

## 令和 2 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・宮澤正顕、医学部生化学・岡田斉、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

2020 年度は B6 マウス骨髄の造血前駆細胞の解析を進め、Gal-9 発現細胞をより明確に理解することを目指した。フローサイトメトリーを用いて調べた結果、骨髄では Kit 陽性 Sca1 陰性細胞が Gal-9 を高発現していた。さらに Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>細胞分画内の分画を調べたところ、CD71 陽性 CD34 陰性分画が最も高い Gal-9 発現を示した。コロニー形成アッセイにてさらに追究したところ、Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD71<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>細胞頻度とコロニー形成赤血球前駆細胞(CFU-E)との間に強い相関が認められたため、Gal-9 は CFU-E のマーカーであるという結論に至った。さらに同じ Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>細胞分画内の各分画における Gal-9 の mRNA 量と蛋白量との相関を調べたところ、CD34<sup>+</sup>細胞と CD71<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>細胞とがほぼ同等の Gal-9 mRNA 量を示すにもかかわらず、CD71<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>細胞のほうが Gal-9 蛋白量が多いことがわかり、赤血球前駆細胞(EP)において Gal-9 が細胞内に蓄積されているものと考えられた。

赤白血病発症維持と関連しうる赤血球関連因子をより詳細に理解するため、過去に EP (CFU-E)との関連が指摘されている複数の蛋白の発現をフローサイトメトリーで調べた。その結果、Gal-9 のほかに赤血球分化因子 GATA-1 を含む計 5 つの EP マーカー分子の同定に至った。またその他にも、EpoR (エリスロポイエチン受容体)など多数の分子が EP の一部に発現することを確認した。

一方、FV 誘発赤白血病の発症機序を考えたとき、骨髄 EP に FV が感染しても発がんせず、脾臓に誘導されたストレス EP に FV が感染すると発がんすることが知られている。そこで、骨髄 EP と脾ストレス EP (フェニルヒドラジン投与による急性貧血または FV 感染にて誘導)との間にどのような違いがあるのかを調べ始めた。その過程において、脾ストレス EP では骨髄 EP と比較して強い NF-κB の活性化がみられることが明らかとなった。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

今回、定常時の B6 マウス骨髄細胞をフローサイトメトリーにより詳細に調べ、EP に発現する多数の分子(マーカー5 分子、部分発現分子その他多数)を確認した。今後はこれらを含めた分子の発現が脾ストレス EP においてどのように変化しているかを調べていく。

ひとつ注目されるのが、FV 誘発赤白血病における発がん因子 PU.1 の発現の変化である。PU.1 は骨髄球系の分化因子であり、赤血球分化因子 GATA-1 と対になる造血前駆細胞の運命決定因子とみなされるが、ヒトでは PU.1 の発現が NF- $\kappa$ B の制御を受けるとされており、実際 *PU.1* 遺伝子 DNA のプロモーター領域に NF- $\kappa$ B 結合ドメインが確認されている。さらに、この NF- $\kappa$ B 結合ドメインはマウスでも *PU.1* 遺伝子上流域に類似の配列があるが、その部位は SFFV プロウイルスが挿入しやすい部位の近傍である。もし NF- $\kappa$ B が *PU.1* 遺伝子の転写をうながすために、そのプロモーターにおけるクロマチン構造を変化させるとすれば、SFFV プロウイルスが脾ストレス EP においてのみ発がんを起こす理由を理解する大きな手掛かりとなりうる。

このような、脾ストレス EP にみられるエピゲノム変化について調べることが FV 誘発赤白血病の発症機序理解につながるのではないかと考えている。そのために、マウスから採取した脾ストレス EP、FV 白血病発症後脾細胞を用いて研究する予定であるが、そのプレ実験として既存の FV 白血病細胞株における PU.1 の発現状況、ならびに *PU.1* 遺伝子のプロモーターにおけるエピゲノム状態、NF- $\kappa$ B の結合などを調べることが可能であると思われる (FV 白血病細胞株においても NF- $\kappa$ B の活性化が観察される)。そのような方向性において、残り 1 年間で可能なところまで研究を進めていく。

### 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)
第 43 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)	2020 年 12 月 4 日