

令和元年度（平成 31 年度）学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	赤血球産生機構とマウスフレンドウイルス誘発赤白血病幹細胞維持機構との関連の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部免疫学・塚本徹雄 共同研究者：医学部免疫学・宮澤正顯、医学部生化学・岡田齊、薬学部化学療法学・中山隆志	

1. 研究目的・内容

急性白血病は若年者の命を奪う重大な疾患であり、その病態生理の解明は急性発がん機序への介入と多くの人命の救済につながる。ヒト急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞(LSC)は免疫チェックポイント因子 T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3 (TIM-3)とそのリガンドである Galectin-9 (Gal-9)を発現する。TIM-3 と Gal-9 はオートクリン経路を形成し、白血病の維持・進展に寄与する。TIM-3 は骨髄球系細胞が、Gal-9 は造血前駆細胞(HSPC)が発現する。

我々は最近、マウスフレンド白血病ウイルス(FV)誘発赤白血病の LSC 分画にヒト AML の場合と同様 TIM-3 と Gal-9 が共発現することを発見した。TIM-3 は脾限局巢形成ウイルス(SFFV)のプロウイルス挿入による転写因子 PU.1 活性化後に発現上昇すると考えられる一方、Gal-9 は正常マウス骨髄の赤血球前駆細胞(EP)に発現し、かつ CD71(トランスフェリン受容体)の発現と相関しており、白血病発症維持に関与する可能性がある。

本研究では TIM-3、Gal-9 がマウス FV 誘発赤白血病発症維持に果たす役割を解明し、FV 白血病研究の本当の意義を明らかにし、ヒト AML 病態生理にせまる動物モデルの確立を目指す。

2. 研究経過及び成果

2019 年度は研究計画に沿って、フレンドウイルス(FV)誘発赤白血病細胞を解析し、白血病幹細胞(LSC)と思われる細胞の特徴の把握を進めた。まず BALB/C、B6 マウスの交配 F1 世代マウスに FV を感染させて 10 日後に脾腫を呈した状態で脾細胞を回収し、幹細胞因子(SCF)、骨形成因子 4 型(BMP4)、ソニック・ヘッジホッグ(Shh)添加培養液で 7 日間培養して LSC 分画を増幅させフローサイトメトリーFACS 解析したところ、LSC を含む Kit 陽性分画に T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3)、Galectin-9 (Gal-9)を高発現する細胞集団を検出した。この Kit+TIM-3+Gal-9+細胞は少数であるが、培養前の FV 感染マウス脾細胞にも観察されたため、LSC を含む分画の表現型である可能性が示唆された。さらに、過去樹立された多数の FV 白血病細胞株のうち 4 種類の表現型を調べたところ、驚くべきことにそのうち 2 種類は上記 Kit+TIM-3+Gal-9+表現型を有することが分かった。このことから FV 白血病細胞の発生・維持における TIM-3、Gal-9 の役割の解明が今後重要であると考えられる。

さらに非感染 B6 マウス骨髄の造血前駆細胞の解析では、Gal-9 が Kit 陽性 CD71 陽性細胞に高発現していた。Kit+CD71+細胞は赤血球コロニー形成細胞(CFU-E)であり、ウイルス標的細胞のひとつと考えられる。Gal-9 を発現しない Gal-9 KO マウスの解析においては、新生児マウスの肝臓、およびフェニルヒドラジン投与(急性貧血誘発)成体マウスの脾臓において、Kit+CD71+細胞の頻度が野生型 B6 マウスと比して有意に低下することを確認した。このことは、Gal-9 発現の有無がストレスに対する造血反応になんらかの影響を与えていることを示唆する。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

2020 年度以降の研究は大きく *in vitro* での白血病細胞解析と、マウスを用いた白血病関連因子解析に分けられる。このうちマウス実験では、非感染実験、FV 感染実験に分けられる。

In vitro 実験においては、これまでに樹立された FV 白血病細胞株を用いて TIM-3/Gal-9 の機能を解析する。アポトーシス誘導条件下にて、TIM-3、Gal-9 発現量を操作したときのアポトーシス抵抗性への影響を調べる。

非感染マウス実験では、B6 マウスから作成された Gal-9 KO マウスを用いて Gal-9 の造血に関わる機能をひきつづき解明する。データは野生型 B6 マウスと比較する。(1)Gal-9 KO 成体マウスの解析では、血算(赤血球数・ヘマトクリット)、脾細胞・骨髄細胞の赤血球系コロニー形成能(前駆細胞活性)をしらべるほか、FACS により Gal-9 発現細胞の特徴を明らかにする。また、フェニルヒドラジン投与や慢性炎症により惹起される貧血の動態を調べる。(2)Gal-9 KO 胎児の解析では、妊娠後 14-20 日において解剖し、胎児肝臓白血球を解析する。

FV 感染マウス実験では、B6 マウス系統の高い免疫能が妨げとなることから、まず免疫能を低下させた CD4 変異 B6 マウスと Gal-9 KO マウスの交配により CD4 変異 Gal-9 KO マウスを作成する。CD4 変異 Gal-9 KO マウスに FV を感染させ、白血病を生じるかどうか、経過を野生型 Gal-9 をもつ CD4 変異マウスと比較検討する。FV 感染後異なる週数にて解剖し、脾腫、脾細胞 FACS、コロニー形成能を評価するほか、白血病幹細胞の培養分離を試みる。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Bio Clinica 2019 年 6 月号	総説論文(筆頭著者: 塚本徹雄)	2019 年 6 月 10 日
第 42 回日本分子生物学会年会	ポスター発表(筆頭著者: 塚本徹雄)	2019 年 12 月 4 日