

## 数的染色体異常による造血不全・白血病発症機構の解析

熊本大学 国際先端医学研究機構 白血病転写制御研究室  
指田 吾郎

### 目的：

骨髓異形成症候群(MD S)は、造血幹細胞より発生して分化障害・造血不全状態になり、一部は急性骨髄性白血病に進展する高齢者に好発する予後不良ながんである。がんにおいて、数的染色体異常が、その発症と病態進展に関与することは古くから知られていた。MD Sにおいても、トリソミー8(+8 MD S)を始めとした数的染色体異常が、病態や予後と密接に関連しており、診断や治療のための重要な判断基準でもある。+8 MD Sは比較的予後不良であることが知られているが、8番染色体上の責任領域・遺伝子群は、遺伝子発現のみの検証では、MD S細胞の不均一性もあり明白にはなっていなかった。実際、数的染色体異常によるがん病態メカニズムに関しては、トリソミーを再現する技術的な困難もあって、遺伝子・染色体・細胞レベルのいずれでも未だ明白ではない。また、健常高齢者に、MD Sと同様のドライバー遺伝子変異や染色体の構造・数的異常を持つクローン造血・前がん状態の存在が知られているが、一部の高齢者が、MD S発症に至るのであり、病態進展の仕組みは依然として不明である。

こうしたMD S病態研究の困難を打破するために、研究代表者は、始めに、人工染色体によるヒト8番染色体導入・マウスES細胞を用いたトリソミー8 MD Sモデルを確立した。本研究では、従来の遺伝子量や発現レベルの変動からでなく、クロマチン高次構造・染色体制御の観点から、「数的染色体異常によるがん発症機構」を新規生体トリソミーモデルにて解析することが目的であった。

### 研究成果：

ヒト8番染色体の遺伝子に相同するマウス遺伝子は複数の染色体にわたる。トリソミー8骨髓異形成症候群の病態基盤を解明するために、人工染色体技術(鳥取大学・押村博士・香月博士の協力)によって、個別の遺伝子を複数導入するのではなく、ヒト8番染色体をマウスES細胞に導入することで、+8キメラマウスの作製を試みた。この手法によって、ヒトとマウスの遺伝子の違いはあるが、余分な染色体自体による影響を解析することが出来る。新たなトリソミー8生体モデルを確立することができた。続けて、このモデルを用いて、トリソミー8造血幹細胞の機能解析と分子基盤を統合的エピゲノム解析(RNA-seq、RRBS、ChIP-seq、ATAC-seqなど)によって検証した(研究計画1)。+8 MD Sは転写因子*RUNX1*やエピゲ

ノム制御因子 *ASXL1* の遺伝子変異と有意に共存することが知られている。変異を導入した +8 幹細胞を用いて、MDS 細胞の機能解析を実施するとともに、統合的エピゲノム解析によって、8 番染色体に限らないがん発症を促進する責任候補領域または生物学的パスウェイを検証した (研究計画 2)。

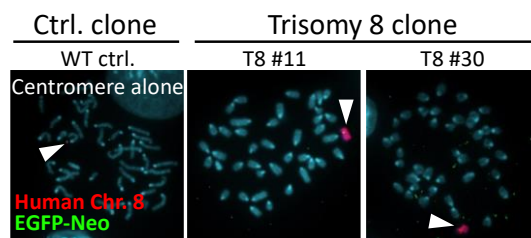
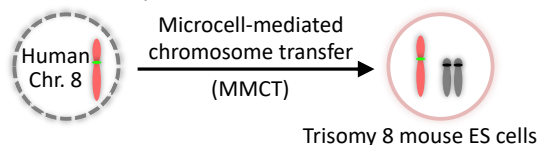
### 計画 1 : 人工染色体によるヒト 8 番染色体導入マウス ES 細胞樹立と造血幹細胞解析

ヒト 8 番染色体 (GFP 標識あり) を野生型 C57BL/6 マウス ES 細胞へ導入して、複数のヒト 8 番染色体導入 ES クローンを樹立した。ヒト染色体の有無は核型解析にて確認した。ヒトでは、+8 モザイク症候群が知られ、造血障害や造血器腫瘍の発症が報告されている。実際、トリソミー 8 キメラマウスの作成を試みたところ、胎生致死でなかった (熊本大学・荒木喜美博士の協力によって実施)。その胎児において、キメラの割合は低く、クローンによるばらつきを認めるが、造血細胞の発生が確認できた (下図参照)。また、ヒト染色体上の遺伝子発現制御は、発生・分化段階に応じて、マウス遺伝子と同様の発現制御パターンが認められた。マウス細胞内で、ヒト人工染色体が、マウス由来の染色体と同じように制御されていることがわかった。

現在までの成果として、成体トリソミー 8 造血幹細胞の機能低下を連続移植実験系にて確認した。さらに、造血幹細胞の RNA-seq、ATAC-seq、ヒストン修飾の ChIP-seq を実施すると、8 番染色体の一部の遺伝子の発現レベルの増加に加えて、それ以外のマウス染色体上の遺伝子の発現変動が確認できた。これは、ヒト 8 番染色体による遺伝子量効果 (3 アリルになり 1.5 倍になる) だけでなく、それが余分になることで、他の染色体の転写、構造、位置の制御機構が影響を受けていることを示唆していた。

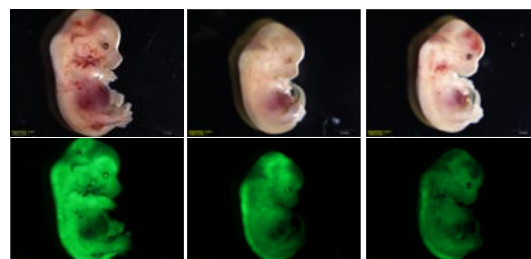
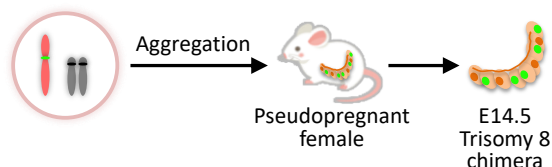
#### □ Establishment of trisomy 8 mouse ES cell line

Collaboration with Dr. Kazuki and Dr. Oshimura (Tottori University)



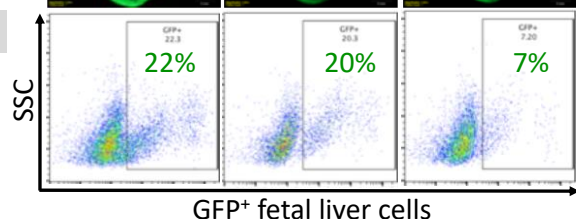
#### □ Generation of trisomy 8 mice model

Collaboration with Dr. Kimi Araki (Kumamoto University)



#### □ Phenotypic & functional analysis

Serial transplantation:



今後は、造血幹細胞のChromosome conformation captureなどを実施して、クロマチン高次構造と染色体の核内位置の観点から、トリソミーによる幹細胞機能の障害や生体レベルでの病態基盤の検証を進めたい。併せて、ヒトのトリソミー細胞を検証することで、その分子メカニズムの普遍性を確認する予定である。

#### 計画2：トリソミー8によるクロマチン構造・染色体制御の異常を介した骨髄異形成症候群の病態解明

生体におけるMDS病態を解明するために、始めに、+8キメラマウスから採取した幹細胞にゲノム編集にてドライバー遺伝子の変異を導入し、+8 MDS生体モデルの作製を試みた。現在まで、造血に重要で造血器腫瘍で高頻度に変異することが知られる*Runx1*転写因子を、ゲノム編集にて欠損したトリソミー8幹細胞において、培養系で血球分化障害を認めた。また、この幹細胞を野生型レシピエントマウスに移植すると、生体内での血球分化の偏りと造血幹細胞の増殖機能の回復を確認した。さらに、レシピエントマウスを長期に観察すると、トリソミー8と遺伝子変異が協調することで、MDSが発症することを確認した。現在、がん幹細胞を発生させる8番染色体上の責任領域・遺伝子発現制御の破綻を介したMDS発症の機序を検証している。今後は、このトリソミー8 MDSモデルを用いて、8番染色体に限らないクロマチン高次構造・染色体の制御異常とがん発症機構を解析する。

以上、世界初のトリソミー8生体モデルを活用して、未だ明らかでない数染色体異常による骨髄異形成症候群の病態基盤を解明したい。

#### **謝辞：**

最後に、アステラス病態代謝研究会からのご支援、鳥取大学の押村光雄博士、香月康宏博士、熊本大学の荒木喜美博士からの多大なるご助力に感謝いたします。また、多くの解析は、私の研究室に所属する白潔博士、久保田翔博士によって実施されました。