

氏名	もりや くにひこ 森谷 邦彦
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	ヒト化マウスを用いた MLL キメラ遺伝子関連白血病モデルの開発
論文審査委員	主査 教授 呉 繁夫 教授 石井 直人 教授 張替 秀郎 教授 松原 洋一

論文内容要旨

近年小児白血病の治療成績の向上は目覚ましく、その 5 年無病生存率は急性リンパ性白血病 (ALL) で 80% 以上、急性骨髄性白血病 (AML) で 60% 以上を超える時代となったが、1 歳未満の乳児白血病の 5 年無病生存率は 50% 未満であり、他の病型に比して予後不良である。乳児白血病の 80% 以上に染色体 11q23 に存在する Mixed lineage leukemia (MLL) 遺伝子の再構成を認め、これが予後不良の一因と考えられ、MLL キメラ遺伝子関連白血病発症機構の解明は急務である。

白血病の動物モデルとして、マウス内にマウス造血幹細胞 (HSC) 由来の白血病を惹起するものや、ヒト白血病患者由来の白血病細胞を免疫不全マウスに移植するモデルが広く用いられてきた。しかし、マウスとヒトとでは HSC の性質が異なることが知られており、ヒトの HSC を用いたモデル化が必要と考えられていた。本研究では、乳児白血病の代表的な原因キメラ遺伝子である MLL-AF10 を臍帯血由来ヒト CD34⁺ HSC に遺伝子導入し、超免疫不全 NOD/Shi-SCID/ γ c^{null} (NOG) マウスに移植することでマウス内ヒト血球細胞分化異常を惹起し、ヒト正常 HSC 由来のヒト白血病を *in vivo* で発症させる動物モデルの開発を試みた。

MLL-AF10 を単独で HSC に導入し NOG マウスに移植した場合は特定の細胞への分化偏向を認めず、多系列の血球細胞分化の亢進を認めた。しかし、マウスの寿命内にて白血病を発症しなかった。従来報告では、MLL-AF10 を導入されたマウス造血幹細胞では骨髄系細胞への分化偏向が惹起され、最終的に急性骨髄性白血病が発症することから、MLL-AF10 の血球細胞分化に対する効果の点でヒト HSC とマウス HSC での違いが示された。さらに、ヒト MLL キメラ遺伝子関連 AML において *ras* 経路の遺伝子異常が関係していることが知られていたため、K-*ras* の活性化型変異体を MLL-AF10 と同時に HSC に導入し NOG マウスへ移植した。その結果、移植 8 週後に全てのマウスが急性単球性白血病 (FAB 分類 M5) を発症し、ヒト HSC 由来白血病をマウス内に発症させることに成功した。活性化型 K-*ras* 単独では白血病を発症しなかったことから、本研究で開発した白血病動物モデルは、ヒト白血病の 2 ヒットモデルとしても有用であると考えられた。

審査結果の要旨

博士論文題目 ヒト化マウスを用いた MLL キメラ遺伝子関連白血病モデルの開発

所属専攻・分野名 医科学専攻 小児病態学 分野

学籍番号 氏名 森谷 邦彦

近年小児白血病の治療成績の向上は目覚ましく、その5年無病生存率は急性リンパ性白血病(ALL)で80%以上、急性骨髄性白血病(AML)で60%以上を超える時代となったが、1歳未満の乳児白血病の5年無病生存率は50%未満であり、他の病型に比して予後不良である。乳児白血病の80%以上に染色体11q23に存在するMixed lineage leukemia(MLL)遺伝子の再構成を認め、これが予後不良の一因と考えられ、MLLキメラ遺伝子関連白血病発症機構の解明は急務である。

白血病の動物モデルとして、マウス内にマウス造血幹細胞(HSC)由来の白血病を惹起するものや、ヒト白血病患者由来の白血病細胞を免疫不全マウスに移植するモデルが広く用いられてきた。しかし、マウスとヒトとではHSCの性質が異なることが知られており、ヒトのHSCを用いたモデル化が必要と考えられていた。本研究では、乳児白血病の代表的な原因キメラ遺伝子であるMLL-AF10を臍帯血由来ヒトCD34⁺HSCに遺伝子導入し、超免疫不全NOD/Shi-SCID/γc^{null}(NOG)マウスに移植することでマウス内ヒト血球細胞分化異常を惹起し、ヒト正常HSC由来のヒト白血病をin vivoで発症させる動物モデルの開発を試みた。

MLL-AF10を単独でHSCに導入しNOGマウスに移植した場合は特定の細胞への分化偏向を認めず、多系列の血球細胞分化の亢進を認めた。しかし、マウスの寿命内にて白血病を発症しなかった。従来報告では、MLL-AF10を導入されたマウス造血幹細胞では骨髄系細胞への分化偏向が惹起され、最終的に急性骨髄性白血病が発症することから、MLL-AF10の血球細胞分化に対する効果の点でヒトHSCとマウスHSCでの違いが示された。さらに、ヒトMLLキメラ遺伝子関連AMLにおいてras経路の遺伝子異常が関係していることが知られていたため、K-rasの活性化型変異体をMLL-AF10と同時にHSCに導入しNOGマウスへ移植した。その結果、移植8週後に全てのマウスが急性単球性白血病(FAB分類M5)を発症し、ヒトHSC由来白血病をマウス内に発症させることに成功した。活性化型K-ras単独では白血病を発症しなかったことから、本研究で開発した白血病動物モデルは、ヒト白血病の2ヒットモデルとしても有用であると考えられた。

以上は、ヒト白血病の発生を動物モデルで再現した画期的な研究であり、学位論文としてのふさわしい内容である事を認める。

審査結果の要旨

博士論文題目 転写因子 Nrf2 は増殖細胞においてペントースリン酸経路とグルタミン代謝を制御して細胞増殖を促進する

所属専攻・分野名 医科学 専攻・呼吸器病態学 分野

学籍番号 A 8MD5133 氏名 光石 陽一郎

本研究の背景として、酸化ストレス応答の鍵因子として生体防御の中心的役割を果たしている転写因子 Nrf2 は、ジェネティックまたはエピジェネティックな原因で NRF2 が恒常的に安定化していることが、様々なヒトのがん症例で近年報告され、なおかつ非小細胞肺癌ではそれが予後不良因子となっていることがある。がん細胞を含む増殖細胞の代謝の様式は、分化して静止期にある細胞と大きく異なり、グルコースとグルタミンを大量に消費して同化反応を活性化していることが知られている。多くのがん遺伝子とがん抑制遺伝子は、グルコースやグルタミンの取り込みとその代謝経路に作用することで細胞増殖を制御している。ペントースリン酸経路(Pentose Phosphate Pathway: PPP)は、核酸の新規合成におけるリボース 5 リン酸の供給と NADPH 産生に重要な代謝経路であるが、その直接の制御因子はこれまで知られていない。これまでに Nrf2 の細胞増殖機序における役割に関しては十分に解明されていないことに着目して本研究はなされた。

得られた結果としては、第一に、NRF2 が恒常的に安定化している 4 種類の細胞株を用いて siRNA 法で NRF2 をノックダウンすると増殖抑制が観察され、NRF2 が細胞増殖を促進していることが示唆されことから、マイクロアレイ解析と全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス解析を施行して Nrf2 の直接の標的遺伝子を同定することを試みた。その結果、Nrf2 が PPP の主要酵素であるグルコース・6-リン酸デヒドロゲナーゼ(glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD))、ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ(phosphogluconate dehydrogenase (PGD))、トランスケトラーゼ(transketolase (TKT))そしてトランスアルドラーゼ(transaldolase (TALDO1))を直接制御していることを見いだした。

第二に、メタボローム解析により Nrf2 がグルタミン酸システインリガーゼ(glutamate-cysteine ligase(GCL))とリンゴ酸酵素(malic enzyme 1 (ME1))を制御してグルタミンの代謝(グルタチオン合成と glutaminolysis)を促進することも見いだした。G6PD と TKT を同時にノックダウンすることにより個体モデルでの腫瘍増大を遅延させたので、Nrf2 による細胞増殖促進には PPP 機能が必要であるといえる。

第三に、肝臓と消化管の遺伝子発現プロファイルの比較より、正常細胞でも PI3K-Akt 経路の活性化している増殖組織(消化管上皮)では Nrf2 が代謝関連遺伝子を活性化することができるが、PI3K-Akt 経路の活性化していない静止期にある組織(肝臓)ではこれらを効率的に活性化することができないことを示した。

最後に、その静止期にある肝細胞で強制的に増殖シグナル(PI3K)を活性化させると Nrf2 が代謝関連遺伝子を効率的に活性化することを示した。PI3K-Akt 経路の活性化した状態では NRF2 の核蓄積量が増加するのとともにリン酸化 Akt 量も増加していることが観察され、PI3K-Akt 経路は Nrf2 を、Nrf2 は PI3K-Akt 経路をそれぞれ増強し合っていることが示唆された。

本研究は、Nrf2 が細胞増殖において重要な PPP の直接の制御因子であることを初めて明らかにした。増殖シグナルが活性化した状態で、Nrf2 は従来のストレス応答機能を増強させるだけでなく、その機能を拡張し細胞増殖に有利な代謝様式の確立に貢献し、さらに Keap1-Nrf2 系と PI3K-Akt 経路の相乗的な関係はがんの悪性化をもたらす重要な機序の 1 つと考えられ、PI3K-Akt 経路と同様に Keap1-Nrf2 系もがん治療において有望な標的であることを示した。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として十分に値し、合格と認める。