

平成 22 年 5 月 3 1 日現在

研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17109010
 研究課題名（和文） 造血システムにおける腫瘍性幹細胞およびその悪性化に関する遺伝子の同定
 研究課題名（英文） Cancer stem cells and genes responsible for their development in hematopoietic system
 研究代表者
 赤司浩一（KOICHI AKASHI）
 九州大学大学院・医学研究院・病態修復内科学・教授
 研究者番号：80380385

研究成果の概要（和文）：造血器腫瘍における腫瘍性幹細胞を同定し、その生物学的特性の解析を通して、腫瘍化原因の遺伝子異常の検索を試みた。急性骨髄性白血病(AML)幹細胞に特異的に発現する抗原 TIM3 を同定し、抗 TIM3 抗体が AML 幹細胞に選択性が高く、正常幹細胞には影響しない理想的標的抗原であることを示した。また、AML 幹細胞の生存維持には抗アポトーシス遺伝子 Mcl-1 が重要な役割を担っており、Mcl-1 およびその上流シグナル分子 FLT3, Stat5 を標的とした新たな治療法開発の可能性を示した。慢性リンパ性白血病は成熟 B 細胞の腫瘍性疾患と想定されていたが、その発症起源を造血幹細胞に遡り、幹細胞に由来する疾患である概念を提唱した。

研究成果の概要（英文）：We identified leukemia stem cells (LSC) of acute myelogenous leukemia (AML) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) using multi-colored FACS and xenotransplant system with severe immune-deficient mice. We identified high expression of TIM-3 in LSC population, but not hematopoietic stem cells (HSC). Treatment with anti-TIM-3 antibody markedly reduced leukemic repopulation, but did not affect reconstitution of normal HSCs. We also found that MCL-1 play a critical role in maintenance of LSC via FLT3 signaling and acquisition of FLT3 abnormality ensures LSC survival by upregulating MCL-1 via constitutive STAT5 activation. We also have shown that primary oncogenic event in CLL involves hematopoietic stem cells, and development of CLL might depend on clonal selection by abnormal BCR signaling mutations follow to become overt CLL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	39,500,000	11,850,000	51,350,000
2006年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2007年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2008年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2009年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
総計	92,300,000	27,690,000	119,990,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血器腫瘍，腫瘍性幹細胞，急性骨髄性白血病，慢性リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常造血幹細胞および各分化系統・分化段階の前駆細胞の純化法を開発し

た。

(2) 高効率にヒト造血免疫系を再現可能な高度免疫不全 NOG マウス異種移植システムを構築した。

- (3) マイクロアレイや sRNAi ライブラリーセットを用いて網羅的遺伝子検索が可能となった。
- (4) 以上の手法で、造血器腫瘍性幹細胞を純化し、免疫不全マウスに移植して腫瘍性幹細胞アッセイを行い、腫瘍性幹細胞化に重要な遺伝子異常を同定する。

2. 研究の目的

- (1) 急性白血病やリンパ系腫瘍など各造血器腫瘍性疾患における腫瘍性幹細胞を同定する。
- (2) 同定した腫瘍性幹細胞の生物学的特性を明らかにする。
- (3) 腫瘍性幹細胞化に重要な遺伝子異常を検索する。
- (4) 腫瘍性幹細胞を直接標的とした新たな治療法の開発を目指す。

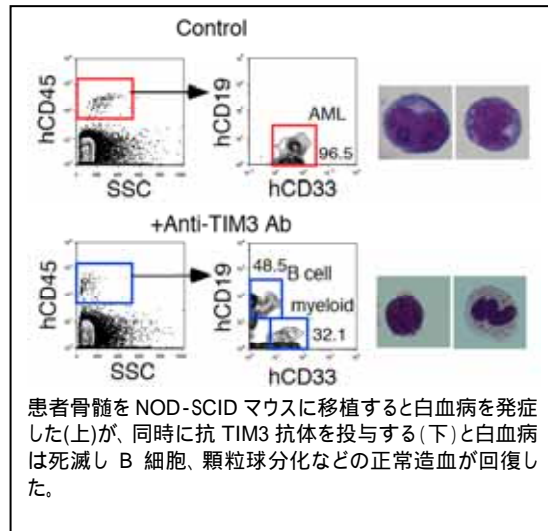
3. 研究の方法

- (1) 我々はマルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、造血幹細胞、骨髄系、リンパ系前駆細胞の純化方法を確認した。この手法を応用して、造血器悪性腫瘍症例の臨床検体から、新たに増加している分画の中で最も未分化と想定される腫瘍性幹細胞候補分画を純化する。
- (2) 純化した幹細胞候補分画を重症免疫不全マウス NOG 新生仔に継代移植し、造血器腫瘍の再構築能を検証する。
- (3) マイクロアレイを用いた遺伝子プロファイリングにより原因遺伝子スクリーニングを行う。
- (4) RNAi ライブラリーによる網羅的な機能変化を指標として原因遺伝子のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

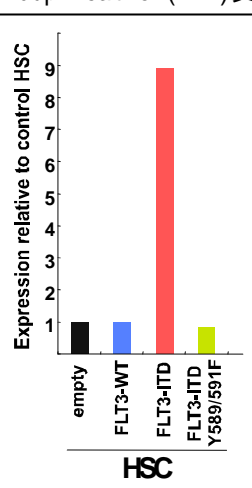
- (1) 骨髄系腫瘍性幹細胞：急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞の純化
AML 幹細胞は CD34⁺CD38⁻ 細胞分画内に存在することが知られている。我々はマルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、詳細に白血病幹細胞のフェノタイプを解析した。AML においては、CD34⁺CD38⁻ 細胞分画内に正常幹細胞とは異なる Flt3^{hi}Thy-1^cKit^{lo}IL-3R^{hi} 分画が増加し、Flt3^{hi}Thy-1^cKit^{lo}IL-3R^{lo} は著減していた。この2つの分画を分離純化し、Illumina マイクロアレイにより遺伝子プロファイリングを行ったところ、正常幹細胞には発現していない Tim-3 が白血病幹細胞に高発現していることを見出した。マウスにヒト正常造血幹細胞および AML 細胞を異種移植し、Tim-3 抗体を投与すると、正常造血を傷害することはないが、白血病の発症は回避可能であることを明らかにした。さらに

Tim-3 を直接標的としたより効率的な治療法を開発する予定である。



抗アポトーシス蛋白 MCL-1 は造血幹細胞の生存維持に重要な役割を担うことが知られている。我々は MCL-1 の AML 幹細胞化に関する役割について検討した。AML 幹細胞は、増殖している大多数の白血病細胞のフェノタイプである CD34⁺CD38⁻ また CD34⁺CD38⁺ 分画とは異なり、正常造血幹細胞の表面抗原と同一である CD34⁺CD38⁻ 細胞分画内にのみ存在すると報告されている。そこで、AML 検体において CD34⁺CD38⁻ AML 幹細胞分画と CD34⁺CD38⁺ AML 芽球分画をソートし、MCL-1 の発現量を検討した。AML 芽球では MCL-1 発現量は高値を示したが、より未熟な CD34⁺CD38⁻ AML 幹細胞でさらに MCL-1 は有意に上昇していた。

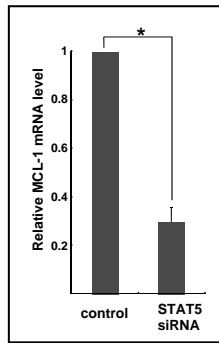
正常造血において MCL-1 の発現は FLT3 シグナルを介して制御されている。AML の予後不良因子として FLT3 の internal tandem duplication (ITD) 異常があり、この FLT3/ITD



異常により、恒常的に FLT3 シグナルが活性化されることが AML の発症原因と考えられている。FLT3/ITD 変異 AML 症例で MCL-1 の発現を検討したところ、FLT3/ITD 陰性 AML と比較して有意に MCL-1 の高発現を認めた。さらに FLT3/ITD 変異 AML における CD34⁺CD38⁻ AML 幹細胞では CD34⁺CD38⁻ AML 芽球と

比較して、MCL-1 の発現量は有意に上昇していた。FLT3/ITD 変異による恒常的 FLT3 シグナルが MCL-1 の高発現を誘導し、これが

FLT3/ITD 変異 AML の白血病幹細胞の生存維持の強化など、白血病発症に深く関与している可能性を示している。さらに、純化した造血幹細胞に FLT3-ITD 異常を遺伝子導入したところ、コントロールと比較して、MCL-1 発現量は 10 倍に上昇した。また FLT3-ITD 変異 AML 細胞株に Flt3 シグナル阻害剤 PKC-412 を添加したところ、用量依存的に MCL-1 の発現量が低下し、アポトーシス死に導いた。さらに、MCL-1 の発現を抑制する siRNA を FLT3/ITD 変異 AML 細胞株に遺伝子導入したところ MCL-1



の発現低下に伴い、アポトーシス死に導かれた。また、FLT3/ITD の下流シグナル STAT5 に対する siRNA を遺伝子導入したところ、MCL-1 の発現量は低下した。正常造血においては、FLT3 からのシグナルは、PI3K または Ras/ERK 経路を通し

て MCL-1 の発現を制御されている。従って、以上の結果から FLT3/ITD 変異 AML の白血病幹細胞化には MCL-1 が深く関与しており、さらに MCL-1 および STAT5 を標的とした白血病治療の可能性が示唆される。

(2) リンパ性白血病幹細胞：慢性リンパ性白血病 (CLL) 幹細胞の同定

CLL は、成熟 B リンパ球と類似した CD34-CD5+CD10-CD19+CD20+ のフェノタイプを示し抗原曝露を経た後の成熟 B 細胞が末梢にて腫瘍性に増殖する疾患と考えられてきた。我々は AML などの白血病においてその存在が実証されている leukemia-initiating cell が CLL においても存在し、CLL の白血病幹細胞システムが如何に構築されているのか解析を行った。末梢血中の CLL 細胞を FACS にて純化し、免疫不全 NOG マウスへ移植したが、生着は認められなかった。そこで、CLL 患者の骨髓造血幹細胞 CD34+CD38- 分画を NOG マウスへ移植し解析を行った。マウス内には、ヒト骨髓球系細胞の再構築に加えて、CLL 細胞と同様の CD5 陽性成熟 B 細胞が増殖していた。これら CLL 患者骨髓幹細胞に由来する B 細胞をソートし、免疫グロブリン遺伝子の再構成を PCR 法にて検索したところ、モノクローナルまたはオリゴクローナルな再構成を示した。このマウス内で生じたモノクローナルな免疫グロブリン再構成パターンをシークエンスにて解析し、患者 CLL 細胞のそれと比較検討した。驚くべきことに全症例において、マウスに構築された B 細胞の VDJ 再構成パターンは、患者 CLL 細胞

とは異なっており、新規にマウス内で出現したクローンと考えられた。さらに、同一の CLL 患者造血幹細胞を一度に複数 NOG マウスに移植し、再構成された VDJ パターンを検索したが、患者および各マウスすべてにおいて異なった VDJ パターンを示した。また、これらの IGHV 遺伝子の使用には、de novo の CLL と同様の限定された偏りがある



ことを見出した。以上のことから、CLL の発症様式として、既に造血幹細胞において CLL に進展するのに必要な遺伝子変異が獲得されているが、単一の遺伝子異常では CLL 発症には不十分であり多系統への分化能にも影響されない。さらに長期間に渡って遺伝子異常が蓄積され、また B 細胞受容体からの抗原刺激により、これらの B 細胞は増殖能力を獲得して、モノクローナルに増殖し、CLL への進展が促進される。ヒト CLL では、この抗原刺激が自己抗原であり、マウス移植系では、BCR への刺激が異種抗原であると想定される。未梢成熟 B 細胞の腫瘍性疾患と捉えられていた CLL は、造血幹細胞にその起源を有している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 37 件)

1. Mori Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of Phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 206:183-193,2009
2. Yoshimoto G, Miyamoto T, Akashi K, et al. FLT3-ITD upregulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* 114:5034-43,2009
3. Kalaszczynska Akashi K, et al. Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells. *Cell* 23: 352-65, 2009
4. Tabrizi SJ, Miyamoto T, Akashi K. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J Immunol* 182:1490-9, 2009
5. Kohno K, Miyamoto T, Teshima T, Akashi

- K, et al. Infectious complications in patients receiving autologous CD34-selected hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune diseases. **Transplant Infect Dis** 11:318-323, 2009
6. Yasen M, Tanaka S, et al. Expression of Aurora B and their alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. **Cancer Science** 100:368-74, 2009.
7. Tanaka S, et al. Surgical radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma: an endoscopic or open approach. **Hepatogastroenterology** 56:1169-73, 2009.
8. Koyama M, Akashi K, Teshima T, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. **Blood** 113: 2088-2095, 2009.
9. Aoyama K, Akashi K, Teshima T: Improved outcome of allogeneic bone marrow transplantation due to breast-feeding-induced tolerance to maternal antigens. **Blood** 113: 1829-1833, 2009.
10. Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/monocyte progenitor stages to maintain cell survival. **J Immunol**, 180:7358-7367, 2008
11. Cantor AB, Akashi K, et al. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. **J Exp Med** 205, 611, 2008.
12. Maeda T, Tanaka S, et al. Prognosis of early hepatocellular carcinoma after hepatic resection. **Hepatogastroenterology** 55:1428-32, 2008.
13. Teramoto K, Tanaka S, et al. Strong association between frequency of intermittent inflow occlusion and transient increase in serum liver enzymes after hepatic resection. **Hepatogastroenterology** 55:636-40, 2008.
14. Ito K, Tanaka S, et al. Left-sided portal hypertension caused by serous cystadenoma of the pancreas: Report of a case. **Surgery Today** 38:184-7, 2008.
15. Ishikawa F, Miyamoto t, Akashi K, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. **Nat Biotechnol** 25, 1315, 2007.
16. Alcaide P, Akashi K, et al. Dendritic cell expression of the transcription factor T-bet regulates mast cell progenitor homing to mucosal tissue. **J Exp Med** 204, 431, 2007.
17. Mori Y, Miyamoto T, Teshima T, Akashi K, et al: Distinctive expression of myelomonocytic markers and down-regulation of CD34 in acute myelogenous leukaemia with FLT3 tandem duplication and nucleophosmin mutation. **Eur J Haematol** 79:17-24, 2007
18. Sakoda Y, Teshima T, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. **Blood** 109:1756-1764, 2007.
19. Yanagita T, Kubota S, Kwaki H, Kawata K, Kondo S, Takano-Yamamoto T, Tanaka S, Takagawa M. Expression and physiological role of CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes. **FEBS Journal** 274:1655-6, 2007
20. Shimada M, Tanaka S, et al. Characteristic gene expression induced by polyurethane foam/spheroid culture of hepatoma cell line, Hep G2 as a promising cell source for bioartificial liver. **Hepatogastroenterology** 54:814-20, 2007
21. Matsuoka K, Teshima T, et al. Fetal tolerance to maternal antigens improves the outcome of allogeneic bone marrow transplant by a CD4+CD25+ T cell-dependent mechanism. **Blood** 107: 404-409, 2006
21. Rosenbauer F, Akashi K, et al. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. **Nat Genet** 38,27,2006
22. Hirai H, Akashi K, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. **Nat Immunol** 7, 732, 2006
23. Chan IT, Akashi K, et al. Oncogenic K-ras cooperates with PML-RARalpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. **Blood** 108, 1708, 2006
24. Iwasaki H, et al, Akashi K. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. **Gene and Dev** 20, 3010, 2006
25. Tanaka S, et al. Induction of Angiopoietin-2 gene expression by COX-2: A novel role for COX-2 inhibitors during hepatocarcinogenesis.. **J Hepatology** 44:233-5, 2006
26. Wang J, Akashi K, et al. MLL-CBP targets granulocyte/macrophage progenitors and initiates leukemogenesis in a murine model of human t(11;16). **EMBO J** 26,368,2005
27. Opferman JT, Akashi K, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. **Science** 307,1101,2005.
28. Okuno Y, Akashi K, et al. Autoregulation of the transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. **Mol Cell Biol** 25,2832,2005.

29. Iwasaki H, et al, Akashi K. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* 201,1891,2005.
30. Iwasaki H, et al, Akashi K. Distinct and indispensable roles of PU.1 in maintenance of stem cells and their differentiation. *Blood* 106,1590,2005.
31. Okuno Y, Akashi K, et al. Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* 25, 2832,2005
32. Ishikawa F, Miyamoto T, Akashi K, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/ IL2 receptor (gamma) chain (null) mice. *Blood* 106,1565,2005.
33. Akashi K, et al. The complex cartography of stem cell commitment. *Cell* 121: 160-2, 2005.
34. Arinobu Y, Akashi K, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18105-10, 2005.
35. Hashimoto D, Teshima T, et al. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol* 174: 551-556, 2005.
36. Maeda Y, Teshima T, et al. Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8+ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 105: 2023-2027, 2005
37. Teshima T, et al. Impact of HLA mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from related donors. *Br J Haematol* 130: 575-587, 2005.

[学会発表](計12件)

1. 赤司浩一: Stem cells in hematological malignancies (シンポジウム). 第68回日本癌学会学術総会. 2009年10月1日. 横浜
2. 豊嶋崇徳: GVHDとGVL. 第71回日本血液学会総会(教育講演). 2009年10月23日京都.
3. 豊嶋崇徳: 末梢血幹細胞移植. 第57回日本輸血・細胞治療学会総会. 2009年5月28日. 埼玉
4. 豊嶋崇徳: 非血縁ドナーに対するG-CSF動員末梢血幹細胞採取とフォローアップ(シンポジウム). 第31回日本造血細胞移植学会総会. 2009年2月5日. 札幌.
5. Tanaka S, et al. Aurora kinase B pathway as a novel molecular target in invasive hepatocellular carcinoma. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 20, 2009, Denver,

USA

6. 宮本敏浩: 急性骨髄性白血病に対する自家移植の位置付け(シンポジウム). 第71回日本血液学会総会. 2009年10月23日. 京都.
7. Teshima T: Basic and clinical researches in hematopoietic stem cell transplantation: Joint symposium with Korean Society of Hematology. 第70回日本血液学会総会(シンポジウム). 2008年10月10日. 京都.
8. 赤司浩一: 造血機構の破綻と発がん(シンポジウム) 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月4日. 横浜.
9. Akashi k. Hematopoietic lineage commitment. Lund stem cell symposia. 2007年12月18日. Sweden
10. Akashi k. Kineage pathways of mast cells and basophils in vivo. Keystone Symposium. 2007年1月20日. USA
11. 豊嶋崇徳: GVHDとGVLのメカニズムの再考察. 第69回日本血液学会. 2007年10月11日. 横浜.
12. 田中真二: 肝癌のトランスレーショナルリサーチ(シンポジウム). 第45回日本癌治療学会総会. 2007年10月24日. 京都

[図書](計11件)

1. Akashi K. Lymphoid lineage fate decision of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1176:18-25, 2009.
2. Arinobu Y, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol Int* 58:21-8, 2009
3. Teshima T, et al. Chronic graft-versus-host disease: How can we release Prometheus? *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 142-150, 2008.
4. Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 26:6687-96, 2007
5. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 26:726-740, 2007
6. Akashi K. Cartography of hematopoietic stem cell commitment dependent upon a reporter for transcription factor activation. *Ann N Y Acad Sci* 1106:76-81, 2007
7. Iwasaki H, Akashi K. Thymus exclusivity: all the right conditions for T cell. *Immunity* 25:697-700, 2006
8. Teshima T, et al. Impact of fetal-maternal tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. *Arch Immunol Ther Exp* 54: 165-172, 2006.
9. Miyamoto T, Akashi K. Lineage Promiscuous expression of transcription factors in normal hematopoiesis. *Int J Hematol* 81:361-7, 2005.
10. Ichinohe T, Teshima T, et al. Fetal-maternal

microchimerism: impact on hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 17: 546-552, 2005.

11. Tanaka S. CCN4 and CCN6 variants in Wnt-inducible signaling pathway. in *CCN proteins: A new family of cell growth and differentiation regulators*, ed. Perbal P, Takigawa M. Pp293-304, (Imperial College Press, London), 2005

〔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

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/identshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤司浩一 (KOICHI AKASHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80380385

(2) 研究分担者

豊嶋崇徳 (TAKANORI TESHIMA)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：40284096

宮本敏浩 (TOSHIHIRO MIYAMOTO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70343324

田中真二 (SHINJI TANAKA)

東京医科歯科大学・大学病院・

特任准教授

研究者番号：30253420

(3) 連携研究者

なし