

平成 21年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390281
 研究課題名（和文）核小体分子の発現・機能解析による正常および白血病幹細胞の未分化性維持機構の解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms for regulation of hematopoietic and leukemia stem cell population by nucleolar molecules
 研究代表者
 平尾 敦（HIRAO ATSUSHI）
 金沢大学・がん研究所・教授
 研究者番号：90343350

研究成果の概要：

正常造血幹細胞と白血病幹細胞の共通性を解明するアプローチとして、核小体に焦点を当てて研究を進めた。核小体分子 Nucleostemin は、未分化な造血幹細胞に高い発現が認められた。Nucleostemin の発現を GFP によってモニターするレポーターシステムを構築し、造血系で解析したところ、正常造血および骨髄性白血病において、未分化細胞を濃縮することができた。これらの知見は、将来の白血病治療薬の標的となる分子の特定に寄与することが期待された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：血液学

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：造血幹細胞、白血病

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤による化学療法の開発により白血病の治療は目覚しく進歩しているが、抗癌剤抵抗性の白血病細胞の存在が臨床問題となることが多い。このことは、腫瘍細胞は均一ではなく、一部に特別な性格をもつ集団が存在していることを意味する。白血病細胞の中で、その源となる幹細胞の性質を持った腫瘍細胞、いわゆる白血病幹細胞（Leukemic Stem Cell）あるいは、がん幹細胞（Cancer Stem Cell）の存在は、古くから示唆されてきた。1997年、Dickらは、白血病細胞の中

に正常なヒトの造血幹細胞の表面マーカーである CD34 陽性 CD38 陰性という形質を持つわずかな細胞集団が存在し、ここに白血病細胞の大部分を供給する源の細胞が濃縮されていることを示し、造血組織において白血病幹細胞の存在を証明した。さらに、がん細胞と正常の幹細胞が共通のメカニズムで制御されている知見が示されてきた。また、脳腫瘍や乳癌などの固形腫瘍においてもがん幹細胞の証拠となる報告がなされている。このように、がん幹細胞の概念は提唱され、実証されてきたものの、その実態は明らかとされ

ていない。白血病をはじめとする腫瘍の新しい治療戦略を考える上で、がん幹細胞の実態を知ることは必要不可欠な課題である。

2. 研究の目的

本研究においては、正常造血幹細胞と白血病幹細胞の共通性を解明することを目的とした。この目的のため、①正常造血幹細胞の制御機構の解明、②白血病幹細胞の特定とその制御機構の解明に取り組んだ。本研究では、特に、核小体分子 Nucleostemin に焦点を当てて研究を進めた。

3. 研究の方法

①正常造血幹細胞制御機構の解明

1. 造血幹細胞の分化過程における Nucleostemin の発現および局在解析。
2. Nucleostemin の発現様式による幹細胞集団の同定：Nucleostemin の転写調節領域を利用した GFP 遺伝子導入マウスの作製を行った。
3. 造血幹細胞における Nucleostemin の機能解析：レンチウイルスによる shRNA 導入システムにより、造血幹細胞で Nucleostemin のノックダウン系を確立し、その機能評価を行った。

②白血病幹細胞の特定

Nucleostemin プロモーターを用いた白血病幹細胞の特定：マウス造血幹細胞を単離し、レトロウイルスベクターにより Meis/HoxA9 遺伝子を導入後、放射線照射マウスに骨髄移植を行うことによって白血病モデルを作製した。この際、ドナー造血幹細胞として Nucleostemin プロモーターにて GFP を発現するトランスジェニックマウスを用い、ウイルスを感染させ白血病化させた。レシピエントマウスの体内で白血病が発症したとき、Nucleostemin 陽性細胞が、白血病細胞として高い能力を有するかどうか、すなわち白血病幹細胞かどうかを検討した。

4. 研究成果

正常造血幹細胞と白血病幹細胞の共通性を解明するアプローチとして、核小体に焦点を当てて研究を進めた。細胞周期上 G0 期にある造血幹細胞に特異的に発現する分子を探索した結果、Nucleostemin という分子に着目した。本分子のポリクローナル抗体を作成し、Nucleostemin 発現パターンを検討した。既報のごとく、作製した抗体によって、本分子は胚性幹細胞 (ES) の核小体に局在していること、他の核小体蛋白である Nucleolin, Nucleophosmin と同様の局在していることを確認した。Nucleostemin は、KSL(c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lin 陰性) のような未分化な造血幹細胞に高く発現が認められ、核内で特徴的な染色パターンを示すことが観察された。一方、

前駆細胞集団、分化集団においては、その発現が低下していることが判明した。ES 細胞においても、LIF を除去し、レチノイン酸処理によって分化させると、その発現が低下し、本分子の発現未分化との相関は、他の組織においても共通した現象であることが示唆された。Nucleostemin 蛋白の発現は細胞表面に認められない。そこで幹細胞集団の同定を目的とし、本分子の転写調節領域の特定に取り組んだ。まず、本分子のゲノムから、エクソン1を含めた上流領域を得、転写活性を検討した。その結果、約 10Kb 中に、高い転写活性が存在することがルシフェラーゼ法により判明した。さらに GFP を用いたレポーターシステムを構築し、ES 細胞に導入したところ、未分化状態では強く蛍光を発色するのに対して、分化するとその発色が低下し、分化の程度を反映することが明らかになった。本プロモーター-GFP レポータープラスミドを用いて、トランスジェニックマウスを作製した。まず、GFP の発現の程度により、骨髄細胞を4分画し、内在性 Nucleostemin の発現量を検討した結果、GFP の強度との間に相関を認めた。このことから、本プロモーターは、生体内造血細胞系列において、Nucleostemin の発現をモニターできるシステムであることが判明した。さらに、血球系分化抗原の発現をみると、GFP の強い発現を示す集団において、分化抗原が陰性であることから、ここに未分化細胞が濃縮していると考えられた。さらに幹細胞分画においては、非常に高い GFP 発現を示す一方、前駆細胞、分化細胞と分化が進むにつれ、GFP の発現が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、本レポーターシステムが、生体内でも未分化細胞で強い活性をもつことが明らかとなった。トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞に HoxA9/Mies1 をレトロウイルスにて導入後レシピエントマウスに移植し、骨髄性白血病モデルを作製した。白血病細胞を採取し、GFP の輝度によって分類し検討を行った。GFP の輝度と内在的 Nucleostemin mRNA 量は相関があり、白血病において Nucleostemin のモニターリングシステムとして機能していることが判明した。さらに、Nucleostemin の発現と白血病発生能との相関が認められた。また shRNA 実験により、Nucleostemin が白血病幹細胞の増殖能に必須であることが判明した。遺伝子プロファイルの検討により、Nucleostemin と挙動を一致させる遺伝子集団が特定できたため、複数の遺伝子が協調して未分化性を維持していることが明らかとなった。この知見は、将来の白血病治療薬の標的となる分子の特定に寄与することが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- ①Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells*. 12:3237-46, 2008. 査読有
- ②Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell cycle arrest. *Cell Stem Cell*, 2:170-182, 2008. 査読有
- ③Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM, Oshima M. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor- α in gastric tumour cells. *EMBO J.*, 27:1671-81, 2008. 査読有
- ④Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 10:1883-94, 2008. 査読有
- ⑤Miyamoto K, Araki YK, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, and Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1:101-112, 2007. 査読有
- ⑥Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, Hirota F, Nakayama R, Kubo Y, Ishimaru N, Takahashi A, Hirao A, Shimizu T, Mann DJ, Saya H, Hayashi Y, Arase S, Matsumoto M, Kazuki N, Hara E. Visualizing the dynamics of p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:15034-9, 2007. 査読有
- ⑦Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species by atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol.*, 178:103-10, 2007. 査読有
- ⑧Zaugg K, Su YW, Reilly PT, Moolani Y, Cheung CC, Hakem R, Hirao A, Liu Q, Elledge SJ, Mak TW. Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc*

Natl Acad Sci U S A., 104:3805-10, 2007. 査読有

- ⑨Iwanaga A, Sato T, Sugihara K, Hirao A, Takakura N, Okamoto H, Asano M, Yoshioka K. Neural-specific ablation of the scaffold protein JSAP1 in mice causes neonatal death. *Neurosci Lett.*, 2007429:43-8. 査読有
- ⑩Naka K, Ohmura M, Hirao A. Regulation of the self-renewal ability of tissue stem cells by tumor-related genes. *Cancer Biomark.*, 3:193-201, 2007. 査読無
- ⑪Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Med.* 12:446-451, 2006. 査読有
- ⑫Takubo K, Hirao A, Ohmura M, Azuma M, Arai F, Nagamatsu G, Suda T. Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of *Atm*-null testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 351:993-8. 2006. 査読有

〔学会発表〕 (計 26 件)

- ① Hirao A. Effects of aging- or senescence-related factors on stem cell function and tissue homeostasis in vivo. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、平成20年12月10日、神戸
- ②平尾敦. 正常および腫瘍組織における幹細胞システム、第45回日本婦人科腫瘍学会学術集会、平成20年11月22日、金沢
- ③ Hirao A. Stemness in normal and malignant tissues. 第67回日本癌学会学術集会、平成20年10月27日、名古屋
- ④仲一仁, 大村昌子, 石原正彦, 宮地宏昌, 須田年生, 平尾敦. Nucleosteminプロモーター活性による白血病幹細胞の同定 第67回日本癌学会学術集会、平成20年10月27日、名古屋
- ⑤ Hirao A. Stemness in normal and malignant tissues. 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers, October 7, 2008. Tokyo
- ⑥仲一仁, 大村昌子, 村口輝行, 星居孝之, 須田年生, 平尾敦. Nucleostemin-GFPレポーターシステムによる白血病幹細胞の同定, 第70回日本血液学会総会, 平成20年10月10-12日, 京都
- ⑦ Hirao A. Stemness in normal and malignant tissues. Mechanisms of Early Differentiation, Summer School, September 1-5, 2008, Barsinghausen, Germany
- ⑧Naka K, Ohmura M, Muraguchi T, Hoshii T,

Hirao A. Prospective identification of leukemic stem cells by promoter activity of nucleostemin gene. 6th International Society of Stem Cell Research, June 11-14th 2008, Philadelphia, PA, USA

⑨ 仲 一仁, 大村昌子, 村口輝行, 星居孝之, 平尾 敦. Nucleostemin-GFP レポーターシステムによる白血病幹細胞の同定, 第6回幹細胞シンポジウム, 平成20年5月16-17日, 東京

⑩ Hirao A. Stemness in normal and malignant tissues. The third International workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, April 9, 2008, Okinawa

⑪ Naka K, Ohmura M, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells by using Nucleostemin promoter activity. Keystone Symposia, Tumor suppressor and stem cell biology, Feb.24-29, 2008, Vancouver

⑫ Naka K, Ohmura M, Suda T, Hirao A. The 49th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Dec.8-11, 2007, Atlanta, USA

⑬ 平尾 敦. 幹細胞制御における組織間共通性, 第10回日本組織工学会, 平成19年11月8日, 東京

⑭ 平尾 敦. 造血幹細胞の自己複製と老化, 第69回日本血液学会総会, 平成19年10月7日, 横浜

⑮ 平尾 敦. Stemness genes in cancer. 第66回日本癌学会学術総会, 平成19年10月3日, 横浜

⑯ 仲 一仁, 大村昌子, 野口亜希, 石原正彦, 宮地宏昌, 須田年生, 平尾 敦. Nucleostemin プロモーターGFP トランスジェニックマウスによる造血幹細胞標識システムの樹立, 第66回日本癌学会, 平成19年10月3-5日, 横浜

⑰ Naka K, Ohmura M, Arai F, Suda T, Hirao A. The 5th International Society of Stem Cell Research, June 17-20, 2007, Cairns, Australia

⑱ 大村昌子, 仲 一仁, 木下雅史, 玉 瀬玲, 新井文用, 永松 剛, 田久保圭誉, 照田展大, 須田年生, 平尾 敦. Nucleostemin の発現による組織幹細胞の可視化と同定, 第5回 幹細胞シンポジウム, 平成19年5月17-19日, 淡路島

⑲ Hirao A. Regulation of stem cell self-renewal by aging related genes. The second International workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Mar. 25-29, 2007, Okinawa

⑳ Hirao A. The 19th Naito Conference. Molecular Basis for Maintenance and

Differentiation of Stem Cells [II] Nov. 15, 2006, Kanagawa

㉑ Hirao A. Regulation of stem cell self-renewal by tumor related genes. Sixteenth International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar. Oct. 22, 2006, Hiroshima

㉒ 大村昌子, 仲一仁, 新井文用, 木下雅史, 玉瀬玲, 松岡佐保子, 伊藤圭介, 宮本佳奈, 田久保圭誉, 須田年生, 平尾敦. 組織幹細胞マーキング法の開発 第68回日本血液学会, 平成18年10月8日, 福岡

㉓ Hirao A. Regulation of stem cell self-renewal by aging-related genes. 35th Annual Scientific Meeting International Society for Experimental Hematology, Sep. 29, 2006, Minneapolis, USA

㉔ Hirao A. ROS regulation and self-renewal capacity. International Symposium on Gas Biology: Hematopoietic stem cells, Jun 27, 2006, Tokyo

㉕ 平尾敦. 幹細胞自己複製制御と老化・寿命制御の共通性 老年医学会総会, 平成18年6月8日, 金沢

㉖ 大村昌子, 新井文用, 仲 一仁, 田久保圭誉, 東 真樹, 須田年生, 平尾 敦. 核小体分子 Nucleostemin による生殖幹細胞制御機構 第4回幹細胞シンポジウム, 平成18年5月20日, 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 敦 (HIRAO ATSUSHI)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号: 90343350

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし