

論文の内容の要旨

論文題目 イムノグロブリンスーパーファミリーメンバー8 の正常造血と骨髄性白血病における役割の解明

氏名 神保 光児

急性骨髄性白血病 (AML) や慢性骨髄性白血病急性転化 (CML-BC) などの骨髄性白血病は、新規治療が次々と登場している現在も再発や難治が問題となり予後を改善しうる治療の開発が望まれている。その中で CD33、Lewis Y、NKG2D リガンド、CD123 などに対する抗体療法やキメラ抗原受容体 (CAR)-T 細胞療法が実臨床でも使用されるようになるなど、細胞表面抗原を標的とする治療も有望視されている。

細胞表面蛋白質であるテトラスパニンに関連する蛋白質と細胞表面上でテトラスパニンウェブと呼ばれる複合体を形成し、複合体での蛋白質相互作用を介して細胞の接着、運動、増殖、細胞内シグナル伝達などに関わっている。CD9 や CD81 などのテトラスパニンは造血幹細胞 (HSC) の造血構築能や静的状態に関連し、造血器腫瘍の予後不良に関わることや新規治療標的として有用である可能性も指摘されている。私は CD9 や CD81 と直接結合しその機能調節にかかわる細胞表面分子としてイムノグロブリンスーパーファミリーメンバー8 (IGSF8、別名 EWI-2、CD316、PGRL) に着目し、その機能解析を行うことで造血器腫瘍の新規治療標的を呈示できるのではないかと考えた。

IGSF8 は4つの細胞外ドメインと1つの細胞膜貫通部、そして短い細胞内尾部から構成される細胞表面蛋白質である。IGSF8 は CD9 や CD81 などのテトラスパニンやインテグリン ($\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$)、ezrin/radixin/moesin (ERM) 蛋白質や α アクチニンなどと蛋白質複合体を形成することで細胞の運動性や遊走、細胞形態に関与する。血球系細胞では、ヒト末梢血の T リンパ球、B リンパ球、NK 細胞、樹状細胞で IGSF8 が発現し、T 細胞の形態やサイトカイン放出能、樹状細胞の遊走能や抗原暴露後の増殖に関わることを示されてきた。悪性腫瘍においては前立腺癌、神経膠芽腫、メラノーマなどの予後、増殖、転移などに関わることを明らかになってきているが、IGSF8 が造血の形成や造血器悪性腫瘍に及ぼす影響は明らかにされていない。

これらの背景から私は IGSF8 の存在が蛋白質複合体の形成に関わることで、造血構築や造血器悪性腫瘍の進展に関与しているのではないかと考えた。本研究では主に *Igsf8* コンディショナルノックアウトマウスを用いて *Igsf8* が正常造血の構築と骨髄性白血病に及ぼす役割を明らかにすることで IGSF8 が骨髄性白血病の新規治療標的となりうるかどうかを検討することを目的とした。

まず *Igsf8* の正常造血への影響を評価した。野生型 B6 マウスの骨髄細胞での *Igsf8* 発現を調べると、解析した骨髄細胞の全ての分画で広範に *Igsf8* が発現していた。続いて造血細胞特異的 *Igsf8* 欠損マウス (*Igsf8*^{fl/fl}; *Vav-Cre*) とタモキシフェン投与特異的 *Igsf8* 欠損マウス

(*Igsf8^{fl/fl}; Rosa26-CreERT*) を構築した。*Igsf8^{fl/fl}; Vav-Cre* マウスは正常に誕生し、明らかな異常なく成長した。*Igsf8^{fl/fl}; Vav-Cre* マウスの解析では、*Igsf8* 欠損は末梢血と骨髄の細胞数と特定分画の割合にほとんど影響を及ぼさなかった。続いて HSC への影響を評価した。*Igsf8^{-/-}* LT-HSC (CD34⁻ Flk2⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lineage⁻細胞) はコントロールと比較し *in vitro* でのコロニー形成能を減少させ、*in vivo* での競合移植実験では移植後 12 週までは有意な影響は観察されなかったが、16 週で有意に *Igsf8^{-/-}* キメリズムが低下し、2 次移植後には一貫して低値で推移した。これらの結果から、*Igsf8* は造血系細胞に広範に発現するが、定常状態の成体型造血には影響を及ぼさず、HSC のコロニー形成能と造血再構築能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

次に骨髄性白血病に及ぼす影響を調べた。マウスの骨髄細胞に *MLL-AF9* と *NRAS^{G12V}* を導入した AML モデル、*BCR-ABL* と *NUP98-HOXA9* を導入した CML-BC モデルを構築した。これらの細胞でも *Igsf8* が発現していることを確認した。*Igsf8* のノックダウンとノックアウトにより AML 細胞、CML-BC 細胞の *in vitro* でのコロニー形成能が低下し、同細胞移植後マウスの *in vivo* での生存が有意に延長した。AML 発症後の *Igsf8* 欠損効果を調べるため、*Igsf8^{fl/fl}; Rosa26-CreERT* AML 細胞を移植し、AML 発症後にタモキシフェンを投与して *Igsf8* 欠損を誘導した。このモデルにおいても *Igsf8^{-/-}* 群で有意な生存の延長が得られ、タモキシフェン投与数日後には末梢血、骨髄、脾臓の AML 細胞が著明に減少していた。また、*Igsf8* 欠損は白血病細胞の骨髄へのホーミング能に影響を与えず、AML 細胞の S 期減少、Lineage⁻ c-Kit⁺ 分画の AML 幹細胞 (AML LSC) のアポトーシス亢進を誘導し、AML マウス脾臓細胞の LSC 割合を低下させた。これらの結果から、*Igsf8* が骨髄性白血病の発症と維持に重要な役割を果たしており、*Igsf8* の欠損は LSC のアポトーシスを誘導し AML 進行を妨げることが示された。

Igsf8 による骨髄性白血病制御のメカニズム追求のため、*Igsf8^{fl/fl}* もしくは *Igsf8^{-/-}* での AML LSC、CML-BC LSC、正常 LT-HSC で RNA シーケンス解析を行った。Gene set enrichment analysis (GSEA) とヒートマップ図から、*Igsf8^{-/-}* LSC における Wnt/ β -catenin 標的遺伝子群の発現低下とアポトーシス関連遺伝子群の増加を認め、LT-HSC ではこの傾向がないことも判明した。続いて β -catenin 蛋白質発現を調べると、*Igsf8* 欠損白血病細胞は β -catenin 蛋白質発現が低下していた。 β -catenin は Wnt 受容体からの刺激がない状態では β -catenin destruction complex (GSK3- β , Axin1, CK1 α , APC) によるリン酸化を受けた後プロテアソーム分解に導かれるが、テトラスパニンを介したエクソソームによる放出が β -catenin 発現低下に関わることも知られ、どのような機序で *Igsf8* 欠損が β -catenin 低下に関わっているかを調べた。まずリン酸化 S33 (pS33) β -catenin の発現を調べると *Igsf8^{-/-}* LSC で発現が亢進していた。一方一連の β -catenin 発現変動は正常 KSL (c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lineage⁻) 細胞では観察されなかった。次にリン酸化に抵抗性のヒト β -CATENIN (β -CATENIN^{S33Y})、変異のない β -CATENIN を *Igsf8^{-/-}* AML 細胞に過剰発現させると、いずれもコロニー形成能を救済したが、 β -CATENIN^{S33Y} 過剰発現ではコロニー形成能と β -CATENIN 発現をより救済した。さらに *Igsf8* 欠損 AML 細胞

は Wnt3a への反応性が低下しており、GSK-3 阻害薬 CHIR99021 とプロテアソーム阻害薬 MG132 においては β -catenin 発現が回復し、エクソソーム阻害剤 GW4869 は影響を及ぼさなかった。これらの結果を総合すると *Igsf8*^{-/-} AML 細胞は Wnt3a からのシグナルに不応となり、 β -catenin destruction complex からのリン酸化が亢進することで β -catenin がプロテアソーム分解に導かれていることが考えられ、その結果 AML 細胞の増殖や *in vivo* での AML 進行を妨げていることが示唆された。

最後にヒト骨髄性白血病に IGSF8 が及ぼす影響を評価した。IGSF8 は患者由来 AML 細胞、CML-BC 細胞と骨髄性白血病腫瘍細胞株において広範に発現していた。続いて *IGSF8* のノックダウンを行うと MV4-11、SKM-1、THP-1、K562 細胞と患者由来 AML 細胞においてコロニー形成能を有意に低下させた。そして *IGSF8* ノックダウンは MV4-11、SKM-1 細胞の β -CATENIN 発現低下と β -CATENIN の標的遺伝子の mRNA 発現低下を誘導し、Wnt3a、CHIR99021、MG132、GW4869 への反応も *Igsf8* 欠損マウス AML 細胞と同様であった。また MV4-11 細胞を用いて Wnt 共受容体の共免疫沈降を行うと、*IGSF8* ノックダウンは Wnt 共受容体の結合性を低下させていたことが示唆され、これが IGSF8 発現減少が Wnt3a への反応性を低下させた原因と考えられた。さらに MV4-11 の NSG マウスへの異種移植モデルでは *IGSF8* ノックダウンにより末梢血キメリズム低下と生存の延長を示した。これらの結果から、*IGSF8* 発現低下はヒト骨髄性白血病においても β -CATENIN の分解亢進を介して、増殖や進行を抑制していることが示された。

本研究結果から *Igsf8* が成体型造血の定常状態においては必須でないが造血幹細胞の造血再構築能に関わること、*Igsf8* 欠損が β -catenin の分解を誘導するとともに LSC のアポトーシスを誘導し骨髄性白血病の進展を妨げることが明らかとなった。本研究は *Igsf8* が骨髄性白血病の β -catenin 発現に関連するという新たな知見とともに、正常造血への限定的な影響から IGSF8 が骨髄性白血病の新規治療標的となる可能性を呈示した。