

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890051

研究課題名(和文) Hes1 発現制御破綻による白血病発症機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of acute leukemia induced by dysregulated expression of Hes1

研究代表者

坂田(柳元) 麻実子 (SAKATA(YANAGIMOTO) MAMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80451805

研究成果の概要：

Notch シグナルは急性リンパ性白血病の発癌に重要であることは、我々を含めた複数のグループからこれまでも報告されていたが、急性骨髄性白血病における Notch シグナルの重要性は明らかではなかった。我々の研究により Notch シグナルの重要な下流分子である Hes1 は骨髄性白血病の発症に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらにヒト白血病細胞株でも Hes1 がリンパ性白血病細胞株と同程度に高発現していることから、ヒト白血病における重要な役割が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：血液内科学

科研ひの分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：Hes1、白血病

1. 研究開始当初の背景

白血球は骨髄球とリンパ球に大別される。このうち Notch シグナルはリンパ球の分化において重要な分子として知られていた。我々を含む複数のグループから Notch シグナルはマウスとヒトの双方においてリンパ球の発癌に重要なシグナルであることが報告された。成人および小児 T リンパ性白血病

の約 50%において Notch1 に変異を認めることが報告され、また、我々は成人 B 悪性リンパ腫の数%において Notch2 に変異を見いだした。Notch シグナルの発癌の機序としては、Notch シグナルの下流のシグナルである RBP-Jk が重要な癌遺伝子である c-Myc の mRNA の転写を直接に誘導するなどの機序

が報告された。

しかしながら、これまで骨髓球においては、Notch シグナルの活性化が骨髓球の分化を抑制するという細胞株のデータはあるものの、限定的で明確ではなかった。

申請者は骨髓前駆細胞からの肥満細胞の分化誘導を調べる過程で、Notch シグナルが活性化すると下流の転写因子 Hes1 と GATA3 の mRNA の双方の転写が促進され、肥満細胞への分化が誘導されることを見出した。しかしながら Hes1 のみを活性化することにより、骨髓前駆細胞は肥満細胞あるいは顆粒球マクロファージなどの特定の系統に分化せず、未分化な芽球様の形態を維持して増殖を続けた。さらに Hes1 を導入した骨髓前駆細胞では C/EBPalpha の mRNA の発現が減少していた。C/EBPalpha は骨髓球分化に重要な転写因子であり、ヒト骨髓性白血病の約 15% に機能欠損型の変異が存在することが報告されている。これらの知見から、Hes1 の異常な活性化は骨髓性白血病の発症機序となりうる可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究は Hes1 を中心に白血病発症・維持のメカニズムについて詳細に解析する。白血病発症における未発見の機序を解明することにより、癌治療の新しい治療戦略の開発に役立つ。

我々を含めてマウスの造血幹細胞分画にレトロウイルスを用いて Hes1 を導入したこれまでの報告では、観察期間内には白血病を発症していない。申請者のこれまでの研究では、幹細胞よりも分化した骨髓球系共通前駆細胞および顆粒球・マクロファージ共通前駆細胞に Hes1 を導入することにより増殖の促進が見られた。

近年、白血病を含めた癌研究において、白血病幹細胞が存在すると考えられている。白血病幹細胞は自己複製能、腫瘍を構成する細胞に分化する能力を有し、かつ増殖し続け、白血病の供給源となる細胞である。臨床的にも、白血病を幹細胞レベルで根絶することが白血病の治療にも重要であることから、白血病幹細胞の同定および動態の解析は重要な課題である。白血病幹細胞の起源については、正常の造血幹細胞に由来するとの報告もあれば、より分化した前駆細胞由来であるとの報告もある。過剰発現系による白血病モデルの多くは造血幹細胞分画を含む細胞へ癌原因子が導入されており、より骨髓球系へ分化した前駆細胞レベルで白血化を引き起こすとの報告はわずかである。これらのことから、Hes1 がどの分化段階へ導入することで白血化を起こすかを明確に特定することにより、白血病幹細胞の起源を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスの骨髓細胞を採取後、FACSAria を用いた細胞分離により造血幹細胞分画 (cKit+Sca1+Lin+)、骨髓球系共通前駆細胞分画 (cKit+Sca1-Lin-CD34+CD16/32low)、顆粒球マクロファージ前駆細胞分画 (cKit+Sca1-Lin-CD34+CD16/32+) を単離した。ウイルスパッケージング用細胞株 pLAT-E に Hes1cDNA を挿入したレトロウイルスベクターをトランスフェクション後、48 時間後に上清を回収した。細胞皿にコーティングしたレトロネクチン上でウイルスを含む上清および単離した細胞を 48 時間インキュベートすることにより細胞にレトロウイルスを感染させた。48 時間後に細胞を回収し、GFP 陽性をマーカーとして遺伝子が導入

された細胞をセルソーターで分取後、半固形培地で培養した。8-10 日毎に細胞を回収し、サイトスピンで細胞形態の観察、あるいは次の半固形培地に蒔いた。

(2) *in vivo* での白血病の発症の有無を調べるため、(1)の方法により遺伝子導入された細胞を致死量の放射線を照射したマウスへ移植した。

(3) ヒト白血病細胞株における Hes1 の解析

① ヒト白血病細胞株における Hes1 蛋白発現レベルの解析

② ヒト白血病細胞株における Hes1 遺伝子変異の検索

③ ヒト白血病細胞株における Hes1 転写調節領域の遺伝子変異の検索

4. 研究成果

(1) *in vitro* での細胞の不死化の観察

Hes1 を導入した前駆細胞は、半固形培地を用いた培養を行ったところ、数代にわたって継代が可能であった。また液体培養でも長期培養が可能であった。すなわち、*in vitro* での細胞の不死化が観察された。不死化した細胞のサイトカイン依存性について調べたところ、IL3 依存性であった。サイトスピンでは芽球様の形態を維持していた。

(2) *in vivo* における白血病発症の観察

次に、*in vivo* での白血病の発症の有無を調べるため、致死量の放射線を照射したマウスへ Hes1 を導入した骨髓前駆細胞を移植した。経時的にマウス末梢血を解析、GFP 標識蛋白の発現を指標として白血病化の有無を調べた。Hes1 単独の導入によっては、白血化は観察されなかった。マウスの白血病モデルにおいても多くはセカンドヒット、すなわち第

二の変異が加わってから白血病を発症することが知られる。In vitro の Hes1 導入細胞は IL3 依存性であることから、IL3 下の重要なシグナルである活性化 STAT5 を同時に導入したが、白血化は観察されなかった。そこで、別種のセカンドヒットが必要と考え、bcr/abl と同時に前駆細胞へ導入したところ、白血化を観察した。bcr/abl 単独の導入は前駆細胞では白血化を起こさなかった。このことから Hes1 と bcr/abl の協調的発現が前駆細胞を起源とする白血病の発症が重要であることが明らかとなった。

(3) ヒト検体における Hes1 の解析

次に、ヒト白血病において、Hes1 の発現制御の破綻が実際に関わっているかを調べるためヒト骨髓性白血病細胞株において Hes1 の蛋白の発現の有無を Westernblot 法により調べた。ヒト骨髓性白血病では、Notch-Hes1 シグナルの破綻が病態に重要であることが知られるヒトリンパ性白血病細胞株と同程度に Hes1 蛋白を強く発現していた。そこで白血病細胞株について Hes1 の coding 領域および promoter 領域の変異を検索したが、変異は認められなかった。

(4) 結果のまとめ

これらの結果から、マウスにおいて骨髓前駆細胞への Hes1 単独の導入により、*in vitro* での不死化には十分であるが、*in vivo* での白血化には単独では不十分であり、第二の変異と協調して白血化を起こすと考えられた。ヒト骨髓性白血病細胞株においても、メカニズムは不明ながら Hes1 の高度な発現を認め、病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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5件)

(1) Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate.

Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S.

Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 2008;105:7839-44.

(2) Notch 変異と分子標的療法

坂田麻実子、千葉滋

血液・腫瘍科、査読無、2009;58:57-62

(3) A myeloablative conditioning regimen for patients with impaired cardiac function undergoing allogeneic stem cell transplantation: reduced cyclophosphamide combined with etoposide and total body irradiation.

Yoshimi A, Nannya Y, Sakata-Yanagimoto M, Oshima K, Takahashi T, Kanda Y, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M.

Am J Hematol. 査読有 2008;83:635-9.

(4) Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity.

Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Saito T, Taniuchi I, Chiba S, Sone S, Yasutomo K.

Nat Immunol. 査読有 2008;9:1140-7.

(5) Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis.

Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita

T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S

Pigment Cell Melanom Res. 査読有 2008;21:70-78

[学会発表] (計8件)

(1) Mamiko Sakata-Yanagimoto Notch signaling as a therapeutic target of cancer

第13回日韓癌ワークショップ2008年12月13日韓国、Daejeon (大田)

(2) 中原 史雄 hairy enhancer of split-1 (Hes-1)による造血前駆細胞の不死化、第70回日本血液学会、2008年10月10日、京都

(3) 坂田 麻実子 Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. 第4回麒麟塾、2008年7月19日、東京

(4) 坂田-柳元麻実子 Notchシグナルによる粘膜型肥満細胞の成熟および局在の制御を介した寄生虫免疫制御機構、第37回日本免疫学会、平成19年11月21日、東京

(5) 坂田-柳元麻実子 Notchシグナルによる肥満細胞の分化、第69回日本血液学会・第49回臨床血液学会合同総会、平成19年10月12日、横浜

(6) 坂田-柳元麻実子 Notch2 regulates mast cells. Notchミーティング、平成19年9月

23日-27、ギリシャ、アテネ

(7) 坂田-柳元麻実子、山口悦子、斉藤俊樹、小川誠司、黒川峰夫、千葉 滋 Notchシグナルによる肥満細胞の分化、Notchシグナル研究会、平成19年7月6日、三島

(8) 坂田-柳元麻実子、山口悦子、斉藤俊樹、小川誠司、黒川峰夫、千葉 滋 Notchシグナルによる肥満細胞の分化と機能の制御、第5回幹細胞シンポジウム、平成19年5月18日、淡路島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田(柳元) 麻実子

(SAKATA (YANAGIMOTO) MAMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80451805

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中原史雄：東京大学・医学系研究科・大学院生