

論文の内容の要旨

論文題目 エピゲノム異常を反映した骨髄異形成症候群の新規マウスモデルの解析

氏名 永瀬 玲奈

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)は予後不良の造血器腫瘍であり、骨髄の無効造血による血球の減少や分化異常を特徴とする。MDSは造血幹細胞に遺伝子変異が生じることで引き起こされ、高率に急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia, AML)に移行する。このためMDSの根治的治療法は造血幹細胞移植が中心となるが、MDS患者は高齢者が多く造血幹細胞移植に代わる新規治療法の確立が望まれる。

MDS患者において検出される遺伝子変異は、細胞の増殖およびアポトーシス抑制へと導くクラスI変異と、分化障害をきたすクラスII変異に大別される。しかし、近年の大規模シーケンスにおける全ゲノム解析の結果から、MDSにおける遺伝子変異として従来のクラスI・クラスII変異には分類し難い新たな変異が多数同定された。その中には、エピジェネティクスに関与する遺伝子の変異が多く存在する。エピジェネティクスとはDNAの塩基配列を変えずに遺伝子発現を制御する仕組みであり、DNAの塩基配列以外の情報をエピゲノムと呼ぶ。そのエピゲノムに影響を及ぼす遺伝子変異の中でも、特にヒストン修飾に関与する*ASXL1*(additional sex combs-like1)変異はMDS患者の約20%に認められる。*ASXL1*変異を持つ患者は予後が悪く、病態関与への解析が求められている。

*ASXL1*は胎生期の体軸形成に不可欠な*HOX*遺伝子群を制御しており、最終エクソンのホットスポットで変異が生じると、C末端側を欠失した*ASXL1*変異体を形成する。*ASXL1*変異体は正常な*ASXL1*の機能を阻害し、エピゲノム異常を引き起こすと考えられている。

さらに、*ASXL1*変異は健常な高齢者の一部にも認められることが近年明らかとなり、*ASXL1*変異を有するクローン性造血が引き起こされていると考えられる。クローン性造血を有する高齢者は高率に造血器腫瘍を引き起こすことから、*ASXL1*変異がMDSや白血病発症の土台となる環境(前がん状態)をつくり出すと考えられる。

そこで本研究では、*Asxl1*変異体コンディショナルノックイン(*Asxl1*-MT KI)マウスを作製し、エピゲノム異常による前がん状態の形成からMDS・白血病への進展を生体モデルで解析すること

を目的として研究を進めた。

まず、*Rosa26* プロモーター下流に *Asx1* 変異をノックインした *Asx1*-MT KI マウスを作製した。*Vav-Cre* マウスと掛け合わせ、*Asx1*-MT KI マウスの組織を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、造血組織特異的に *Asx1*-MT を発現していることを確認した。さらに、*Asx1*-MT KI マウスの骨髄細胞を用いて FACS 解析を行ったところ、*Asx1*-MT KI マウス細胞は GFP 蛍光にて明確に区別することが可能であった。

次に、*Asx1*-MT KI マウスの造血幹細胞の分化能力を調べるため、骨髄細胞を用いてコロニーアッセイを行った。その結果、コントロールマウスと比較して *Asx1*-MT KI マウスでは骨髄球系コロニー(CFU-GM)の増加と赤血球系コロニー(BFU-E, CFU-E)の減少を認めた。

長期経過観察の結果、70 週齢の *Asx1*-MT KI マウスは赤血球数の減少を伴う軽度の貧血と血小板数の顕著な増加を認めた。骨髄中には異形を認めたが、MDS や AML の発症により死亡するマウスはいなかった。

次に、*Asx1* 変異による造血幹細胞分画の割合の変化を調べるために、*Asx1*-MT KI マウスの骨髄細胞を用いた FACS 解析を行った。その結果、造血幹細胞分画である *Lin*-*Sca1*+*c-Kit*+(LSK) 分画の顕著な減少を認めた。さらに *Asx1*-MT KI マウスでは骨髄球系共通前駆細胞(common myeloid progenitor: CMP, *Lin*-*c-Kit*+*Sca1*-*CD34*+*FcγR*-)分画および顆粒球・単球系前駆細胞(granulocyte/macrophage progenitor: GMP, *Lin*-*c-Kit*+*Sca1*-*CD34*+*FcγR*+)分画の割合はコントロールと比較して有意な差は無かったが、巨核球・赤血球系前駆細胞(megakaryocyte/erythrocyte progenitor: MEP)分画の割合の増加を認めた。次に、*Asx1* 変異による造血幹細胞の骨髄再構築能への影響を調べるために、競合的移植実験を行った。移植後 4 週間のマウス末梢血を解析した結果、*Asx1*-MT KI マウス細胞のキメリズムは顕著に減少していたが、骨髄球系マーカーである *CD11b* が高く、骨髄球系に傾倒した表現型を示した。

以上より、*Asx1*-MT KI マウスは造血幹細胞の量的・質的な異常を認める一方で、MDS・AML を発症しなかったことから、*Asx1* 変異により形成された前がん状態に新たな遺伝子変異が加わることで発症が惹起されると考えられた。

そこで、臨床上 *ASXL1* 変異と高頻度に共存することが知られている *RUNX1*(Runt-related transcription factor 1)変異を *Asx1*-MT KI マウスに導入することで発症が惹起されるかを検討した。MDS 患者の *RUNX1* 変異は N 末端側の Runt ドメインにおけるミスセンス変異と、C 末端欠失型変異に大別される。そこで、双方の変異を有する MDS 患者の検体を用いて *RUNX1* 変異のパターンを解析した。その結果、*ASXL1* 変異の有無に関わらず、*RUNX1* 変異の中でも特に C

末端欠失型変異が多く存在することが明らかになった。*in vivo*での協調作用を検討するために、*Asxl1*-MT KI マウスの骨髄細胞に C 末端欠失型の *RUNX1* 変異体(*RUNX1*-S291fsX)を導入しマウスに移植した。その結果、末梢血中でのキメリズムが増加し、移植後約 3 ヶ月という早期の段階で大球性貧血を呈した。この時、末梢血中には異形細胞を認めた。さらに、コントロールよりも早期に MDS/AML を発症して死亡することが分かった。

RUNX1 変異の導入により *Asxl1*-MT KI マウスの造血幹細胞にどのような変化が生じるのかを調べるために、移植したマウスの骨髄細胞を用いて RNA シークエンス(RNA-seq)を行った。その結果、造血幹細胞において上昇する遺伝子群の発現が上昇していた。さらに、移植マウスの LSK 分画を解析したところ、*Asxl1*-MT KI マウスは *RUNX1* 変異の獲得により LSK 分画の減少が回復し、CMP の増加と MEP の減少を認めた。また、*Asxl1*-MT KI マウス骨髄細胞に *RUNX1*-S291fsX を導入してコロニーアッセイを行った結果、CFU-E の減少と BFU-E の増加を認めた。CFU-GM は両変異体の共発現によりコロニー数が増加し、コロニー再形成能が上昇した。これらの結果から、*RUNX1* 変異の導入により *Asxl1*-MT KI マウスの造血幹細胞の機能障害が回復し、赤血球分化阻害と骨髄球系細胞の増殖により白血病の発症に至ることが示唆された。

Asxl1-MT KI マウスの白血病進展への感受性をさらに評価するために、遺伝子変異を誘発する MOL4070A ウイルスをマウス新生児に投与して経過を観察した。投与後 1.5 年の観察期間において、*Asxl1*-MT KI マウスは白血病を発症して全て死亡した。この結果から、*Asxl1*-MT KI マウスはコントロールマウスと比較して造血幹細胞の遺伝子変異への感受性が高く、発症には新たな変異の獲得が必要であることが示唆された。

Asxl1 変異による赤血球の分化阻害および造血幹細胞の機能障害の仕組みを詳細に調べるために、c-Kit 陽性骨髄細胞を用いた RNA-seq を行った。その結果、*Asxl1*-MT KI マウスは *Hoxa* 遺伝子群の発現上昇や、赤血球分化関連遺伝子群の発現低下を認めた。さらに、*Asxl1* 変異によるエピゲノム異常を詳細に解析するために、同様の分画を用いてクロマチン免疫沈降シークエンス(ChIP-seq)を行った。その結果、*Asxl1*-MT KI マウスは抑制性ヒストン修飾の H3K27me3 のグローバルな変化は認められなかったが、*Hoxa* locus 特異的に減少していることが分かった。一方で、遺伝子の活性化に関与するヒストン修飾の H3K4me3 はグローバルに低下していることが分かった。H3K4me3 が特に低下している部位を調べると、赤血球分化に関与する遺伝子の部位が多く存在していた。その中の 1 つである *Id3*に着目し、*Asxl1*-MT KI マウスの骨髄細胞に *Id3* を戻して発現を回復させ、コロニーアッセイを行ったところ、*Asxl1*-MT KI マウスにおいて低下していた CFU-E および BFU-E のコロニー数が回復した。この結果から、*Asxl1*-MT KI マウスは

Id3 locus における H3K4me3 の低下により *Id3* 発現が減少しており、このことが赤血球分化阻害を引き起こす一因となっていることが示唆された。

以上の解析結果より、*Asxl1*-MT KI マウスは *Asxl1* 変異によるエピゲノム異常を反映したモデルであり、MDS や白血病の前段階である前がん状態であることが示唆される。*Asxl1*-MT KI マウスを用いたさらなる解析を行うことで、エピゲノム異常を背景とした遺伝子変異の蓄積によるがん顕在化の仕組みを明らかにし、前がん状態から MDS・白血病の発症に必要な遺伝子変異と発症機構を提示することができると考えている。