

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22130002

研究課題名（和文）ヒト癌幹細胞の同定と生体内機能解析システムの構築

研究課題名（英文）Identification and in vivo analysis of human cancer stem cells

研究代表者

赤司 浩一（Akashi, Koichi）

九州大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80380385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 305,400,000円

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞の機能を詳細に解析するためには、生着効率の高い異種移植システムが不可欠である。従来型の免疫不全マウスでは十分なヒト細胞の生着が得られないため、我々は、SIRPA遺伝子多型に基づくマクロファージ寛容を導入した次世代免疫不全マウスB6.Rag2nullIL2R^{null}SIRPANOD/NOD(BRGS)を樹立した。この系を用いることで、(1)成熟B細胞腫瘍である慢性リンパ性白血病において造血幹細胞レベルに異常が見出されること、(2)骨髄性白血病幹細胞の生存・自己複製強化にTIM-3/galectin-9のautocrine loopが重要な働きを担っていることを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：To analyze the function of human cancer stem cells in vivo, the xenograft model that permits an efficient engraftment of human cells is necessary. Because the traditional IL-2R^{null}-NOD/SCID (NOG) mouse system is not sufficient for this purpose, we newly developed a B6.Rag2nullIL2R^{null}SIRPANOD/NOD (BRGS) mouse line that possesses a macrophage tolerance based on a SIRPA polymorphism. By using this xenograft system, we have shown that self-renewing hematopoietic stem cells are primary target in the pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. Furthermore, we demonstrated that T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) is expressed on surface of self-renewing leukemic stem cells (LSCs) in acute myeloid leukemia (AML) and that TIM-3 and its ligand, galectin-9 (Gal-9), constitute an autocrine loop critical for human AML LSC development.

研究分野：幹細胞学

キーワード：白血病幹細胞 異種移植

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、癌幹細胞ニッチを生存の場として生体内に癌組織を構築するが、この過程を知るためには、ヒト生体癌における癌幹細胞の同定と純化法を確立した上で、ヒト癌幹細胞による癌組織形成の人為的な再構築を可能にする必要があると考えられていた。造血器癌においては、急性白血病の幹細胞は既に同定されていたが、高齢者に頻発する骨髄異形成症候群、さらに骨髄腫・リンパ球性白血病などのリンパ系腫瘍の幹細胞は、未だ同定されていなかった。また、ヒト固形癌においては癌幹細胞分離成功例の報告が少ない上に、その候補分画の定義にも一定の見解は得られていなかった。このように、ヒト癌組織形成過程の生体内再構築が進まない大きな原因は、以下の2点に集約されると考えられていた。

(1) 現時点で得られるヒト癌幹細胞の純度が低い(細胞側要因)

(2) ヒト癌幹細胞を生体内でアッセイする移植システムの効率が未だ十分でない(ホスト側要因)

このような背景のもと、新学術領域研究「癌幹細胞を標的とする腫瘍根絶技術の新構築」を立案し採択された。

2. 研究の目的

(1) まず、癌幹細胞による腫瘍再構築を生体内で効率よく観察できる異種移植システムを開発することを目的とした。

(2) 次に、(1)で確立したアッセイ系を用いて、高度に純化した癌幹細胞の特異的表面抗原や機能分子を同定し、新規治療基盤を整えることを目指した。

3. 研究の方法

ヒト癌幹細胞を同定し、その根絶に向けた標的候補分子を得るために、細胞側およびホスト側の問題点について改良を加え、以下の研究を推進した。

(1) 我々が見出したマクロファージ寛容の鍵遺伝子である NOD 型 SIRPA (Takenaka K et al. Nat Immunol. 8; 2007) を、すべてのリンパ球を欠除した γc 完全欠損 RAG ノックアウトマウスに発現させることにより、ヒト組織の生着率を飛躍的に高めた次世代免疫不全マウスラインを樹立する。

(2) 次世代免疫不全マウスに、マルチカラーフローサイトメトリーにより分離した癌幹細胞候補分画を移植することにより癌幹細胞を同定し、癌幹細胞とそのニッチ構成細胞による再構築過程を、生体内で経時的に解析する。

(3) 同定した癌幹細胞の mRNA の発現プロファイル解析、プロテオーム解析、エピゲノム解

析などを行い、癌幹細胞に特徴的に見られる表面抗原や機能分子発現と発現制御異常を詳細に検討する。

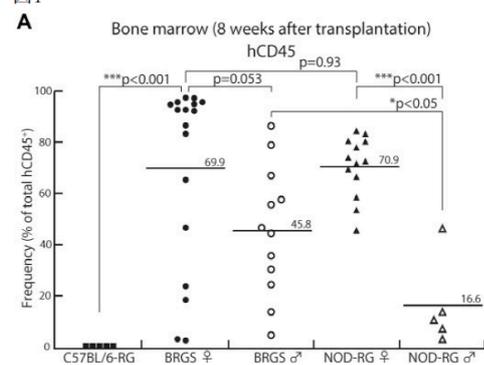
(4) これらの情報を基に、癌幹細胞およびその機能分子を標的とする癌幹細胞システム破壊実験をマウス生体内で行うことにより新規治療基盤を整える。

4. 研究成果

(1) 次世代免疫不全マウスの開発 (論文④)

従来の異種移植に用いられてきた IL-2R γ null-NOD/SCID (NOG) マウスの問題点は、ヒト細胞の生着効率が必ずしも高くない点と、補体活性を欠くため抗体治療のプラットホームとして必ずしも適さない点であった。我々は、マクロファージ寛容の鍵遺伝子である NOD 型 SIRPA を、すべてのリンパ球を欠除した γc 完全欠損 RAG ノックアウトマウスに発現させること、さらに C57/BL6 バックグラウンドとすることでこれらの問題点を克服した。つまり、C57/BL6 バックグラウンドで Rag2 および IL2R γ を欠損したマウスに、NOD 型 SIRPA 変異を導入した次世代免疫不全マウス B6. Rag2nullIL2R γ nullSIRPANOD/NOD (BRGS) ラインを樹立した。この BRGS マウスでは、NOG マウスと比較して良好なヒト造血細胞生着が認められた。また、B6 バックグラウンドであることの利点として、正常な C5 補体活性と高い生存・繁殖力も確認された。このように、従来型 NOG より生着効率に優れ、汎用性の高い癌幹細胞アッセイ系を確立した (図 1)。

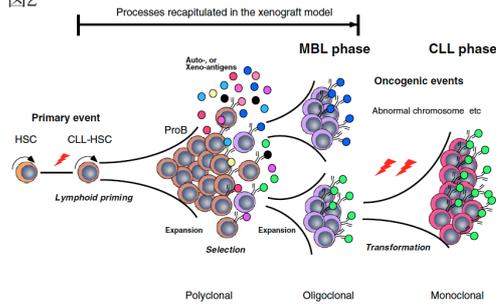
図1



(2) 慢性リンパ性白血病 (CLL) 幹細胞の同定 (論文⑧)

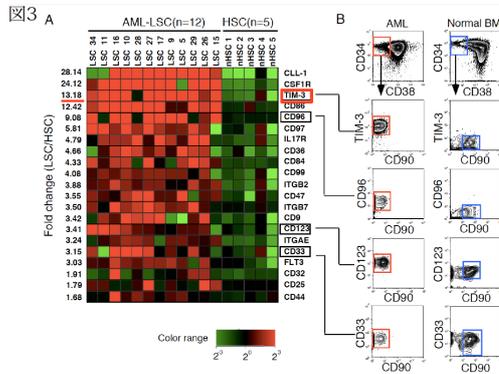
CLL は clonal な成熟 B 細胞が増殖する造血器腫瘍である。我々は、CLL 患者から純化した造血幹細胞を免疫不全マウスに異種移植することで、ヒト CLL に類似した oligo-clonal な B 細胞造血が起こることを明らかにした。この CLL 幹細胞は、リンパ系細胞分化に重要な遺伝子発現を既に開始しており、CLL の発症機序として造血幹細胞レベルでの異常を示した初めての報告となった (図 2)。

図2



(3) 癌幹細胞マーカーTIM-3 の同定 (論文⑩、未発表データ)

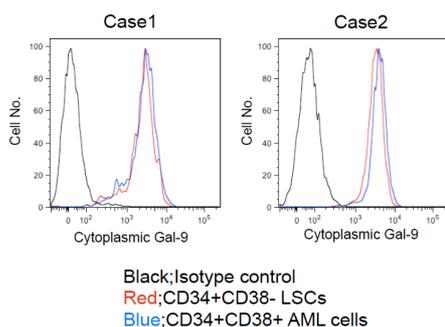
我々は、ヒト急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞(LSC)と正常造血幹細胞(HSC)の網羅的遺伝子発現解析を行い、HSCに発現せずLSCにのみ発現する表面抗原として、T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3)を同定した(図3)。



TIM-3はAML幹細胞のみならず、慢性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群の病期進行にもなって、幹細胞分画での発現が亢進することを確認した。また、種々の固形癌においても癌細胞が異所性にTIM-3を発現しており、TIM-3高発現が予後不良因子であることも報告された。これらの知見から、TIM-3は癌幹細胞の機能に何らかの役割を担う分子である可能性が高いと考えられた。

①白血球細胞がTIM-3のリガンドgalectin-9を産生している(図4)

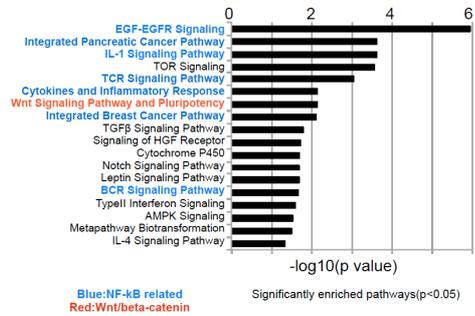
図4 galectin-9細胞内染色



AML患者血清中およびヒトAMLを再構築した免疫不全マウス血清中に高濃度のヒトgalectin-9が分泌されることを確認した。

②TIM-3/galectin-9相互作用によってCD34⁺TIM-3⁺AML幹細胞の生存・自己複製を強化するパスウェイが活性化される(図5)

図5 Pathway enrichment analysis



NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways are frequently observed in the enriched pathways

galectin-9の存在下で、AML幹細胞におけるNF- κ Bシグナルおよび β -cateninシグナルが増強することを見出した。

以上の結果から、AML細胞自身がTIM-3のリガンドであるgalectin-9を分泌し、AML幹細胞の生存・自己複製に重要なシグナル経路を活性化させるautocrine loopの存在が証明された。抗体によってgalectin-9を中和することで、免疫不全マウスへのヒトAMLの再構築が著明に抑制されることも確認した。

本研究により、癌幹細胞の機能解析を行うために不可欠な高効率異種移植システムが完成した。それを用いることで、慢性リンパ性白血病における造血幹細胞レベルでの異常を明らかにし、さらに骨髄性白血病幹細胞の生存・自己複製に重要な働きを担うTIM-3/galectin-9パスウェイの存在を証明することが出来た。

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50件以上、全て査読有り)
 ①Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S.

Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma.

Nat Genet. 2014. 46(2): 171-5.

doi: 10.1038/ng.2872.

②Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K. The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell.

Exp Hematol. 2014. 42(11): 955-65. e1-5.

doi: 10.1016/j.exphem.2014.07.267.

③Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K.

The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment.

Exp Hematol. 2014. 42(3): 163-171. e1.

doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.005.

④Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K.

Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment.

Blood. 2013. 121(8): 1316-25.

doi: 10.1182/blood-2012-06-440354.

⑤Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Okamura T, Ohtsuka E, Yoshida T, Higuchi M, Yoshimoto G, Fujisaki T, Abe Y, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K, Harada M.

Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study).

J Hematol Oncol. 2013. 6: 14.

doi: 10.1186/1756-8722-6-14.

⑥Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K.

Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Blood. 2013. 121(5): 840-8.

doi: 10.1182/blood-2012-02-409607.

⑦ Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K.

Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis.

Blood. 2012. 120(19): 4058-67.

doi: 10.1182/blood-2012-02-408864.

⑧ Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K.

Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Cell. 2011. 20(2): 246-59.

doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.029.

⑨ Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S.

Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.

Nature. 2011. 478(7367): 64-9.

doi: 10.1038/nature10496.

⑩ Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K.

TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells.

Cell Stem Cell. 2010. 7(6): 708-17.

doi: 10.1016/j.stem.2010.11.014.

[学会発表] (計 15 件)

① Koichi Akashi

TIM-3 Signaling and Human Myeloid Leukemia Stem Cell Development.

KEYSTONE SYMPOSIA

February 2015. Colorado USA.

② 赤司浩一

「白血病幹細胞研究のすゝめ」

第 76 回日本血液学会学術集会

2014 年 11 月 2 日, 大阪

③Koichi Akashi

「Cancer Stem Cells in Human Hematological Malignancies」

第 72 回日本癌学会学術総会

2013 年 10 月 5 日, 横浜

④赤司浩一

「悪性造血器腫瘍における癌幹細胞の病理」

第 71 回日本癌学会学術総会

2012 年 9 月 21 日, 札幌

⑤Koichi Akashi

Transcription factor regulation in normal and malignant hematopoiesis.

53th ASH Annual Meeting

December 2011, San Diego, USA

〔図書〕 (計 10 件)

①菊繁吉謙, 宮本敏浩, 赤司浩一

慢性リンパ球性白血病の発症機構.

Annual Review 血液 2013 (高久史麿ら監

修), 中外医学社 (東京) p143-151, 2013

②岩崎浩己, 赤司浩一

白血病幹細胞

カラーテキスト血液病学第 2 版

中外医学社 (東京) p26-32, 2013

③菊繁吉謙, 宮本敏浩, 赤司浩一

TIM-3: 新しい白血病幹細胞マーカーの発見.

Annual Review 血液 2012 (高久史麿ら監

修), 中外医学社 (東京) p22-30, 2012

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

①<http://www.cancer-stem-cell.com>

②2013 年 9 月 8 日 NHK 放送

「サイエンス ZERO」シリーズ癌幹細胞(1)が
ん再発の謎が解けた! 新発見「がん幹細胞」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤司 浩一 (AKASHI, Koichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 80380385

(2) 研究分担者

千葉 滋 (CHIBA, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 60212049