

## 慢性骨髄性白血病特異的 iPS 細胞を用いた新規治療標的の開発

正本庸介

東京大学 医学部附属病院 血液・腫瘍内科

### 【研究の背景】

リプログラミング技術の発展に伴い、自己複製能と分化万能性を併せ持つ iPS 細胞は、再生医療の実現のみならず病態解明のための疾患モデルとして大変期待されている。申請者の所属する研究室でも、様々な造血器疾患から疾患特異的 iPS 細胞を作製することに成功しており、その一つとして慢性骨髄単球性白血病 (CMML) 患者の末梢血 CD34 陽性細胞から CMML 腫瘍細胞由来 iPS 細胞 (CMML-iPS 細胞) を樹立することに世界で初めて成功した。さらに、樹立した iPS 細胞を血球へ分化させると、健常者の骨髄細胞由来 iPS 細胞から分化した血球に比べて増殖、単球分化の異常が見られ、元疾患の病態が再現された。すなわち、iPS 細胞を経て再分化させた CMML 患者由来の造血幹・前駆細胞 (CMML-HPC) が、CMML の病態解明における革新的な疾患モデルとなりうることを見出した。この新しいモデル細胞を用いて CMML の病態と関連が強い遺伝子を探索するため、CMML-HPC と健常者の骨髄細胞由来 iPS 細胞から得た造血幹・前駆細胞 (Normal-HPC) を用いて網羅的な遺伝子発現解析およびゲノム DNA メチル化解析を施行した。CMML-HPC において高発現しプロモーター領域のゲノム DNA が低メチル化状態となっている遺伝子の候補を抽出し、遺伝子 SLITRK4 に注目した。驚くべきことに、CRISPR/Cas9 を用いて CMML-iPS 細胞で SLITRK4 をノックアウトすると、CMML-HPC がほとんど得られなくなった。すなわち、SLITRK4 自体、あるいはその機能を抑えることが CMML の新しい治療戦略となると考えられた。

### 【目 的】

当研究室では疾患特異的 iPS 細胞化技術を用いて、これまでに存在しなかった CMML モデルを作製し、オミクス解析から病態形成に関わる鍵分子の候補を同定した。本研究では候補分子の CMML 発症に関わる役割や正常造血に及ぼす影響を調べる。また、下流シグナル経路を同定し新規の治療標的を発見する。

### 【方 法】

- (1) CMML-iPS 細胞を用いた SLITRK4 の機能解析
- (2) RNA 干渉による転写抑制が血球分化に及ぼす影響を解析した。iPS 細胞において shRNA を導入した場合、細胞毒性の影響で評価できなかったため、iPS 細胞を Sac 法により血球分化させた後に shRNA を導入し、CD34 陽性 CD43 陽性分画の造血前駆細胞においてコロニー形成能を評価した。
- (3) 正常マウスを用いた SLITRK4 の機能解析
- (4) SLITRK4 の白血病発症や分化異常に与える影響を検証するために、正常マウスの骨髄より採取した幼若造血細胞にレトロウイルスベクターで SLITRK4 を導入した。半固形培地で培養し、コロニー形成能や長期間増殖能の変化を調べた。また、細胞形態を観察し、表面抗原の解析を行った。
- (5) SLITRK4 下流シグナルの探索
- (6) OCI-AML3 は SLITRK4 のノックダウンにより細胞増殖能が低下することをすでに示している。また、SLITRK4 は細胞内ドメインにチロシン残基を有することから、MAPK 経路、PI3K/Akt 経路などのリン酸化シグナル経路の活性度について違いがないかをウエスタンブロット法により評価した。また、SLITRK4 の発現量の低いヒト白血病細胞株を用いて

SLITRK4 を過剰発現させ、同じようにリン酸化シグナル経路の活性度について評価した。

## 【結 果】

- (1) CMML-iPS 細胞を用いた SLITRK4 の機能解析
- (2) CMML-HPC、Normal-HPC それぞれにおいて、SLITRK4 の発現を抑制してコロニー形成能を調べたところ、CMML のみでコントロールと比較してコロニー形成能が減少することを確認できた。
- (3) 正常マウスを用いた SLITRK4 の機能解析
- (4) 正常マウス骨髄の幼若造血細胞に SLITRK4 を過剰発現させメソカルトで培養したが、コロニー形成能、形態、細胞表面抗原についていずれも変化は見られなかった。
- (5) SLITRK4 下流シグナルの探索
- (6) ヒト白血病細胞株である OCI-AML3、THP1 において SLITRK4 の発現を抑制させ、MAPK 経路、Akt 経路の活性度について評価したが、いずれも変化は見られなかった。また、SLITRK4 の発現量の低い HEL 細胞を用いて SLITRK4 を過剰発現させたが、増殖能に違いは見られなかった。同様に主要なリン酸化経路の活性度に違いは見られなかった。

## 【考 察】

本研究では難治性の血液がんである CMML に対して、新たな疾患モデルを駆使して同定した病態候補遺伝子 SLITRK4 を手掛かりに、これまで未解明であった CMML の発症および分化異常の制御に関わる機構の解析を進めた。CMML-iPS 細胞を分化させた CMML-HPC を用いた解析では、SLITRK4 の発現抑制時のコロニー形成能評価において Normal-HPC と比較してコロニー形成能の減弱することを見出した。この結果は、SLITRK4 が CMML に特異的で治療標的として有望であることを示唆している。一方で、SLITRK4 の制御シグナルを検索するために正常マウス骨髄における SLITRK4 の強制発現を行ったところ形態学的変化は認めなかった。さらに、SLITRK4 を強制発現した白血病細胞株における主要なリン酸化シグナル評価においては有意な変化を見出すに至らなかった。引き続き、SLITRK4 の制御する下流シグナルおよび制御遺伝子群の検索を網羅的に行うことで、標的治療の最適化を図り、CMML を克服する新規治療薬の開発を推進していく。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

CMML は病態が未解明の予後不良な血液がんである。CMML 患者に対する根治的治療は同種造血幹細胞移植であるが、発症が高齢のため治療関連死が多く新規治療法が求められている。ヒト臨床検体を用いた解析で、SLITRK4 は CMML において正常対照群と比べ高発現であったことから、新規の分子標的治療薬の良い候補になると考えられる。

## 【参考・引用文献】

Taoka K, Arai S, Kataoka K, Hosoi M, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Aixinjueluo W, Kobayashi T, Kumano K, Yoshimi A, Otsu M, Niwa A, Nakahata T, Nakauchi H, Kurokawa M. Using patient-derived iPSCs to develop humanized mouse models for chronic myelomonocytic leukemia and therapeutic drug identification, including liposomal clodronate. *Sci Rep.* 2018 Oct 26;8(1):15855.