

研究結果報告書

2018年 12月 12日

<研究課題>

高齢者におけるクローン性造血と造血器腫瘍化メカニズムの解明

代表研究者 東京大学大学院医学系研究科 助教 古屋 淳史

【まとめ】

本研究は、クローン性造血において検出頻度の高い DNMT3A 変異に着目し、Dnmt3a 変異ノックインマウスを用いてクローン性造血から造血器腫瘍に至る分子メカニズムを解明し、新規治療標的を同定することを目的とした。Dnmt3a R878C 変異によって 22 の有意に発現が変化している遺伝子を見出し、クローン性造血の形成の一因となっている可能性が示唆された。

1. 研究の目的

1-1. Dnmt3a R878C 変異ノックインマウス由来造血細胞の競合移植における優位性評価

我々は内在的な Dnmt3a 変異によって造血幹細胞分画が増幅することを示しているが、競合的骨髄移植モデルにおいて骨髄再構築能が上昇しているかを明らかにする。これは高齢者におけるクローン性造血の拡大が、Dnmt3a 変異によってのみによって説明する現象かを検証する研究である。

1-2. Dnmt3a 変異造血幹細胞において発現が変化している遺伝子の同定

Dnmt3a 変異による造血幹細胞分画の増幅に関する分子機構を明らかにする目的に、Dnmt3a R878C 変異ノックインマウス由来の造血幹細胞を用いて、遺伝子発現解析を行う。これは造血幹細胞分画の増幅に寄与している下流の標的遺伝子を同定する試みであり、クローン性造血形成の重要遺伝子を抽出できる可能性がある。それによって前白血病の段階で進展を止める新規治療法に関する基礎データを得ることを目的とする。

2. 研究方法と経過

2-1. Dnmt3a R878C 変異ノックインマウス由来造血細胞の競合移植における優位性評価

Dnmt3a R878C 変異ノックインマウスおよび同胞コントロールマウスから採取した骨

髄単核球と、レシピエントと同じ表現型である Ly5.1 マウスから採取した骨髄単核球をそれぞれ同数個ずつ、致死量の放射線を照射したマウスに骨髄移植した。経時的に末梢血を採取し、キメリズムを評価した。さらに、このレシピエントマウスから移植 18 週が経過した時点で骨髄造血細胞を採取し、新たなレシピエントマウスに移植することで骨髄再構築能の評価を行った。

2-2. Dnmt3a 変異造血幹細胞において発現が変化している遺伝子の同定

生後 8 週の Dnmt3a R878C 変異ノックインマウスおよび同胞のコントロールマウス 2 匹ずつから 2000 個の造血幹細胞をセルソーターにて単離し、RNA 抽出および逆転写による cDNA の抽出を行った。LightCycler 480 にてハウスキーピング遺伝子を含む 96 遺伝子の発現を評価し、造血幹細胞分画の増幅に寄与している遺伝子の同定を試みた。

3. 研究の成果

3-1. Dnmt3a R878C 変異ノックインマウス由来造血細胞の競合移植における優位性評価

一次競合移植において、4 週ごとの末梢血および移植後 18 週の骨髄のキメリズム解析を行ったが、Dnmt3a R878C 変異ノックインマウス由来造血細胞による競合性優位は示されなかった。二次移植についてもコントロールとの差は認められず、造血細胞全体での競合移植モデルでは Dnmt3a R878 変異によるクローン拡大効果は確認されなかった。

3-2. Dnmt3a 変異造血幹細胞において発現が変化している遺伝子の同定

Dnmt3a R878C 変異ノックインマウスおよび同胞コントロールマウスから、造血幹細胞をセルソーターで 2000 個単離し、遺伝子発現解析を行った。これまでに Dnmt3a 変異によって G0 期の造血幹細胞が増幅することが判明

していたため、特に細胞周期制御に関連する88遺伝子およびハウスキーピング遺伝子である8遺伝子に関してqRT-PCRによる解析を行った。その結果、22遺伝子に有意な発現変化を認め、現在これらの遺伝子について、実際にDnmt3aによる造血幹細胞分画の増幅に寄与しているか検証実験を行っている。

4. 今後の課題

今回の結果では、in vivo 骨髄内環境におけるDnmt3a R878C変異細胞の競合的優位性を実証することはできなかった。Dnmt3a R878C変異単独ではクローン性造血の拡大効果を有していない可能性も考えられるが、加齢モデルや、抗がん剤や放射線などのストレスモデルなどではDnmt3a変異による優位性が認められる可能性があるため、現在さらなる検証を行っている。さらに、DNMT3Aはゲノム全体のメチル化状態の変化を起こしているため、多くの遺伝子の発現に変化が起こることが予測されたが、実際に細胞周期制御関連遺伝子88の中で22遺伝子に有意な発現の変化が認められた。DNA損傷存在下におけるチェックポイント応答に密接にかかわっている遺伝子なども含まれており、現在詳細な機能解析を行っている。またさらに網羅的な遺伝子発現解析、DNAメチル化解析も行っており、Dnmt3a変異による造血幹細胞分画での遺伝子発現異常の全容を解明していく所存である。

5. 研究成果の公表方法

国内外の学会での発表および英語論文での発表を現在鋭意準備中である。

以上

