

中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所・特定拠点教授

ダウン症に合併する TAM をモデルとしたがんの発症と退縮に関わる
エピジェネティクスの解析

§1. 研究実施体制

(1) 中畑龍俊グループ

- ① 研究代表者: 中畑 龍俊 (京都大学・iPS 細胞研究所、特定拠点教授)
- ② 研究題目: ヒト iPS 細胞を用いた TAM/AMKL の再現と解析

(2) 伊藤悦朗グループ

- ① 主たる共同研究者: 伊藤悦朗 (弘前大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目: 臨床検体を用いた TAM/AMKL の解析

(3) 平家俊男グループ

- ① 主たる共同研究者: 平家 俊男 (京都大学・大学院医学研究科発達小児科学、教授)
- ② 研究題目: NOG マウスを用いた TAM/AMKL のエピゲノム解析
 - ・TAM/AMKL 細胞の NOG マウス移植系の確立と検証
 - ・患者および生着した細胞のエピゲノム解析
 - ・他グループで得られた知見の NOG マウス移植系での検証
 - ・エピゲノム異常を標的とした治療の開発

(4) 清水律子グループ

- ① 主たる共同研究者: 清水 律子 (東北大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・マウスモデルを用いた TAM/AMKL 病態形成メカニズムの解析

(5) 渡辺亮グループ

① 主たる共同研究者: 渡辺 亮 (京都大学 iPS 細胞研究所、特定拠点助教)

② 研究項目

・発がん過程で変化するエピジェネティクスの統合的解析

§ 2. 研究実施内容

研究の概要

本研究提案では、自然退縮する白血病様反応である、ダウン症に合併する一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis:TAM)をモデルとして、1)発がんとその退縮に関わるエピジェネティックな変化を明らかにする、2)真の白血病である急性巨核芽球性白血病に至るヒットとそれに伴うエピジェネティックな変化を明らかにする、および 3)ダウン症における胎児期のゲノム不安定性をもたらすメカニズムを明らかにする、ことを目標とする。これにより、がん化のメカニズムを理解するとともに、がんの退縮を制御する新しい治療法開発の基盤を形成することを目指す。

研究の成果

・中畑グループ

中畑グループでは、21 番染色体トリソミーを体細胞モザイクとしてもつダウン症患者の血液よりエピソーマルベクター法を用いて iPS 細胞の樹立を試みた。凡そ 100 個ほどのコロニーのピックアップを行い、約 70 クロンの樹立に成功した。現在これらのクロンの核型の解析を進めている。

・伊藤グループ

TAM/AMKL の臨床検体の *GATA1* 変異の解析を進めた。平成 24 年度は、サンガー・シーケンシング法による *GATA1* 変異の解析を 60 例の新規 TAM 症例で行い、ほとんどの症例で *GATA1* 変異を同定した。平家グループにより NOG マウスに移植され生着が得られた 11 例中 3 例の TAM 細胞で、primary の TAM 細胞と同一の *GATA1* 変異を同定した。この内 1 例では primary の TAM 臨床検体とは異なる *GATA1* 変異が検出された。そこで、TAM 臨床検体を mutation-specific restriction enzyme digestion assay で解析したところ、NOG で見られた *GATA1* 変異をもつマイナー・クロンが検出された。この結果は、primary TAM 細胞には異なる *GATA1* 変異をもつ複数のクロンが存在していることを示唆している。

・平家グループ

平家グループでは、in vitro での長期維持が困難な TAM 細胞を長期にわたり増殖させることのできる、NOG マウスを用いた新規の異種移植系を確立することで、TAM 細胞の白血病化の過

程を再現することを試みた。TAM 患者より末梢血を採取し、TAM 芽球を含む単核球分画を分離し、放射線照射した成体 NOG マウスの尾静脈より移植した。これまでに 11 例施行し、うち 3 例で NOG マウスへの生着を確認した。生着した細胞は、TAM 患者でみられる芽球と同様の形態的特徴を有しており、表面抗原解析、GATA-1 遺伝子変異解析でも患者検体と同様の特徴を有していた。さらに生着した 3 例のうち 1 例では継代移植で生着を確認し、長期の維持が可能であった。この症例から移植されたマウス内の TAM 由来細胞において、初発 TAM 患者検体には見られなかった染色体異常および DNA コピー数異常(CNA)が観察され、それらは ML-DS に特徴的なものであった。本症例は後に実際に ML-DS を発症した。このことから本実験系は TAM から ML-DS への移行過程を再現している可能性が高いと考えられた。さらに同一患者検体を複数のマウスに移植し、解析を行ったところ複数の CNA が再現性を持って異なるマウス間で観察され、TAM 期の細胞の遺伝的多様性が明らかとなった。

・清水グループ

清水グループでは、TAM/AMKL と同様の GATA1-S を発現するトランスジェニックマウスと GATA1 遺伝子破壊マウスを交配して得られる TAM モデルマウスを用いて、TAM の発症および消退にかかわるエピゲノム解析を行うことを目的としている。平成24年度は、GATA-S 発現量の異なる二系統マウスの胎児肝臓より、それぞれ巨核球系マーカーCD41を指標に巨核球の単離を行った。

・渡辺グループ

DNA メチル化やヒストン修飾、さらには GATA1 の DNA 結合性などのエピゲノム解析を行うことによって、ゲノム変異では説明できない TAM の病態解明に迫るための新しい手法の開発を行った。平成 24 年度は、ディープシーケンシング及びバイオインフォマティクスによる ChIP-seq 及び RNA-seq の系の立ち上げと基礎データの収集を行った。また、HiSeq2000 を用いた ChIP 及び RNA-seq のデータ解析のパイプラインを完成させた。BWA によるマッピング、MACS によるピーク検出、及び Cufflinks や TOPHAT による RNA 発現量の定量化といった一連のパイプラインを Galaxy によって自動処理できるシステムにした。さらに、マイクロ流路を応用させたデバイス及び非バイアス増幅系を用い、微量のサンプルに対する ChIP-seq や RNA-seq の系を確立させた。例えば、従来の RNA-seq は 100ng の RNA が必要だったが、約 50 個の細胞に相当する 0.5ng からの解析を可能にした。また、単一細胞 RNA-seq を行い、qPCR と相関があることを示した。

今後の見通し

TAM の臨床検体は順調に収集されている。50 例以上の新規症例の蓄積が予想される。目的の研究を推進するために十分な臨床検体の収集が可能と思われる。NOG マウス移植系を用いて、前白血病状態である TAM が白血病である ML-DS へ移行する過程での、さらに詳細

な遺伝的变化およびエピジェネティックな変化を追跡する。また中畑グループにより作成された患者由来 iPS 細胞を血球へ分化させた後に、NOG マウス(成体および新生仔)への移植を行い、骨髄・肝それぞれの造血ニッチェが TAM/ML-DS 発生において、ゲノムおよびエピゲノムに与える影響を検討する予定である。これら、iPS 細胞・ヒト・マウス由来の試料に対して網羅的エピゲノム解析を進めつつ、単一細胞における遺伝子発現の解析方法の開発を重点的に行う。これにより、細胞内のヘテロ性を遺伝子解析によって明らかにする。