

平成 21 年 2 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790669
 研究課題名（和文）階層的白血球分化モデルに基づく白血病幹細胞の純化・同定

研究課題名（英文）Identification of leukemic stem cells

研究代表者

亀崎 健次郎（KAMEZAKI KENJIROU）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：70380433

研究成果の概要：急性骨髄性白血病幹細胞は正常造血幹細胞とは Flt3^{hi}Thy-1^c-Kit^{lo}IL-3R^{hi} による表面抗原の差異で識別可能である。また、急性白血病の発症には、PU.1 や C/EBP α の発現低下に見られる転写因子のシグナル異常、Bmi-1 と MCL-1 の過剰発現などの遺伝子異常により、分化の阻害、細胞生存の強化、増殖能の強化など複数のステップを経て、白血病発症へ導かれることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：白血病、幹細胞、分化、自己複製

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病細胞は、すべてが自己複製をしながら増殖しているのではなく、造血幹細胞と同様に極少数の白血病幹細胞が自己複製と限定された分化を行いながら白血病を構成する階層的な幹細胞システムを構築していることが明らかにされた。

(2) 急性白血病に対する化学療法は、大多数の白血病芽球は極めて早いスピードで増殖しているために、分裂や増殖が盛んな細胞に対して特異性が高く開発された抗癌剤により、いったんは白血病芽球の著減を認める。しかし、造血幹細胞と同様に静止期に留まっている極少数の白血病幹細胞は抗癌剤への

感受性が低く化学療法に耐性を示し、化学療法後に再増殖して白血病再発へと繋がる。従って、白血病治療の最終目的として、白血病幹細胞の絶滅が重要となる。

(3) 白血病幹細胞の表現形および機能性は正常造血幹細胞と極めて類似しているため、2つの幹細胞群を区別することは難しい。従って白血病幹細胞の起源や詳細な表面抗原、自己複製機構など不明な点が多いため、白血病幹細胞を直接の標的とした治療法の開発が困難であるのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 白血病幹細胞の存在は実証されたが、未

だ白血病幹細胞を完全には純化できていない。本研究では、正常造血幹細胞と白血病幹細胞で微妙に異なる分化段階や表面抗原の発現量の差異を識別し、白血病幹細胞の純化を目指す。

(2)究極まで純化された白血病幹細胞を対象とすることで、2つの幹細胞群で機能する自己複製機構の異同を明らかにし、白血病幹細胞化に重要な遺伝子群の同定を目標とする。この過程を通して、白血病幹細胞を標的とした新しい治療法の開発につなげることを目的とする。

(3)さらには白血病幹細胞の理解を通じて、正常造血幹細胞の増殖、分化をコントロールする新しい技術の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

白血病幹細胞は正常の造血分化過程をある程度は模倣して白血病を構築することが示唆されている。従って白血病幹細胞の純化、すなわち白血病化発症の分化段階を検討するには、正常造血における分化過程の詳細な解明が必須である。そのために、正常の造血分化過程である造血幹細胞(HSC)およびその下流に位置する前駆細胞群、すなわちリンパ性共通前駆細胞(CLP)、骨髓球共通前駆細胞(CMP)、顆粒球/マクロファージ系前駆細胞(GMP)、巨核球/赤芽球系前駆細胞(MEP)と対比させながら、急性骨髄性白血病(AML)の検体において、

(1)マルチカラー・フローサイトメトリーによるヒト造血前駆細胞分離の手法を応用して、ヒト白血病幹細胞候補を純化する。

(2)長期間に渡ってヒト造血再構築が追跡可能な免疫不全マウス(IL2R γ ^{null}-NOD/SCIDマウス)に白血病を再現させる。

(3)同定した白血病幹細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に検索し、様々な分化段階の造血幹細胞および前駆細胞が白血化の原因となる遺伝子異常を探索する。

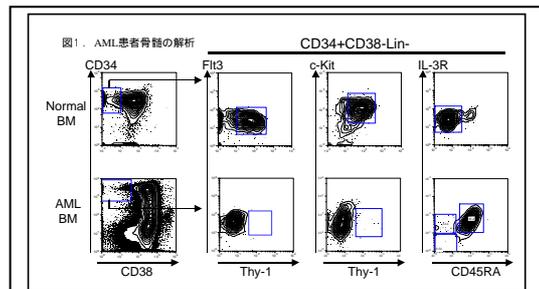
また、前白血病状態にある骨髄異形成症候群(MDS)においても、RA, RAEB-1, RAEB-2と病期が進行してAMLに至る過程を、上記と同様の検討を、併せて行う。

4. 研究成果

(1) 白血病幹細胞のフェノタイプ

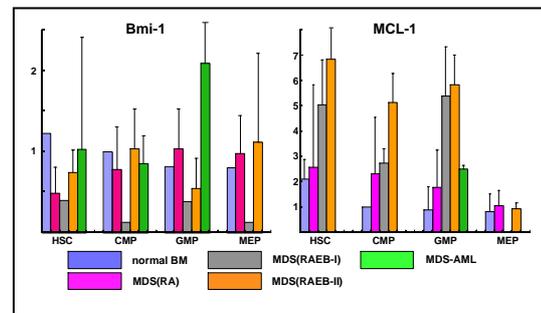
AML 幹細胞は、増殖している大多数の白血病芽球のフェノタイプである CD34⁺CD38⁺とは異なり、正常造血幹細胞と同一の CD34⁺CD38⁻細胞内のみ存在する。CD34, CD38 に加えて、Thy-1, c-Kit, Flt-3, IL-3R, CD45RA 抗体で多重染色して、正常造血および白血病幹細胞のフェノタイプを詳細に検討し、表面抗原により分別可能か否かを検討した。現在までに、CD34⁺CD38⁻分画内に濃縮している造血幹細胞

は、Flt-3⁺Thy-1⁺c-Kit^{lo}IL-3R^{lo}で区別可能であることを見いだした。これにより従来 CD34⁺CD38⁻または CD34⁺Thy-1⁺と提唱されていたヒト造血幹細胞をさらに濃縮可能となり得る。一方 AML では、CD34⁺CD38⁻細胞内で正常の造血幹細胞フェノタイプとは異なる Flt3^{hi}Thy-1⁺c-Kit^{lo}IL-3R^{hi} 分画が増加し、Flt3⁺Thy-1⁺c-Kit^{lo}IL-3R^{lo} は著減していた(図1)。この2分画を分離純化し、免疫不全 NOG マウスへ移植することで、白血病発症効率の比較検討を行っている。



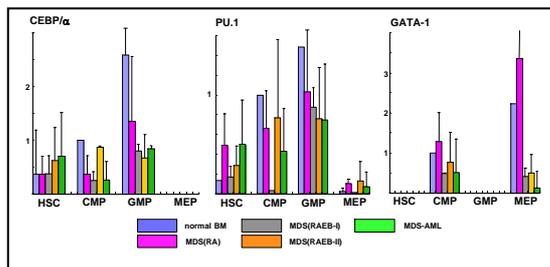
(2) 自己複製能に関する遺伝子発現

リアルタイム PCR 法を用いた検討では、MDS 病期が進行するにつれて造血幹細胞・前駆細胞群において、細胞生存に重要な抗アポトーシス遺伝子 MCL-1 の発現が亢進していた。また自己複製に重要な遺伝子 Bmi-1 は病期が進行するにつれて GMP レベルで発現の亢進を認めた(図2)。これらの結果より、MCL-1 が MDS の生存因子として働き、さらに Bmi-1 の過剰発現が GMP レベルで起こり、白血病幹細胞化している可能性が示唆された。



また、AML および MDS の CD34⁺CD38⁻分画における MCL-1 と向アポトーシス遺伝子 NOXA の発現バランスについて検討した。既報の cell line における検討では、NOXA と MCL-1 は負の相関を示すことが予想されたが、MDS/AML 検体では NOXA と MCL-1 には正の相関を認める傾向にあった。病期の進展に伴い MCL-1 が高発現して細胞が不死化する機構に対して、負に制御するように NOXA の発現も上昇する可能性があり、NOXA/MCL-1 バランスが MDS の進展と AML 発症に重要な役割を担っている可能性が示唆される。

(3) 転写因子異常による白血病化への関与
MDS/AML 発症には、分化増殖を制御している調節機構が破綻し、ある分化段階以降の分化が阻害され、幼弱な芽球が蓄積して発症する。実際に PU.1 や C/EBP α など顆粒球系分化に必須である転写因子の活性の低下・欠失が AML/MDS 症例において報告されている。つまり転写因子のシグナル異常が白血病発症に密接に関与している。そこで、MDS および AML の各病期の前駆細胞群で PU.1, C/EBP α , GATA-1 など骨髄球系の分化を制御する重要な転写因子の発現量の比較、また点突然変異や欠失の有無を検索し、MDS および AML 発症の関与を検討した。MDS 病期が進行するにつれ、GMP における PU.1 と C/EBP α 発現量が低下しており、分化停止が生じている可能性が示さ



れた (図 3)

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 13 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Shide K, Shimoda K, Kamezaki K, et al. Tyk2 mutation homologous to V617F Jak2 is not found in essential thrombocythaemia, although it induces constitutive signaling and growth factor independence. *Leuk Res* 31(8):1077-84, 2007. 査読有り

Kamezaki K, Miyamoto T, et al. Rituximab does not compromise the mobilization and engraftment of autologous peripheral blood stem cells in diffuse-large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 39(9):523-7, 2007. 査読有り

Shimoda K, Kamezaki K, et al. The effect of anabolic steroids on anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia: retrospective analysis of 39 patients in Japan. *Int J Hematol* 85(4):338-43, 2007. 査読有り

Shimoda HK, Kamezaki K, et al. Chronic thrombopoietin overexpression induces mesangioproliferative glomerulopathy

in mice. *Am J Hematol* 82(9):802-6, 2007. 査読有り

Kunisaki Y, Miyamoto T, Kamezaki K, et al. Marked improvement of cardiac function early after non-myeloablative BMT in a heavily transfused patient with severe aplastic anemia and heart failure. *Bone Marrow Transplant* 40(6):593-5, 2007. 査読有り

Matsuo Y, Miyamoto T, Kamezaki K, et al. Toxoplasmosis encephalitis following severe graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 17 yr experience in Fukuoka BMT group. *Eur J Haematol* 79(4):317-21, 2007. 査読有り

Kamezaki K, Miyamoto T, Akashi K, et al. Collection of mobilized peripheral blood stem cells from a donor with severe iron deficient anemia. *J Clin Apher* 22(5):292-4, 2007. 査読有り

Nonami A, Kamezaki K, Miyamoto T, et al. Successful treatment of myelodysplastic syndrome-related intestinal Behçet's disease by up-front cord blood transplantation. *Intern Med* 46(20):1753-6, 2007. 査読有り

Nonami A, Miyamoto T, Kamezaki K, et al. Successful treatment of primary plasma cell leukaemia by allogeneic stem cell transplantation from haploidentical sibling. *Jpn J Clin Oncol* 37(12):969-72, 2007. 査読有り

Nonami A, Kamezaki K, Miyamoto T, et al. Successful treatment of primary cardiac lymphoma by rituximab-CHOP and high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* 85(3):264-66, 2007.

Shima T, Kamezaki K, Miyamoto T, Akashi K, et al. Successful treatment of parainfluenza virus 3 pneumonia with oral ribavirin and methylprednisolone in a bone marrow transplant recipient. *Int J Hematol* 88(3):336-40, 2008. 査読有り

Aoki T, Miyamoto T, Kamezaki K, Akashi K, et al. Additional acquisition of t(1;21)(p32;q22) in a patient relapsing with acute myelogenous leukemia with NUP98-HOXA9. *Int J Hematol* 88(5):571-4, 2008. 査読有り

Shima T, Kamezaki K, Miyamoto T, Akashi K, et al. Disseminated tuberculosis

following second unrelated cord blood transplantation for acute myelogenous leukemia. *Transpl Infect Dis* 11(1):75-7, 2009

〔学会発表〕(計7件)

亀崎健次郎、宮本敏浩、その他。自己末梢血幹細胞移植後の再発に対して RIST を施行した悪性リンパ腫の検討。第29回日本造血細胞移植学会総会。2007年2月16-17日、福岡。

亀崎健次郎、その他。福岡 BMT グループにおける臍帯血移植の解析。第69回日本血液学会総会。2007年10月11-13日、横浜。

宮本敏浩、亀崎健次郎、その他。自家末梢血幹細胞移植における Rituximab の幹細胞動員、生着および移植後好中球減少に及ぼす影響。第69回日本血液学会総会。2007年10月11-13日、横浜。

沼田晃彦、亀崎健次郎、宮本敏浩、その他。末梢性 T 細胞性リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植の後方視的解析。第69回日本血液学会総会。2007年10月11-13日、横浜。

高嶋秀一郎、亀崎健次郎、宮本敏浩、その他。同種移植後の再発性急性骨髄性白血病に対して gemtuzumab ozogamicin を分割投与、再移植を行った2例の検討。第69回日本血液学会総会。2007年10月11-13日、横浜。

河野健太郎、亀崎健次郎、宮本敏浩、その他。Biphenotypic acute leukemia 8例に対する后方視的解析。第70回日本血液学会総会。2008年10月10-12日、京都。

竹中克斗、亀崎健次郎、その他。同種造血幹細胞移植後サイトメガロウイルス再活性化に対する経口バルガンシクロビルによる早期治療の有効性。第70回日本血液学会総会。2008年10月10-12日、京都。

〔図書〕(計1件)

亀崎健次郎、長藤宏司。多発性骨髄腫 神経病変。日本臨床 65(12):2235-2237, 2007

〔その他〕

ホームページ等:

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀崎健次郎 (KAMEZAKI KENJIROU)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 70380433

(2)研究協力者

宮本敏浩 (MIYAMOTO TOSHIHIRO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 70343324

赤司浩一 (AKASHI KOICHI)

九州大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号: 80380385