

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09496

研究課題名(和文) PIGA遺伝子変異造血幹細胞の選択的増殖におけるCD109分子とTGF- β の役割

研究課題名(英文) The role of CD109 and TGF-beta for the preferential commitment of PIGA mutant HSPCs in immune-mediated bone marrow failure.

研究代表者

山崎 宏人 (Yamazaki, Hirohito)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：50361994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β 副受容体であるGPIアンカー膜蛋白CD109が、PIGA遺伝子変異造血幹前駆細胞(HSPC)の優先的活性化に関与しているか否かを明らかにするため、白血病細胞株TF-1のCD109をノックアウト(KO)し、野生型との間で、TGF- β に対する感受性を比較した。その結果、CD109KO TF-1細胞では野生型TF-1細胞に比べてTGF- β によるリン酸化SMAD2の誘導が低下し、TGF- β による細胞増殖の抑制が起こりにくいことが明らかになった。PIGA遺伝子変異HSPCは、TGF- β の作用増強を担うCD109の欠失によりTGF- β による抑制を免れて造血に寄与しやすくなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine whether a TGF-beta (b) co-receptor CD109 on hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) play a role in the preferential commitment of PIGA mutant HSPCs in patients with immune-mediated bone marrow failure (BMF), we established CD109-knock out (KO) TF-1, a GM-CSF-dependent myeloid leukemia cell line, using the CRIPR/Cas9 system, and compared the sensitivity of CD109KO TF-1 cells to TGF-b to that of wild-type (WT) TF-1 cells. The TGF-b treatment induced pSMAD2 in CD109KO TF-1 cells to a significantly lesser degree than in WT TF-1 cells. The proliferation of CD109KO TF-1 was inhibited by TGF-b also to a lesser degree than WT TF-1 cells. The results suggest that CD109, a glycosylphosphatidylinositol anchor protein, plays an enhancing role in the TGF-b signaling in HSPCs, and the lack of CD109 may make the HSPCs less sensitive to TGF-b, leading to the preferential commitment of the PIGA mutant HSPCs in immune-mediated BMF, in which TGF-b suppresses activation of WT HSPCs.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 CD109 TGF PIGA遺伝子変異造血幹前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)や骨髓異形成症候群のうち免疫病態によるものでは、glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー膜蛋白を欠失した発作性夜間血色素尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PNH)型血球がしばしば検出される。この機序として、PNH型血球を産生する *PIGA* 遺伝子変異造血幹前駆細胞(hematopoietic stem progenitor cell: HSPC)が、正常HSPCに比べて細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)やNK細胞による攻撃を受けにくいために、相対的に生き残るという「エスケープ仮説」が提唱されてきた。

我々は多数のPNH型血球陽性再不貧患者のPNH型血球を解析することにより、このメカニズムに関して以下のことを明らかにしてきた。

(1)PNH型血球陽性再不貧患者の中にはT細胞やB細胞のような非造血細胞だけにPNH形質の細胞を認める例がある。このような例でも起こっていることはリンパ球減少ではなく、汎血球減少であることから、*PIGA* 遺伝子変異HSPCをエスケープさせるメカニズムはCTLからの回避ではなく、何らかの免疫反応をきっかけに産生される「造血抑制性サイトカインに対する低感受性」であると考えられる。

(2)PNH型T細胞は、同じ患者の正常形質T細胞に比べてTGF- β による細胞増殖抑制作用を受けにくい。

(3)GM-CSF依存性骨髓性白血病細胞株TF-1からPNH型TF-1を作製し、TGF- β に対する感受性を野生型(WT)のTF-1と比較したところ、PNH型TF-1の増殖や細胞周期は、WT TF-1に比べてTGF- β による抑制を受けにくいことが明らかになった(図1)。

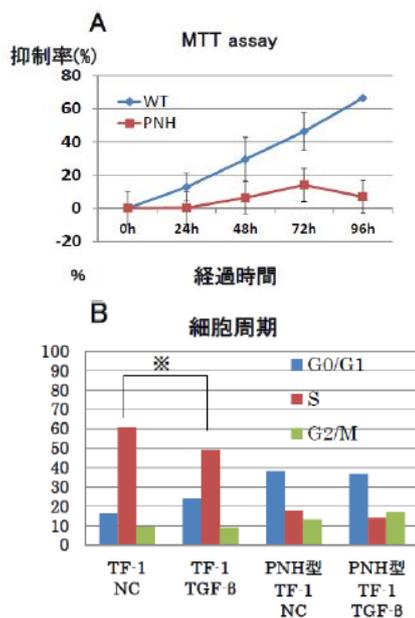


図1. PNH型TF-1細胞と野生型(WT)TF-1細胞に対するTGF- β の細胞増殖(A)および細胞周期(B)抑制効果

これらの結果から、HSPCにはTGF- β による抑制性シグナルを増強するGPIアンカー型のレセプターが発現しており、TGF- β のような造血幹細胞を静止期に保つサイトカインと、IL-1やトロンボポエチンなどの造血幹細胞を細胞周期に誘導するサイトカインの両者が存在している誘導的造血状態では、このGPIアンカー型レセプターを欠く*PIGA*遺伝子変異HSPCが正常HSPCに比べて優先的に活性化され、その結果末梢血にPNH型血球が出現すると考えられた。

そこで我々は、TGF- β のシグナル伝達に関与していることが知られている唯一のGPIアンカー膜蛋白型レセプターであるCD109に着目した。CD109は活性化T細胞やCD34陽性細胞の一部に発現していることが知られているが、それらの造血細胞におけるCD109の機能は不明であった。

なお、これまでの我々の研究により、CD109は、TF-1やKG1aなどの未分化な骨髓系白血病細胞株やCD3陽性細胞中のCD123陰性CD45RA陰性細胞(megakaryocyte-erythroid progenitors; MEPs)にも発現していること、また、PIPL-Cで処理したTF-1細胞の上清中にTGF- β と結合する蛋白としてウエスタンブロッティング法で検出されることが示されている。

2. 研究の目的

再不貧のような自己免疫性の造血不全患者の末梢血では、GPIアンカー膜蛋白が欠失したPNH形質の血球がしばしば検出されるが、これを産生する*PIGA*遺伝子変異HSPCが、どのようにして頻りに造血を支持するようになるのかはまだ解明されていない。背景で述べたように、我々は、これまでの検討により、TGF- β のco-receptorであるGPI膜蛋白CD109の欠失が*PIGA*遺伝子変異HSPCの優先的増殖に関与していることを示唆する所見を得てきた。そこで、CD109が実際の*in vivo*に関わっているか否かを明らかにするため、C57BL/6JslcマウスのHSPCにおけるCD109の局在を検討するとともに、CD109をノックアウト(KO)したTF-1細胞を作製することにより、*PIGA*遺伝子変異HSPCの「エスケープ現象」におけるCD109分子・TGF- β の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ヒト臍帯血を用いて、CMP、GMP、MEPの各造血前駆細胞にもCD109が発現しているか否かを検討する。また、臍帯血由来のCD34陽性細胞をTGF- β で刺激することにより、リン酸化SMAD2の発現増強がPhospho Flowで検出できるか否かを検討する。

(2)CRISPR/Cas9システムを用いて、GM-CSF依存性の骨髓性白血病細胞株TF-1におけるCD109分子をKOし、Mock-transfected TF-1細胞との間でTGF- β に対する感受性を比較する。

(3) *in vivo*におけるCD109の役割を明らかにするため、C57BL/6Jslc野生型およびCD109 KO マウスの骨髄から LSK、CD34(-)LSK、CD34(+)LSK、GMP、MEP におけるCD109発現をRT-PCR法により検討する。

(4) 野生型TF-1細胞・CD109 KO TF-1細胞のTGF- β に対する感受性を、MTTアッセイによる増殖能、Phospho Flowを用いたリン酸化SMAD2発現レベル(MFI)の検出、などにより比較する。

(5) 健常者骨髄CD34陽性細胞サブセットにおけるCD109の発現と、TGF- β によるpSMAD2誘導との関係性を評価する。

4. 研究成果

まず、マウスの*in vivo*造血におけるCD109の役割を明らかにするため、C57BL/6Jslc野生型マウスの造血幹細胞分画におけるCD109発現を検討した。

マウスのCD109をフローサイトメトリーで検出するためのよい抗体が入手できなかったため、野生型およびCD109 KO マウスの骨髄から LSK、CD34(-)LSK、CD34(+)LSK、GMP、MEP におけるCD109発現をRT-PCR法により検討した。その結果、CD109遺伝子発現は成熟血液細胞では認められたが、造血幹細胞および造血前駆細胞ではみられなかった。このため、CD109は、TGF- β によるマウスの造血調節には関わっていないことが示唆された。

次に、ヒトHSPCにおけるCD109発現の局在を明らかにするため、ヒト骨髄および臍帯血のCD34陽性細胞を検討したところ、CD109は、GMP、MEPに加えて未分化なCD34+CD38-細胞の一部にも発現していることが明らかになった。また、臍帯血由来のCD34陽性細胞をTGF- β で刺激することにより、pSMAD2の誘導がPhospho Flowで検出できることを確認した。

TF-1細胞におけるCD109分子のノックダウンをsiRNAで試みたところ、CD109の部分的な発現低下は認められたが、完全欠失細胞は得られなかった。このためCRISPR/Cas9システムを用いたところ、CD109の完全欠失細胞が得られた(図2)。

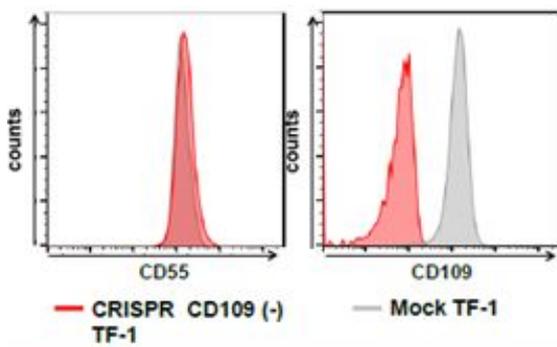


図2. CD109 (-)TF-1細胞と Mock TF-1細胞におけるCD55およびCD109の発現

MTTアッセイを用いて増殖能を比較したところ、TGF- β の添加により、mock-transfected TF-1細胞の増殖は $56\% \pm 2\%$ 抑制されたが、CD109KO TF-1細胞では $37\% \pm 2\%$ しか抑制されなかった。このため、CD109をKOすることによって、TGF- β 刺激による細胞増殖抑制効果が減弱することが示唆された(図3)。

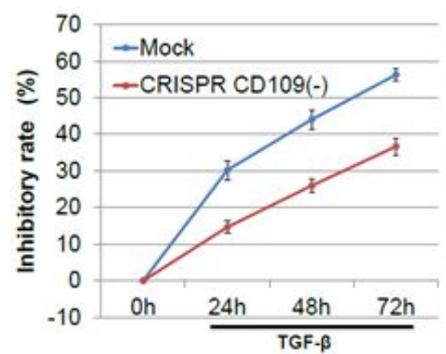


図3. MTTアッセイを用いたCRISPR CD109(-)細胞とMock細胞の増殖能の比較

次に、両細胞を用いて、先の実験で確立したPhospho Flowを用いてTGF- β によるpSMAD2誘導レベル(MFI)を比較した。Mock-transfected TF-1細胞ではTGF- β 刺激後のpSMAD2の誘導が 9.8 ± 2.4 の細胞にみられたが、CD109KO TF-1細胞では 7.6 ± 1.7 と低下していた。この結果からTF-1細胞では、CD109が、TGF- β 刺激によるpSMAD2誘導を増強することが示唆された(図4)。

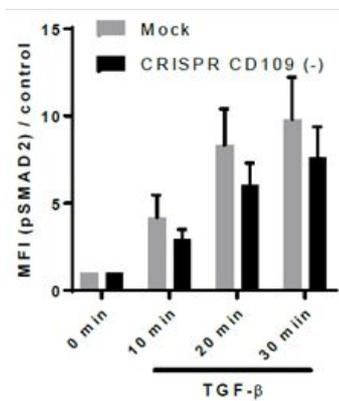
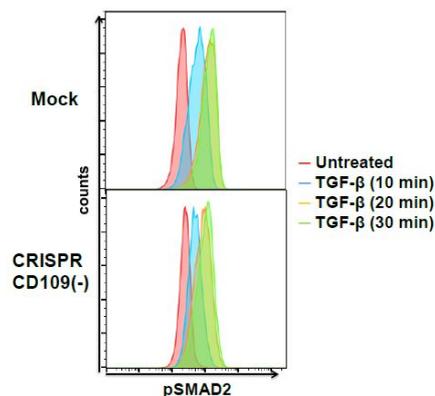


図4. TF-1細胞とMock TF-1細胞におけるリン酸化SMAD2発現レベル(MFI)の比較

以上の結果から、HSPC において CD109 は、TGF- β の作用を増強する作用を担っており、PIGA 遺伝子変異を来した HSPC は、CD109 欠失の結果、TGF- β による抑制を免れて造血に寄与しやすくなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Maruyama H, Katagiri T, Kashiwase K, Shiina T, Sato-Otsubo A, Zaimoku Y, Maruyama K, Hosokawa K, Ishiyama K, Yamazaki H, Inoko H, Ogawa S, Nakao S. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia. *Exp Hematol* 2016;44:931-939. 査読有.

Saito C, Ishiyama K, Yamazaki H, Zaimoku Y, Nakao S. Hypomegakaryocytic thrombocytopenia (HMT): an immune-mediated bone marrow failure characterized by an increased number of PNH-phenotype cells and high plasma thrombopoietin levels. *Br J Haematol* 2016;175:246-251. 査読有.

Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol* 2015;95:230-238. 査読有.

山崎 宏人. 再生不良性貧血. *臨床血液* 2015;56:2153-2159. 査読有.

[学会発表](計4件)

山崎 宏人. 再生不良性貧血の病態診断と治療選択. 第65回日本輸血・細胞治療学会総会. 2017年6月23日. 幕張

Nakagawa N, Hosokawa K, Espinosa L, Maruyama K, Katagiri K, Yamazaki H, Nakao S. Relatively low sensitivity of CD109(-) hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) to TGF- β : A possible mechanism responsible for the preferential commitment of PIGA mutant HSPCs in immune-mediated bone marrow failure. 第58回米国血液学会議. 2016年12月3日. サンディエゴ(アメリカ)

Yamazaki H, Sugimori N, Maruyama K, Zaimoku Y, Maruyama H, Nakagawa N, Saito C, Imi T, Sugimori C, Ishiyama K, Nakao S. Prevalence of PNH-type cells in cases of chronic thrombocytopenic that can be diagnosed with ITP. 第78回日本血液学会学術集会. 2016年10月14日. 横浜

Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Maruyama K, Nakagawa N, Hosokawa K, Ishiyama K, Yamazaki H, Nakao S. Evidence that T cells specific for non-hematopoietic cell trigger the development of acquired aplastic anemia. 第57回米国血液学会議. 2015年12月5日. オーランド(アメリカ)

[図書]

該当なし

[産業財産権]

出願状況

該当なし

取得状況

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 宏人(YAMAZAKI, Hirohito)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 50361994

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

中尾 眞二(NAKAO, Shinji)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 70217660

(4)研究協力者

該当なし