

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007 - 2008
 課題番号： 19390259
 研究課題名 (和文) 血球転写因子による白血病幹細胞の自己複製制御メカニズムの解明と治療への応用
 研究課題名 (英文) Regulation of self-renewal of leukemic stem cells by hematopoietic transcription factors
 研究代表者
 中島 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号： 30217723

研究成果の概要：

白血病は、未熟な血液細胞がさまざまな遺伝子変異により腫瘍化して発症する造血器悪性疾患である。白血病の病態は白血病幹細胞 (leukemic stem cell; LSC) と呼ばれるごく少数の細胞により維持されているが、その生成には血球特異的転写因子が深く関与している。我々は、MLL-ENL, AML1-ETO など様々な白血病原因遺伝子について LSC 生成に關与する転写因子を解析し、PU.1 と呼ばれる転写因子が LSC の生成 / 維持に極めて重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野： 医歯薬学

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： 血液内科学

1. 研究開始当初の背景

白血病は、造血幹細胞 / 前駆細胞などの未熟な血液細胞がさまざまな遺伝子変異により腫瘍化して発症する造血器悪性腫瘍の一つである。その発症原因となる遺伝子変異は様々であるが、それらのいずれにも共通しているのは、白血病幹細胞 (leukemic stem cell; LSC) と呼ばれるごく少数の細胞が存在し、これらの細胞により白血病が発症・維持されていることである。LSC は正常の造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) と同様自己複

製能を持ち、分裂に際して自らと全く同じ細胞を複製することで白血病芽球を枯渇することなく恒常的に産生し、白血病状態を維持している。しかしながら、現在まで同定されている様々な白血病原因遺伝子がいかにして LSC の生成に關与しているのか、また LSC がいかにして自己複製を行っているのか、その分子メカニズムは依然として不明である。LSC の自己複製は、正常 HSC のそれと極めて類似した分子メカニズムに基づいて行われていると考えられている。正常 HSC の自

己複製メカニズムの詳細はごく最近まで不明であったが、ここ2-3年でようやくその一端が明らかになりつつある。近年我々および他のグループは、血球特異的転写因子である C/EBP α および PU.1 が正常 HSC の自己複製メカニズムに深く関与していることを見だし報告した (米国血液学会, 2005)。ここで興味深いのは、C/EBP α および PU.1 は非常に多くの白血病原因遺伝子の標的となっており、その機能が抑制されていることである。例えば、C/EBP α は急性骨髄性白血病 (AML) 全体の 7-9% (染色体転座のない AML M2 では約 17%) で機能低下を伴う点突然変異が認められている。また、AML で高頻度に見られる AML1-ETO, PML-RAR α , CBF β -MYH11 FLT3-ITD (internal tandem duplication), AML1-Evi1 などの変異遺伝子でも C/EBP α の発現・機能抑制が報告されており、さらに慢性骨髄性白血病 (CML) の原因である染色体転座遺伝子 Bcr-Abl でも同様の報告がなされている。これら C/EBP α の発現・機能低下を有する AML は、実に全体の 3分の2にもおよぶ。一方、PU.1 の機能を抑制する染色体転座遺伝子も数多く報告されており、例としては AML1-ETO, MOZ-TIF2 などがある。さらにまたマウスモデルにおいては、PU.1 の発現量を正常の約 20% に減少させた変異マウスが極めて高率に AML を発症することも明らかにされている。

このように白血病発症と C/EBP α および PU.1 には極めて密接な関係があり、さらに前述のように HSC の自己複製メカニズムに C/EBP α , PU.1 が深く関与していることを考えあわせると、白血病幹細胞の生成・維持に C/EBP α , PU.1 が重要な役割を果たしている可能性は極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

我々は以前より C/EBP α , PU.1 の造血系における機能解析を精力的に進め (EMBO J, 2006; JBC, 2006) それに加え造血幹細胞の自己複製メカニズムの解明にも力を注いできた (BBRC, 2006; 米国血液学会, 2005)。本研究はこれらの学問的基盤をもとに、LSC の生成・維持、とくに LSC の自己複製メカニズムにおける C/EBP α , PU.1 の役割を明らかにすることで、様々な白血病を「C/EBP α , PU.1 の機能抑制による自己複製能の獲得」という共通の分子メカニズムから統合的に理解することを目指すものである。具体的には、まず各種白血病遺伝子により生成された LSC の自己複製能が C/EBP α , PU.1 の機能抑制に依存していることを *in vitro* アッセイ系を用いて検証し、さらにそれをマウス白血病モデルで確認する。それに続いて C/EBP α , PU.1 の転写機能を活性化する低分子化合物のスクリ

ーニングを行い、LSC を標的とした新たな分子標的治療薬の開発を行うことで、基礎研究で得られた白血病発症の分子学的理解を実際の臨床現場へ応用し、将来的な白血病治療成績の向上を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 各種白血病遺伝子の自己複製能付与効果の確認

in vitro での自己複製能の標準的指標として、メチルセルロース培地を用いたコロニー replating アッセイを行う。これにより様々な白血病遺伝子がマウス骨髄細胞の自己複製能を亢進させることを確認するとともに、*in vitro* アッセイ系を確立する。白血病遺伝子としては、MLL-ENL, MLL-Septin6, MOZ-TIF2, AML1-ETO, AML1 point mutant, PML-RAR α を用いる。

レトロウイルスの作製: MLL-ENL, MLL-Septin6, MOZ-TIF2, AML1-ETO, AML1 point mutant, PML-RAR α の cDNA をそれぞれレトロウイルスベクター pMX-IRES-Neo にサブクローニングする。作製したプラスミドをレトロウイルス producer cell line PLAT-E にトランスフェクションし、培養上清中にできたウイルスを回収、 -80°C で保存する。

レトロウイルスのマウス骨髄細胞への感染: C57BL/6 マウスに 5FU を投与、投与 4 日後に大腿骨を取りだし骨髄細胞を採取する。採取した骨髄細胞を SCF, TPO, IL-6, Flt3 ligand (FL) 存在下で 2-4 時間培養した後、でえられたウイルスをレトロネクチンを用いて感染させる。

メチルセルロース培地での培養: 感染させたマウス骨髄細胞を各種サイトカイン (SCF, TPO, IL-6, IL-3) およびネオマイシン存在下でメチルセルロース培養し、1 週間後、生成したコロニーをカウントする。細胞を回収、細胞数をカウントした後、新しいメチルセルロース培地にまき 2 次コロニーを形成させる。以下、同様に 3 次、4 次コロニーを形成させ、導入した遺伝子が細胞の自己複製能に与える影響を *in vitro* で解析する。

(2) 各種白血病遺伝子の *in vitro* 自己複製能に与える C/EBP α , PU.1 の影響

白血病遺伝子導入により自己複製能を獲得した細胞に対して、(1) と同様に作製したレトロウイルスを用いて活性誘導型 C/EBP α , PU.1 (C/EBP α -ER, PU.1-ER) 遺伝子を導入する。

導入した細胞を 4-hydroxy tamoxifen (4-HT)を含むメチルセルロース培地と含まない培地で培養、C/EBP α , PU.1 活性を誘導した場合のコロニー形成能を比較する。

(3) C/EBP α -ER, PU.1-ERトランスジェニックマウスを使った白血病モデルの作製

レトロウイルスの作製：MLL-ENL, MLL-Septin6, MOZ-TIF2, AML1-ETO, AML1 point mutant, PML-RAR α のcDNAをそれぞれレトロウイルスベクター pMX-IRES-GFP (pMX-IG)にサブクロニングする。これをもとに、(1)と同様の方法でウイルス液を作成する。

レトロウイルスの骨髄細胞への感染：我々が開発した C/EBP α -ER, PU.1-ERトランスジェニックマウスに 5FU を投与、投与 4 日後に大腿骨を取りだし骨髄細胞を採取する。採取した骨髄細胞を SCF, TPO, IL-6, FL で 24 時間刺激した後、でえられたウイルスをレトロネクチン存在下で感染させる。

骨髄移植：でウイルスを感染させた骨髄細胞を放射線照射 (950R) した C57BL/6 マウスに移植する。移植したマウスは経時的に採血を行い、末梢血解析 (白血球、赤血球、血小板、ヘモグロビンなど) FACS による GFP 細胞陽性率、末梢血染色標本による細胞形態の観察などにより白血病発症の有無を確認する。

(4) C/EBP α , PU.1 活性誘導が白血病幹細胞の自己複製活性に与える影響

(3) で作成した白血病モデルを用い、C/EBP α -ER, PU.1-ER トランスジェニックマウス由来の細胞では 4-HT の投与により C/EBP α , PU.1 の活性が迅速かつ可逆的に誘導できることを利用して、それらが白血病の表現型および白血病幹細胞の自己複製能に与える影響を解析する。

白血病幹細胞の自己複製能に対する C/EBP α , PU.1 の影響 (白血病継代移植モデル)：

白血病幹細胞の in vivo における自己複製能の指標の1つは、他のレシピエントマウスに二次移植が成立することである。そこで白血病を発症したマウスから骨髄細胞を取り出し、4-HT 存在下あるいは非存在下で 1 週間培養した後、放射線照射した他のレシピエントマウスに二次移植し、移植したマウスが白血病を発症するか否かを末梢血解析・生存率・死亡マウスの病

理解析などで詳細に検討する。

また、白血病マウスから取り出した骨髄細胞を直接 2 次移植し、これを 4-HT 投与群と非投与群の 2 つに分けて白血病発症の有無を上と同様に観察する。

以上により、誘導した C/EBP α あるいは PU.1 の活性が白血病幹細胞の自己複製能を抑制するか否かを検討する。一次移植マウスの白血病発症に対する C/EBP α , PU.1 の効果：

(4) で作製した白血病モデルマウスにおいて、一次移植直後より 4-HT を投与する群としない群に分け、C/EBP α , PU.1 の活性を in vivo で誘導した際の白血病発症・生存率に与える影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 白血病モデル細胞株の樹立

白血病遺伝子の自己複製能付与効果を確認するため、MLL-ENL, MLL-Septin6, MOZ-TIF2, AML1-ETO, AML1 point mutant, PML-RAR α 遺伝子をレトロウイルスを用いてマウス骨髄細胞に導入、メチルセルロース培地を用いたコロニー replating アッセイを行った。いずれの遺伝子も骨髄細胞の replating 能を上昇させ、in vitro での自己複製能付与効果が確認された。また、これらの細胞を IL-3 存在下で液体培養することにより、自立性に増殖する細胞株を樹立した。

(2) 白血病モデルマウスの作製

MLL-ENL, MLL-Septin6, AML1-ETO 遺伝子をレトロウイルスを用いてマウス骨髄細胞に導入、これを放射線照射したレシピエントマウスに移植することにより白血病モデルマウスを作製した。また同様の方法で、C/EBP α -ER, PU.1-ERトランスジェニックマウスの骨髄細胞に AML1-ETO, MLL-ENL, MLL-Septin6 遺伝子のウイルスを感染させ、骨髄移植することにより人為的に C/EBP α , PU.1 の活性を誘導できる白血病モデルマウスを作製した。

(3) PU.1, C/EBP α による in vitro 白血病コロニー形成能の抑制

AML1-ETO, MLL-ENL, MLL-Septin6 遺伝子によりそれぞれトランスフォームした細胞をメチルセルロース中で培養すると白血病コロニーを形成したが、これらの細胞にレトロウイルスで PU.1-ER を導入し、活性を 4-hydroxy tamoxifen (4-HT) で誘導するとコロニー形成は完全に抑制された。しかし興味深いことに C/EBP α -ER を用いて同様の実験を

行くと、AML1-ETO では PU.1 同様コロニー形成が抑制されたものの、MLL-ENL, MLL-Septin6 ではコロニー数の減少をみたのみで消失は認めなかった。

(4) PU.1, C/EBP α によるin vivo白血病発症の抑制

MLL-ENL を発現させたマウス骨髓細胞をマウスに移植し白血病を発症させた後、骨髓から白血病細胞を採取、C/EBP α -ER あるいは PU.1-ER ウイルスを感染させ、4-HT 存在下で数日培養した。この細胞を放射線照射したレシピエントマウスに2次移植し、白血病の発症を観察したところ、C/EBP α の活性を誘導した細胞ではコントロール同様の白血病発症を認めたのに対し、PU.1 活性を誘導した細胞では発症が完全に抑制された。

(5) まとめ

以上から、MLL-ENL によりトランスフォームされた LSC は PU.1 活性を誘導することにより白血病発症能を失うこと、すなわち LSC 活性を失うことが明らかとなった。また興味深いことに、この現象は C/EBP α では認められなかった。以上より、PU.1 が MLL-ENL 白血病の LSC がもつ自己複製能維持に特異的に関与している可能性が明らかとなった。

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9件)

1. Shibata F, Goto-Koshino Y, Morikawa Y, Komori T, Ito M, Fukuchi Y, Hauchins JP, Tsang M, Kitamura T, Nakajima H: Roundabout4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. *Stem cells*, 27: 183-190, 2009. 査読有
2. Nakajima H, Tamura T, Ito M, Shibata F, Kuroda K, Fukuchi Y, Watanabe N, Kitamura T, Ikeda Y, Handa M: SHD1 is a novel cytokine-inducible, negative feedback regulator of STAT5-dependent transcription. *Blood*, 113:1027-1036, 2009. 査読有
3. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz VLJ, Takai T, Kitamura T: Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. *Blood*, 111:688-698, 2008. 査読有
4. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC: CONCISE REVIEW: Isolation and characterization of cells from human term placenta: Outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*, 26:300-311, 2008. 査読有
5. Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T: AML1 mutations induced MDS and MDS/overt leukemia in mouse BMT model. *Blood*, 11:4297-4308, 2008. 査読有
6. Matsushita H, Nakajima H, Nakamura Y, Tsukamoto H, Tanaka Y, Yabe M, Asai S, Ono R, Nosaka T, Sugita K, Morimoto A, Hayashi Y, Hotta T, Ando K, Miyachi H: C/EBP α and C/EBP ϵ induce the monocytic differentiation of

myelomonocytic cells with the *MLL*-chimeric fusion gene. *Oncogene*, 27:6749-6760, 2008. 査読有

7. Fukuchi Y, Ito M, Shibata F, Kitamura T, Nakajima H: Activation of C/EBP α or PU.1 in hematopoietic stem cells leads to their reduced self-renewal and proliferation. *Stem cells*, 26:3172-3188, 2008. 査読有
8. Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Oki T, Shibata F, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Hauchins JP, Tybulewicz VL, Takai T, Kitamura T: Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *J Biol Chem*. 282:17997-18008, 2007. 査読有
9. Lu Y, Kitaura J, Oki T, Komeno Y, Ozaki K, Kiyono M, Kumagai H, Nakajima H, Nosaka T, Aburatani H, Kitamura T: Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. *Leukemia*, 21:2246-2257, 2007. 査読有

[学会発表](計9件)

1. 中島秀明, 越野裕子, 柴田 文, 福地由美, Dean Li, 北村俊雄: Robo4 の造血幹細胞における生理学的機能 第70回日本血液学会総会 ポスター(2008年10月10日、京都)
2. 渡辺直子, 北浦次郎, 原田浩徳, 米野由希子, 加藤菜穂子, 小埜良一, 野阪哲哉, 中島秀明, 北村俊雄: マウス骨髓移植モデルにおいて Evi1 は MDS/AML を誘発する 第70回日本血液学会総会 口演(2008年10月10日、京都)
3. 越野裕子, 柴田 文, 福地由美, Dean Li, 北村俊雄, 中島秀明: Robo4 の造血幹細胞における生理学的機能 第6回幹細胞シンポジウム(2008年5月16日、東京)
4. 中島秀明, 田村敏生, 伊藤美由紀, 柴田 文, 渡邊直英, 北村俊雄, 池田康夫, 半田 誠: 新規 STAT5 抑制因子 CIROS-5 の同定と機能解析 第69回日本血液学会総会 口演(2007年10月11日、横浜)
5. 渡辺直子, 沖 俊彦, 小埜良一, 原田浩徳, 湯地晃一郎, 東條有伸, 中島秀明, 野阪哲哉, 稲葉俊哉, 北浦次郎, 北村俊雄:

RasGRP4 と変異型 AML1 はマウス BMT モデルにおいて協調的に働き、T 細胞性白血病を誘発する 第69回日本血液学会総会 口演(2007年10月11日、横浜)

6. 松下弘道, 中島秀明, 中村嘉彦, 塚本秀雄, 田中由美子, 浅井さとみ, 小埜良一, 野阪哲哉, 安藤 潔, 宮地勇人: 活性誘導型 C/EBP α および C/EBP ϵ による MLL キメラ遺伝子を有する骨髓単球性白血病細胞の単球系分化 第69回日本血液学会総会 口演(2007年10月11日、横浜)
7. 小埜良一, 熊谷英敏, 中島秀明, 殿塚行雄, 菱谷 愛, 滝 智彦, 林 泰秀, 北村俊雄, 野阪哲哉: MLL 融合蛋白は Ras-MAP キナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する 第69回日本血液学会総会 口演(2007年10月11日、横浜)
8. 小埜良一, 熊谷英敏, 中島秀明, 殿塚行雄, 菱谷 愛, 滝 智彦, 林 泰秀, 北村俊雄, 野阪哲哉: HoxA9 と Ras-MAP キナーゼ系の協調作用が MLL 融合蛋白による急性白血病の発症に重要である 第66回日本癌学会学術総会 ポスター(2007年10月3日、横浜)
9. 中島秀明, David Smookler, 伊藤美由紀, 柴田 文, 福地由美, 越野裕子, 森川吉博, 新井文用, 須田年生, Rama Khokha, 北村俊雄: TIMP-3 による造血幹細胞動員のメカニズム 特定領域公開班会議「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構」(2007年5月17日、淡路)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30217723

(2)研究分担者

北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：20282527

(3)連携研究者

なし