

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07581

研究課題名(和文)フレンドウイルス感染マウスモデルを用いた白血病発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms for leukemogenesis in Friend-virus infected mice

研究代表者

塚本 徹雄 (Tsukamoto, Tetsuo)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：80750223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではフレンドウイルス(FV)誘発赤白血病の発症維持機序をより明らかにすることを目的とし、マウスの正常骨髄赤血球前駆細胞とFV誘発赤白血病細胞とを解析した。まず、マウスのコロニー形成赤血球前駆細胞(CFU-E)を特徴づける複数のマーカー分子(細胞表面および細胞内)を同定した。その一方で、CFU-Eと比べてFV赤白血病細胞で発現が上昇している分子も複数同定した。それらFV赤白血病関連因子の解析を進め、赤白血病細胞の生存・増殖に関する複数因子の同定に成功した。その成果は赤白血病病態生理の解明に資するのみならず、古典的FV誘発赤白血病マウスモデルにより現代的な解釈を与えるものでもある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病の発症機序については不明な点が多いが、ストレスとの関連が注目され、研究が進められている。その一方で、古くから白血病のマウスモデルとして用いられてきたフレンドウイルス(FV)感染マウスモデルであるが、こちらも貧血や炎症に続発するストレス赤血球産生(stress erythropoiesis)が発症に関わっていることが明らかとなっている。

研究成果の概要(英文)：We here aimed to elucidate better the mechanisms for the onset and maintenance of leukemia. We analyzed murine bone marrow erythroid progenitors and Friend retrovirus (FV)-induced erythroleukemia cells. We first examined the phenotype of the colony-forming subset of erythroid progenitors (CFU-E) and identified several cell surface or intracellular markers. We further sought potential leukemia-associated factors overexpressed in FV-induced leukemia cells compared with normal CFU-E. Among those, we further identified several factors that support the survival and proliferation of leukemia cells. These results contribute to a better understanding of the pathogenesis of leukemia and help better interpret FV-infected mouse models.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フレンド赤白血病ウイルス 赤白血病 急性骨髄性白血病 赤血球前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フレンド白血病ウイルス(**FV**)を感染させたマウスは赤血球系の白血病(赤白血病)を発症することが知られている。その機序は赤血球前駆細胞への**FV**の感染によると考えられているが、詳細には不明な点が多い。そこで**FV**感染マウスが白血病を発症したあとに、白血病細胞で肥大化した脾臓から脾細胞を回収し、白血病幹細胞 (**LSC: c-Kit** 陽性 **Sca-1** 陽性)分画をフローサイトメトリー解析したところ、**T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3)**と**Galectin-9 (Gal-9)**の発現を認めた。これらはヒトの急性骨髄性白血病(**AML**)の**LSC**においても発現し、**LSC**の維持に関わっていることが報告されていた¹⁾。そこで**TIM-3**と**Gal-9**をきっかけとし、**FV**誘発赤白血病の発症維持機構を解析することができると考えた。一方、**AML**の発症にストレスが関与するといわれているが、**FV**誘発赤白血病でも貧血ストレス後の赤血球前駆細胞のみ白血病発症に関わるとされている²⁾。その点をより詳細に解析する必要性も考えられた。

2. 研究の目的

FV誘発赤白血病の発症機構をより詳細に解明することを目的とした。目標の詳細は以下のよう

(1) マウスの正常な骨髄赤血球前駆細胞(**EP**)を解析し、他の造血前駆細胞と比べて**EP**を特徴づけるマーカー分子の同定を目指した。

(2) 貧血ストレスにより誘導されたストレス**EP**を、非ストレス下の骨髄**EP**と比較し、両者の違いを明らかにすることを目指した。

(3) 骨髄**EP**と**FV**誘発白血病細胞株を比較し、白血病細胞において発現が変化している分子を探索した。

(4) **FV**白血病細胞の生存・増殖に関与している因子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 正常な**C57BL/6 (B6)**マウス成体の骨髄細胞を回収し、フローサイトメトリー解析を行った。**EP**は**c-Kit**陽性、**Sca-1**陰性、**CD71**陽性、**CD34**陰性細胞として同定をした。**EP**細胞分画における、各種細胞表面抗原、細胞内抗原の発現を調べた。

(2) **B6**マウス成体にフェニルヒドラジン(**PHZ**)を2日間(各**50mg/kg**)投与し、3日後に骨髄細胞、脾細胞を回収した。それぞれフローサイトメトリー解析を行い、非ストレス下骨髄**EP**と比較してストレス下**EP**に起こっているマーカー分子発現の変化を分析した。

(3) **Gal-9**が骨髄細胞に発現する意義を調べるため、**Gal-9**ノックアウトマウスの骨髄**EP**を上記と同様にフローサイトメトリー解析し、野生型(**B6**)マウス骨髄**EP**と比較解析した。

(4) **FV**白血病マウスに由来する**AA41**細胞株を、骨髄**EP**と同様にフローサイトメトリー解析し、正常骨髄**EP**と比較して発現の低下している分子、発現の上昇している分子、発現が維持されている分子をそれぞれ探索した。

(5) 事前に**FV**白血病細胞の生存・増殖に関与する可能性のある因子を同定した。それらの阻害薬を培養中の**FV**白血病細胞に加え、翌日にフローサイトメトリー解析を行った。阻害薬による細胞生存率、細胞増殖速度の変化を分析した。

4. 研究成果

(1) 正常な**B6**マウス骨髄に存在するコロニー形成**EP (CFU-E)**の表現型を詳細に調べ、他の造血前駆細胞(共通骨髄球系前駆細胞**CMP**、顆粒球・単球系前駆細胞**GMP**など)と比較検討した。その結果、**EP**を特徴づけるマーカー分子として、細胞表面抗原では**CAT-1**(カチオン性アミノ酸輸送体)と**CD105**の2分子、細胞内抗原では**Gal-9**、**GATA-1**(赤血球系分化因子)、**GLUT4**(グルコース輸送体4)、**mTOR**(哺乳類ラパマイシン標的)、**AMPK**(AMP活性化プロテインキナーゼ)、**CK2**(カゼインキナーゼ2)、**MST1R**(マクロファージ刺激タンパク質受容体)、**ACE2**(アンジオテンシン変換酵素2)、**Gal-3**、**iNOS**(誘導型一酸化窒素合成酵素)の10分子、計12分子が同定された。これらのうち、**Gal-9**、**CAT-1**、**mTOR**については定量**PCR**法により、**EP**における**mRNA**発現量が骨髄細胞全体よりも高いことを確認した。これらの結果より、**EP**の生理学的な特徴はまだ十分解明されていないことが示唆された。また、今回のマーカー分子同定がさ

らなる研究に寄与するものと期待される。

(2) PHZ 投与後のマウスから回収した脾臓のストレス EP を、非ストレス下の骨髄 EP と比較したところ、PU.1 (骨髄球分化因子)、MerTK (MER チロシンキナーゼ)の発現が脾ストレス EP で上昇することを見つけた。しかしそうした変化は脾細胞に限らず、PHZ 投与後のストレス下骨髄 EP でも PU.1 と MerTK の発現上昇がみられた。のみならず、PHZ 投与マウスにおいては骨髄 EP 細胞頻度も非ストレス下より有意に増加していたのである。一般にマウスのストレス赤血球産生の主座は脾臓であると考えられているが、これらの結果は骨髄における造血も貧血ストレスの影響で変化することを示唆している。

(3) Gal-9 KO マウスは正常に生育することが知られているが、実際我々が Gal-9 KO 成体マウスの血算を調べたところ、赤血球数、ヘマトクリットについて野生型(B6)マウスとの有意差を認めなかった。また Gal-9 KO マウスの骨髄細胞をフローサイトメトリー解析したところ、骨髄細胞中の EP (c-Kit+Sca-1⁺CD34⁻CD71⁺)は Gal-9 の発現を失ってはいたものの、その頻度などに異常はみとめられなかった。ところが、EP における上記マーカー分子の発現を調べたところ、Gal-9KO マウス EP では野生型に比べて AMPK の発現が有意に低下していた。このことから、野生型マウス EP に発現する Gal-9 が AMPK の機能、たとえば赤血球産生のためのエネルギー(ATP)維持などに関与している可能性が示唆された。

(4) B6 マウス骨髄 EP と AA41 白血病細胞株をフローサイトメトリーで比較したところ、AA41 においては CAT-1 の発現が失われていたが、PU.1、MerTK、NF- κ B、PD-L1 の発現が上昇していた。このうち PU.1 については、FV の構成要素であるレトロウイルスベクター(SFFV)が PU.1 プロモーターに挿入されて発現上昇が起こることが知られている。一方で、mTOR、AMPK の発現は骨髄 EP と AA41 の双方にみられ、赤血球産生においても白血病においても必要な因子であることが示唆された。

(5) AA41 細胞株を PU.1、mTOR、MerTK、NF- κ B、AMPK の阻害薬(それぞれ DB1976、rapamycin、MRX-2843、JSH-23、BML-275)存在下で培養する実験を実施した。その結果、MerTK、NF- κ B、AMPK の阻害により細胞の生存率、増殖速度が大きく低下することが分かった。一方、PU.1、mTOR の阻害による影響は限られていた。次に、PU.1、mTOR、MerTK、NF- κ B の阻害薬のひとつと AMPK 阻害薬との共阻害実験を試みたところ、mTOR、MerTK、NF- κ B の阻害薬が AMPK 阻害薬と相乗効果を示し、AA41 の生存率・増殖速度を大きく低下させることが分かった。最後に、これらのうち MerTK と AMPK の阻害薬が AA41 の生存・増殖を阻害する機序を調べる実験を実施した。まず MerTK については、MRX-2843 を添加することで、その下流因子である ERK1/2 (細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2)のリン酸化が阻害されることが分かった。AMPK については、その阻害により細胞内 ATP 量の低下と NAD(P)H 量の増加が観察された。そこで AA41 細胞をグルコース欠損培地で培養してみたが、細胞の生存・増殖にはほとんど悪影響がなく、かつ細胞内 ATP 量が保たれていた。しかしそこに AMPK 阻害薬を加えることで細胞が ATP 量を維持できなくなった。このことから、AMPK が栄養環境の変化に関わらず強力に白血病細胞の生存・増殖をサポートすることが明らかとなった。また共阻害実験の結果と合わせ、AMPK によるエネルギー代謝維持機構が白血病細胞維持機構(mTOR、MerTK、NF- κ B)の基礎となっている可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Shima T, Takayanagi S, et al. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell* 2015. 17(3):341-352 doi: 10.1016/j.stem.2015.07.011.
2. Hegde S, Hankey P, Paulson RF. Self-renewal of leukemia stem cells in Friend virus-induced erythroleukemia requires proviral insertional activation of Spi1 and hedgehog signaling but not mutation of p53. *Stem Cells* 2012. 30(2):121-130 doi: 10.1002/stem.781.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsukamoto Tetsuo, Nakamura Katsuki, Okada Seiji	4. 巻 49
2. 論文標題 Simian immunodeficiency virus infection and flow cytometric characterization of Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>) hematopoietic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Primatology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jmp.12460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 塚本徹雄	4. 巻 3
2. 論文標題 HIV感染症の造血系病態生理と将来の治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 771 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 塚本徹雄	4. 巻 4
2. 論文標題 将来のHIV感染症対策における中和抗体の可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 70 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukamoto Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and the Pathogenesis of HIV/AIDS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dunbar Paul R., Cartwright Emily K., Wein Alexander N., Tsukamoto Tetsuo, Tiger Li Zheng-Rong, Kumar Nivedha, Uddb?ck Ida E., Hayward Sarah L., Ueha Satoshi, Takamura Shiki, Kohlmeier Jacob E.	4. 巻 13
2. 論文標題 Pulmonary monocytes interact with effector T cells in the lung tissue to drive TRM differentiation following viral infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0224-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsukamoto Tetsuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Spontaneous HIV controllers might be the key to prevent accelerated immunosenescence of effector CD8+ T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIDS	6. 最初と最後の頁 2253 ~ 2255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/QAD.0000000000002343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塚本徹雄	4. 巻 34
2. 論文標題 HIV感染症への再生医学的アプローチ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 1361 ~ 1366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塚本徹雄、河原佐智代、宮澤正顯	4. 巻 34
2. 論文標題 フレンドウイルス感染マウスにおける白血病発症機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 629 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Tetsuo, Gorantla Santhi, Rodrigues Vasco	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial: Direct and Indirect Interactions of HIV With Host Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 771370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.771370	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 塚本徹雄	4. 巻 36
2. 論文標題 CAR-T細胞を用いた抗HIV療法開発の進展	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 1216-1219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukimoto Shota, Hakata Yoshiyuki, Tsuji-Kawahara Sachiyo, Enya Takuji, Tsukamoto Tetsuo, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Nakao Shinichi, Miyazawa Masaaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Distinctive High Expression of Antiretroviral APOBEC3 Protein in Mouse Germinal Center B Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 832 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14040832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塚本徹雄、博多義之、河原佐智代、中山隆志、岡田斉、宮澤正顯
2. 発表標題 マウス骨髄コロニー形成赤血球前駆細胞におけるGalactin-9発現のフローサイトメトリー解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本徹雄、仁木敏朗、博多義之、河原佐智代、中山隆志、岡田斉、宮澤正顯
2. 発表標題 Galectin-9欠損マウス新生児における造血前駆細胞の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 月本翔太、博多義之、塚本徹雄、塩谷拓嗣、宮澤正顯
2. 発表標題 FLAG-ノックインマウスを用いたAPOBEC3タンパク質の組織・細胞内局在の解析
3. 学会等名 近畿大学サイエンスネットワーク2019・第9回院生サミット
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高村史記、Dunbar P、Cartwright E、Wein A、塚本徹雄、Li Z、Kumar N、Uddback I、Hawyard S、上羽悟史、Kohlmeier J
2. 発表標題 マクロファージによる肺滞在型メモリーCD8T細胞分化誘導
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本徹雄、博多義之、河原佐智代、中山隆志、岡田斉、宮澤正顯
2. 発表標題 Detailed phenotypical analysis indicates the biology of Friend virus-induced erythroleukemia cells
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本徹雄、博多義之、河原佐智代、中山隆志、岡田斉、宮澤正顯
2. 発表標題 マウス赤血球前駆細胞におけるmTORとAMPKの同時活性化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Jose Das Neves, Tetsuo Tsukamoto, et al.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 MDPI	5. 総ページ数 208
3. 書名 Novel Approaches for the Delivery of Anti-HIV Drugs	

1. 著者名 Tsukamoto Tetsuo, Gorantla Santhi, Rodrigues Vasco	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Frontiers Media SA	5. 総ページ数 130
3. 書名 Direct and indirect interactions of HIV with host cells	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮澤 正顯 (Miyazawa Masaaki) (60167757)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------