

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

平成26年9月23日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学部附属病院 輸血細胞治療部

職 名・学 年 共同研究員

氏 名 林 嘉 宏

|                           |   |                    |  |
|---------------------------|---|--------------------|--|
| 助 成 の 種 類                 | 平成25年度・若手研究者在外研究支援・在外研究長期助成   |                    |  |
| 研 究 課 題 名                 | 骨髄異形成症候群の病態形成・進行におけるMLL-PTD変異とRUNX1変異の協調作用の解明   |                    |  |
| 受 入 機 関                   | アメリカ・シンシナティ小児病院医療センター<br>(Cincinnati Children's Hospital Medical Center)  |                    |  |
| 渡 航 期 間                   | 平成25年9月1日 ～ 留学継続中<br>助成対象期間:平成25年9月1日～平成26年8月31日  |                    |  |
| 成 果 の 概 要                 | タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )                       |                    |  |
| 会 計 報 告                   | 交付を受けた助成金額  | 250万円              |  |
|                           | 使用した助成金額  | 250万円              |  |
|                           | 返納すべき助成金額   | 0円                 |  |
|                           | 助成金の使途内訳  | 渡航費(航空券代、交通費):20万円 |  |
|                           |   | ホテル宿泊費(渡米直後):10万円  |  |
| 滞在費用(家賃、光熱費、食費、交通費):220万円 |   |                    |  |
|                           |   |                    |  |
| 当財団の助成について                | (今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)<br>留学期間は複数年に及びますが、特に留学初年度は渡航、生活の立ち上げなどで出費が多くなります。渡航前に全額を一括で支給していただいたこと、また幅広い使途をご許可いただいたことに大変感謝致しております。 |                    |  |

## 成果の概要 / 林 嘉宏

私は、2013年9月より米国オハイオ州にあるシンシナティ小児病院医療センター（Cincinnati Children's Hospital Medical Center; CCHMC）の実験血液学・腫瘍病態学部門、Huang 研究室において Research Fellow として研究に従事している。CCHMC は、国立衛生研究所（NIH）からの研究費獲得額、小児病院ランキングで常にトップクラスにランクされる、米国でも有数の研究および臨床の拠点である。病院に併設されている巨大な2棟の研究ビル（現在3棟目が建設中）には、成人領域を含め様々な分野および臓器の研究室が入り、世界中から多くの研究者が集まっている。実験血液学・腫瘍生物学部門には、造血器悪性腫瘍のみならず、造血幹細胞や造血異常、神経腫瘍など幅広い領域の研究室が数多く属し、研究室間の密な繋がりが構築されている。

Huang 氏は京都大学ウイルス研究所、伊藤嘉明 教授（当時）の下で RUNX1 の研究を開始され、PhD を取得された。その後、ボストン（Daniel G. Tenen 研究室、Harvard Medical School）、ニューヨーク（Stephen D. Nimer 研究室、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center）を経て、シンシナティで独立されている。研究室での会話は英語であるが、日本語も堪能である。Huang 氏は造血制御で重要な役割を果たす転写因子 RUNX1 の先駆的な研究者であり、またエピジェネティックな機序で標的分子の発現を制御する転写因子 Mixed lineage leukemia（MLL）およびその変異（MLL-partial tandem duplication）についても重要な報告を重ねている。

### 【研究内容】

骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome; MDS）は血球の異形成、無効造血、汎血球減少を呈し、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia; AML）や骨髄不全症への移行を特徴とする造血幹細胞の異常に起因する疾患である。MDS から移行した AML の治療成績は、*de novo* AML に比べて非常に悪く、さらなる病態の解明が望まれる。

MDS の病態は、細胞増殖や自己複製、分化の制御に関わる転写因子やクロマチン制御酵素などの遺伝子異常あるいはエピジェネティック異常に起因すると考えられている。MLL は正常造血において重要な役割を果たす転写因子であり、エピジェネティックな機序で標的遺伝子の発現を制御している。主な MLL 異常の一つ、MLL 遺伝子内の5'末端側で部分的に縦列重複を生じる partial tandem duplication (PTD) 変異は、MDS や AML においてしばしば認められる。Mll-PTD 変異ノックインマウスでは、造血幹細胞・前駆細胞の増殖能や自己複製能が亢進し、骨髄系細胞の分化が抑制されるものの、MDS や AML の発症は認められなかった。このことから、MDS、AML の発症において、さらなる遺伝子異常、エピジェネティック制御異常などの関与が示唆される。転写因子 RUNX1 の変異は、AML や MDS において高頻度にみられる。興味深いことに、MLL-PTD 変異を有する MDS、AML 症例において、高頻度に RUNX1 変異が認められることが報告されている。従って、MLL-PTD と RUNX1 変異の協調作用が MDS や AML の病態発症に深く関与するのではないかという仮説の下、以下の検討を行った。

RUNX1 の遺伝子変異のほとんどは機能喪失型の変異である。まず始めに MLL-PTD 病態における RUNX1 の機能的意義を明らかにするために、Mll-PTD ノックインマウスと Runx1 コンディシ

ヨナルノックアウトマウス (*Runx1<sup>flox/flox</sup>*) を交配し、*Mll-PTD/Runx1<sup>flox/flox</sup>* マウスを作製した。*Mx1-Cre* により *Runx1* を欠損させると、*Runx1* 欠損 *Mll-PTD* マウスでは多系統の異形成を伴う汎血球減少を認めた。貧血は大球性貧血であり、これらの所見は MDS 患者において見られるものと同様であった。次に、MDS 患者由来の *RUNX1* 変異について、*MLL-PTD* 病態における意義の検討を行った。レトロウイルスにて患者由来の *RUNX1* 変異を *Mll-PTD* マウスの骨髄細胞に導入し、この細胞を野生型マウスに骨髄移植した。*RUNX1* 変異導入 *Mll-PTD* 細胞を移植したマウスでは、大球性貧血、血小板減少、多系統の異形成を認めた。

*MLL-PTD* は造血幹・前駆細胞の自己複製能を亢進させることを、以前に Huang 研究室で明らかにしている。その機序について明らかにするために遺伝子発現解析を行ったところ、解糖系・糖新生経路の遺伝子群の発現が有意に亢進していた。この経路に参与する転写因子として Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) がよく知られている。*Mll-PTD* マウスの LSK (Lineage marker<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>) 細胞 (造血幹細胞が含まれる集団) において、HIF-1 $\alpha$  タンパクおよび HIF-1 $\alpha$  標的遺伝子の発現が野生型マウスに比べて有意に亢進していた。*MLL-PTD* の病態における HIF-1 $\alpha$  の意義を明らかにするために、まずはコロニー形成法を用いて薬物的阻害による検討を行った。*Mll-PTD* 細胞は HIF-1 $\alpha$  阻害剤への感受性が野生型細胞に比べて有意に高かった。*RUNX1* 変異導入 *Mll-PTD* 細胞は、他のマウス急性白血病細胞よりも HIF-1 $\alpha$  阻害剤への感受性が極めて高かった。次に、遺伝子的手法による検討を行った。*Mx1-Cre* により HIF-1 $\alpha$  を欠損させると、競合移植実験において Recipient マウスにおける *Mll-PTD* の造血再構築能が有意に低下した。*Runx1* 欠損 *Mll-PTD* マウスは MDS 様の病態を発症するが、HIF-1 $\alpha$  を欠損させることにより、病態の進行を有意に抑制することができた。

以上の結果から、*MLL-PTD* と *RUNX1* 変異・欠損は、マウスにおいて MDS 様の病態を発症することが明らかになった。また *MLL-PTD* による自己複製能亢進、病態形成および進行において HIF-1 $\alpha$  が重要な役割を果たすことが示された。本研究は MDS の病態に対するより深い理解とそれを基にした新たな治療戦略の構築に繋がる可能性を有していると考えられる。

この成果は、第 43 回国際実験血液学会 (2014 年 8 月 21 日~24 日、モントリオール、カナダ) において口頭発表し、ポスドクのコンペティション部門で賞 (3rd Place Christa Muller-Sieburg Award) をいただいた。現在、論文投稿の準備を進めている。

最後に、海外留学初年度の渡航、生活の立ち上げおよび滞在をご支援いただいた京都大学教育研究振興財団に深く感謝致します。