting において、ネットワーク構築に参画し、有意義な討議を行い、これをきっかけに、一部の解析において、Columbia University との共同研究も開始した。Columbia University の研究室と自身の研究に関する相談を仰ぐとともに、

Columbia University の研究者が後日所属研究室に来訪し、我々が行っている白血病幹細胞の解析法を学んで、共同研究が開始された。その後、コロナウイルスの影響により、2020 年度の Hematopoiesis Club for the Northern NYC institutions は一時的に中断してしまったが、コロナウイルスの状況が落ち着き次第、再開する予定であり、状況次第ではあるが、再開された折には、本研究会において、成果発表を行う予定である。

図 5

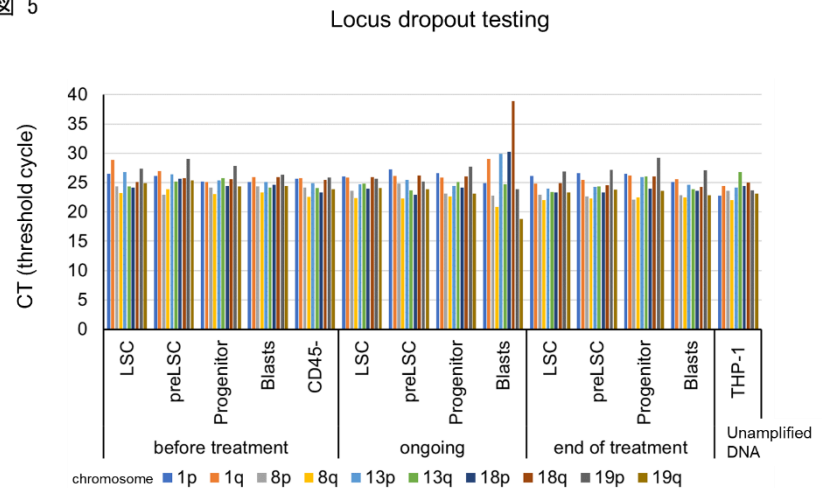
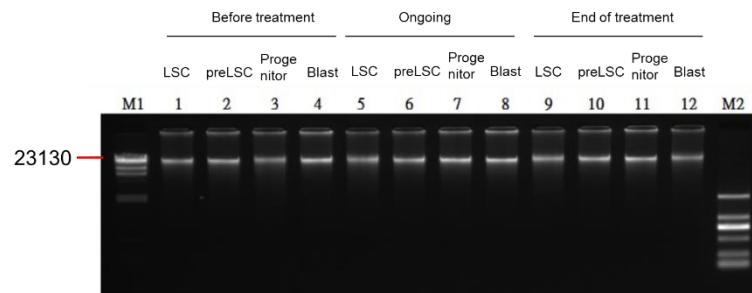


図 6

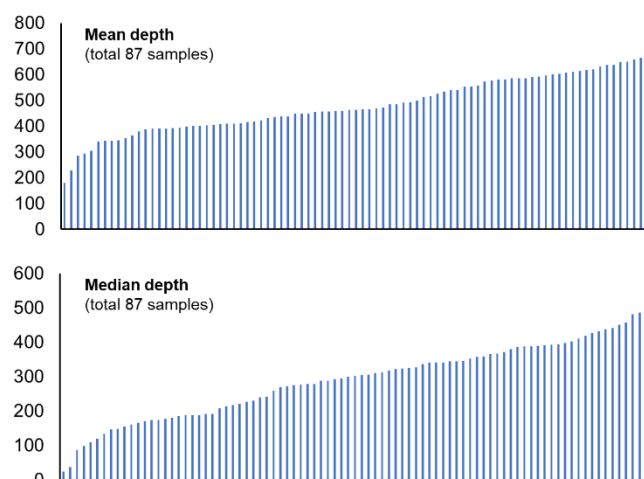
アガロースゲル電気泳動



増幅したDNAは20000前後のサイズを有しており、DNAの質は問題ないと考えられる。

図 7

Coverage of whole exome sequencing



Average of coverage depth ranged from $180\times$ to $689\times$ (average: $481\times$, median $464\times$).