

平成23年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591111

研究課題名 (和文) 白血病幹細胞における Notch シグナルの役割についての検討

研究課題名 (英文) The role of Notch signaling in the leukemia stem cells.

## 研究代表者

熊野 恵城 (KUMANO KEIKI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90396721

## 研究成果の概要 (和文)：

マウス骨髄細胞にレトロウイルスにより種々の白血病関連遺伝子 (MLL-ENL) を導入した後、myeloid 系の培養条件では AML が、lymphoid の培養条件では ALL が発症する。AML として発症した細胞に OP-9 stroma 細胞上で、レトロウイルスにて恒常的活性化型 Notch1 を導入することにより一部 T 細胞系の表面マーカーが、B 細胞系 (Pax5, E2A, EBF) 遺伝子の導入により、B 細胞系の表面マーカーの発現が認められた。

このような白血病の lineage switch とニッチとの関連を調べるため、Notch ligand である Delta1 を発現させた OP-9 細胞と MLL-ENL で不死化させた細胞との共培養により一部の細胞では T 細胞系列への分化が認められた。このように白血病細胞の中に多分化能をもつ細胞が存在し、それらはニッチシグナルにより分化が制御される可能性が示された。このような多分可能を持つ細胞はおそらく白血病幹細胞と思われるが、今後はそれらの検証を行っていく予定である。

## 研究成果の概要 (英文)：

Murine bone marrow cells transformed by MLL-ENL induced AML in the culture for myeloid condition, and ALL in the culture for lymphoid condition. MLL-ENL induced AML cells were transduced with Notch1 active form and cultured on the OP-9 stromal cells. The one part of these cells expressed T cell specific surface marker. In the same way, AML cells trasduced with B cell gene (Pax5, E2A, EBF) expressed B cell marker.

AML cells were cultured on the Delta1 expressing OP-9 cells and activated by the Notch signaling. As a result, T cell differentiation was observed in the part of the AML cells. These results indicated that Multipotent cells existed in the MLL-ENL AML cells and the differentiation potential might be regulated by the niche signaling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：幹細胞

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：Notch、白血病幹細胞、ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

白血病を始めとした種々のがんにおいて、ごく少数の幹細胞が存在し、限られた分化と自己複製を繰り返しながらがん構成細胞を供給し続ける、がん幹細胞システムという概念が提唱されている。白血病を含めた造血器腫瘍はがん幹細胞システムの良いモデルとされており、その研究は著しく進んできている。造血幹細胞を含む種々の幹細胞は、ニッチと呼ばれる微少環境において維持されることが明らかにされている。骨髄中の造血幹細胞の大部分は、骨周辺の骨芽細胞に接着して存在し (osteoblastic niche)、細胞周期の遅い静止期にある。又一部の造血幹細胞は、骨髄の血管周囲にも存在している (vascular niche)。このような骨髄造血微少環境は、正常な造血細胞のみならず、白血病などの造血器腫瘍にも、ニッチとして働いていると考えられる。したがって、正常な造血幹細胞と同様に白血病幹細胞も、その未分化性の維持、細胞増殖、細胞死の抑制にニッチが係っている可能性がある。白血病幹細胞の一部は正常な造血幹細胞と同様にニッチにおいて静止期にあると考えられ、細胞周期依存性の薬剤に対する耐性が高いとされている。また、BCR-ABL の活性を阻害しても造血幹細胞に由来する CML の白血病幹細胞はニッチで生存し続けることが想定される。また骨髄微少環境内では、細胞接着を介した抗がん剤耐性機構も、白血病の治療率低下につながると考えられる。そのためイマチニブや一般的な抗がん剤による治療では、PCR でも微小残存病変の検出が出来ないレベル (分子学的寛解) にまで腫瘍量を減らせても、白血病幹細胞を完全には根絶できないと考えられ、白血病は再発してくる。したがって、白血病幹細胞を直接の標的とした治療が治癒に必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

白血病幹細胞をターゲットとした治療戦略の際には、白血病幹細胞と正常造血幹細胞との違いを明らかにする必要がある。通常白血病幹細胞の自己複製や未分化性の維持にかかわる分子は造血幹細胞にも同様に重要であり、このような分子を治療の標的にした場合、正常造血も障害を受けることになるからである。

これまでに白血病幹細胞の自己複製に必要とされている分子 (Bmi-1 など) は正常造血幹細胞においてもその幹細胞活性の維持に必須であり、それらを治療の標的にすることはできないが、Notch シグナルに関しては正常造血幹細胞における必要度が低く、その点に関しては問題がないと考えられる。他の癌幹細胞 (脳腫瘍の一部など) においては Notch

シグナルの阻害により、癌幹細胞が根絶されうると報告されている。本研究における検討により、Notch シグナルの白血病幹細胞での重要性を明らかにすることで、白血病幹細胞の根絶が期待できると考えられる。

また白血病発症に Notch シグナルが必須な白血病においても白血病幹細胞という観点から評価することにより、その分子機構について検討する。

## 3. 研究の方法

OP-9 stroma 細胞上で、骨髄前駆細胞にレトロウイルスにて恒常的活性化型 Notch1 を導入する系において、同時に他の分化系列へ導く遺伝子を導入することで、Notch シグナルによる T 細胞分化に与える影響について、*in vitro* で検討する。そのような遺伝子の候補としては骨髄系 (活性化型  $\beta$ -catenin)、赤芽球・巨核球系 (GATA-1)、B 細胞系

(Pax5, E2A, EBF)、TCR $\beta$  (CALM-AF10) などを予定している。*In vitro* で lineage switch が可能であったものについては、造血幹細胞に活性化型 Notch1 とともに同時に導入後、白血病の発症およびその表現系を *in vivo* で観察する。T-ALL 以外の白血病化が起こることが確認された場合、これらはすべて転写因子等の核内で機能する分子であるため、それらの遺伝子を ER との融合遺伝子として導入し、タモキシフェンにより誘導することで、T-ALL からの系列変化が起こるかを観察する。その場合、白血病化はより未分化な多能性前駆細胞以前で起こっていることになる。

## 4. 研究成果

OP-9 stroma 細胞上で、骨髄前駆細胞にレトロウイルスにて恒常的活性化型 Notch1 を導入する系において、同時に他の分化系列へ導く遺伝子を導入することで、Notch シグナルによる T 細胞分化に与える影響について、*in vitro* で検討した。B 細胞系 (Pax5, E2A, EBF) 遺伝子の導入により、B 細胞系への分化が認められた。

マウス骨髄細胞にレトロウイルスにより種々の白血病関連遺伝子 (MLL-ENL) を導入した後、myeloid 系の培養条件では AML が、lymphoid の培養条件では ALL が発症する。AML として発症した細胞に OP-9 stroma 細胞上で、レトロウイルスにて恒常的活性化型 Notch1 を導入することにより一部 T 細胞系の表面マーカーが、B 細胞系 (Pax5, E2A, EBF) 遺伝子の導入により、B 細胞系の表面マーカーの発現が認められた。このような白血病の lineage switch とニッチとの関連を調べるため、Notch ligand である Delta1 を発現させた OP-9 細胞と MLL-ENL で不死化させた細胞との

共培養により一部の細胞ではT細胞系列への分化が認められた。このように白血病細胞の中に多分化能をもつ細胞が存在し、それらはニッチシグナルにより分化が制御される可能性が示された。このような多分可能を持つ細胞はおそらく白血病幹細胞と思われる。そのため、これらの細胞を放射線照射したレシピエントマウスに経静脈的に移植することにより、移植後数週から数カ月の期間、造血器腫瘍の発症の有無を観察し、いくつかにおいて白血病の発症を観察中である。今後は、これらのマウスに種々の抗癌剤の投与を行うことで、白血病幹細胞が濃縮されてくると考えられ、それらの存在するニッチについての検討を加える予定である。

## 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 17 件)

- ① 熊野恵城: “造血細胞のリプログラミングの現状と血液疾患治療への応用” 血液・腫瘍科 60. 460-464 (2010), 査読なし
- ② Kumano K, Kurokawa M. The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol.* 222:282-285, 2010. 査読あり
- ③ Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115:2872-2881, 2010. 査読あり
- ④ Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. *Cancer Sci.* 100:2444-2450, 2009. 査読あり
- ⑤ Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature.* 460:904-908, 2009. 査読あり
- ⑥ Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, Ota Y, Izutsu K, Sakata-Yanagimoto M, Hangaishi A, Yagita H, Fukayama M, Seto M, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 100:920-6, 2009. 査読あり
- ⑦ Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. *J Immunol.* 182:6168-78, 2009. 査読あり
- ⑧ Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood.* 113:6584-92, 2009 査読あり
- ⑨ 熊野恵城, 黒川峰夫: “白血病幹細胞を標的とした新規治療法” *Biotherapy* 23. 371-378 (2009), 査読なし
- ⑩ 熊野恵城, 黒川峰夫 造血ニッチと幹細胞制御 血液フロンティア 19:446-451, 2009. 査読なり
- ⑪ 熊野恵城, 黒川峰夫: “造血幹細胞” 医学のあゆみ 229. 698-702 (2009), 査読なし
- ⑫ 熊野恵城, 黒川峰夫 幹細胞の基礎研究: 造血幹細胞 医学のあゆみ 229:698-702, 2009. 査読なし
- ⑬ Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:7839-44, 2008. 査読あり
- ⑭ Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito To, Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, and Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of

- melanocyte homeostasis. Pigment Cell Melanoma Res. 21:70-8, 2008. 査読あり
- ⑮ 熊野恵城、黒川峰夫：“造血器腫瘍におけるがん幹細胞研究の進展：AML幹細胞研究の進展” 血液・腫瘍科 56. 694-700 (2008), 査読なし
- ⑯ 熊野恵城、黒川峰夫：“白血病幹細胞を標的とした新規治療法の開発” 医学のあゆみ 227. 83-86 (2008), 査読なし
- ⑰ 熊野恵城、黒川峰夫 TEL-AML1 関連小児白血病発症過程で、がん化過程を開始する細胞とがんを伝播する細胞 分子細胞治療 7:470-471, 2008. 査読なし

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① Keiki Kumano, Shunya Arai, Koki Ueda et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Primary Chronic Myelogenous Leukemia Patient Sample. 52<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting. Dec. 4, 2010. Orland, Florida, USA.

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 熊野恵城、黒川峰夫：“Annual Review血液” 中外医学社. 10-17 (2008)
- ② 熊野恵城、千葉滋：“みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床” 医薬ジャーナル社. 31-36 (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊野 恵城 (KUMANO KEIKI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90396721

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし