

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791008

研究課題名(和文)

ヒト造血化したマウスにおける白血病幹細胞ニッチ解析

研究課題名(英文)

Leukemic stem cell in humanized mouse bone marrow niche

研究代表者

嶋 晴子 (SHIMA HARUKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80424167

研究成果の概要(和文):

白血病幹細胞のニッチ制御機構に迫ることを目的として本研究を行った。まずヒト造血化マウスモデルを用い、ヒト正常造血幹細胞は、移植後 4 から 8 週にかけて低酸素状態を獲得し、8 から 12 週にかけて静止期を獲得し、骨梁辺縁の骨髓ニッチに局在するという特徴を明らかにした。さらに、MOZ-TIF2 白血病マウスモデルを作製し、白血病幹細胞は M-CSFR を高発現する特徴を明らかにした。今後はヒト造血化マウスを用いた白血病幹細胞解析に発展させたいと考える。

研究成果の概要(英文):

Using humanized mouse model, we showed that human hematopoietic stem cells acquired hypoxic state between 4 and 8 weeks after transplantation, followed by acquisition of quiescent state between 8 and 12 weeks after transplantation, and localized in endosteal lesion of engrafted bone marrow. We also developed MOZ-TIF2 induced AML mouse model and demonstrated that AML stem cells expressed high levels of M-CSFR. Further study is expected to analyze AML stem cells using humanized mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：造血幹細胞、ニッチ、白血病

1. 研究開始当初の背景

ヒト白血病細胞をマウスに移植すると、ごくわずかな細胞集団のみが白血病を再構築できることから、この少数の幹細胞が限られた分化と自己複製を繰り返しながら白血病細胞を供給し続ける「白血病幹細胞」という概念が広く受け入れられている。近年、白血病幹細胞は骨芽細胞の豊富な骨梁領域に生着し、これらの多くは静止期にあり薬剤耐性であることが示され、白血病幹細胞ニッチの存在が示唆された。しかしヒト白血病の解析は、

ヒト-マウスの異種移植モデルで行われるため、免疫システムやサイトカインなどの交差反応性の有無の問題から、解析が不十分となっている。

2. 研究の目的

本研究では、より白血病患者の生体に近いヒト造血系を構築した「ヒト造血化マウス」を用いて白血病マウスモデルを作製し、これまで不明であった正常造血幹細胞と白血病幹細胞それぞれのニッチの違いや、ニッチ由来

のシグナル分子の相違点を明らかにすることで、白血病幹細胞のニッチ制御機構に迫りたいと考える。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常造血幹細胞の骨髓ニッチにおける動態解析

ヒト CD34+ 臍帯血細胞を超免疫不全マウスである NOG マウスに移植し、移植後 4、8、12 週においてマウスの骨髓細胞を回収し、生着したヒト造血幹前駆細胞の細胞周期および局在を解析した。細胞周期は、回収した骨髓細胞をヒトおよびマウスの抗 CD45、CD34、CD38、Lineage 抗体および Pyronin Y で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、一部のマウスは解析 24 時間前から 8 時間おきに 3 回の BrdU の腹腔内投与を行い、マウス骨髓の凍結切片を作製し、免疫化学組織染色を用いて BrdU 陽性および陰性細胞の局在を同定した。さらに、骨髓ニッチにおいて静止期にある造血幹細胞は低酸素状態にあることから、レシピエントマウスに低酸素マーカーである Pimonidazole を投与し、マウスに生着したヒト造血幹前駆細胞の酸素状態をフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) 急性骨髓性白血病(AML)マウスモデルにおける白血病幹細胞の解析

マウスモデルの作製

AML 発症にかかわるキメラ遺伝子として MOZ-TIF2 をレトロウイルス感染の系を用いてマウス造血幹前駆細胞に導入し、レシピエントマウスに移植し、白血病マウスモデルを作製した。

AML を発症したマウスの白血病幹細胞の解析

AML を発症したマウスから骨髓細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて表面抗原の解析を行った。

(3) ヒト AML マウスモデルの作製

(2)と同様にヒト CD34+ 臍帯血細胞にレトロウイルス感染の系を用いて MOZ-TIF2 を導入し、NOG マウスに移植して白血病発症の有無を観察した。

4. 研究成果

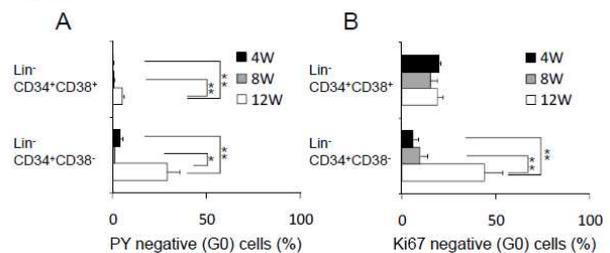
(1) ヒト臍帯血細胞を超免疫不全マウスである NOG マウスに移植することで、移植後 4 週の早期から 90% 以上のヒト造血キメリズムを示し、その後も 4 か月にわたりヒト造血キメリズムを維持するマウスモデルを作製した。造血幹細胞は「ニッチ」とよばれる骨梁領域のもっとも低酸素な領域において静止期を維持し、生涯にわたって造血細胞を供給することが知られている。そこで、このマウ

スモデルを用いて、移植後マウス骨髓に生着したヒト造血幹細胞がどのように骨髓ニッチに接着し静止期を獲得するか検討した。

細胞周期解析

生着したヒト CD45 陽性細胞のうち、Lin-CD34+CD38- の未分化な造血幹細胞の含まれる分画と、Lin-CD34+CD38+ の前駆細胞分画について PY および Ki67 を用いて細胞周期を検討した。その結果、特に Lin-CD34+CD38- 分画において、PY 陰性または Ki67 陰性の G0 期の静止期にある細胞集団が移植後 8 から 12 週にかけて有意に増加することが示された。(図 1A、B)

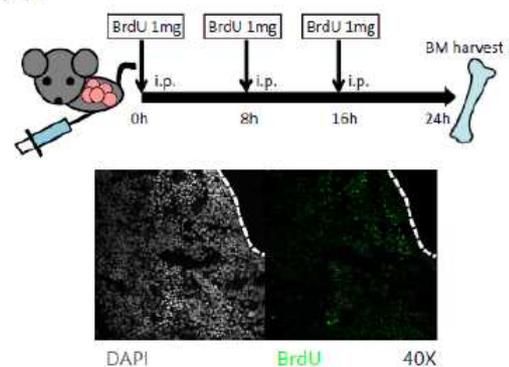
図 1



静止期細胞の骨髓における局在

BrdU を投与した移植後 12 週のマウスの骨髓切片を作製し、BrdU 染色を行い、Confocal で解析した。その結果、骨梁辺縁のニッチ領域に局在する細胞は、BrdU 陰性であることが示された。(図 2)

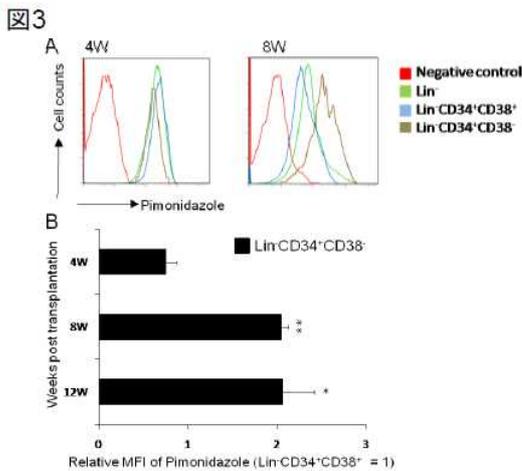
図 2



酸素状態の解析

Pimonidazole を投与したマウスの骨髓細胞を回収し、生着したヒト CD45 陽性細胞のうち、Lin-CD34+CD38- 分画と、Lin-CD34+CD38+ 分画および Lin+ の分化傾向にある細胞について、Pimonidazole の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。その結果、移植後 4 週ではどの細胞分画も Pimonidazole の発現レベルが一定であったが、移植後 8 週では Lin-CD34+CD38- の未分化な細胞分画が他の細胞分画に比し有意に Pimonidazole の発現が高いレベルを示し、低酸素状態にある細胞

の比率が高いことが示された。(図3)



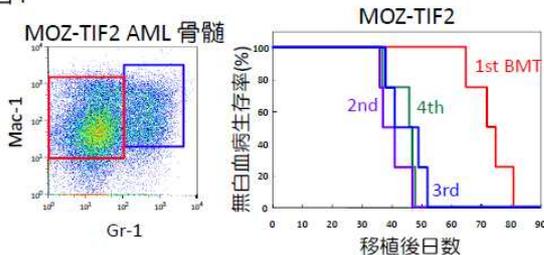
以上から、移植後マウス骨髄に生着したヒト造血幹細胞は、移植後早期には静止期を獲得した細胞は非常に少ないが、移植後4から8週にかけて特に未分化な造血幹細胞分画において低酸素状態が獲得され、8から12週において静止期を獲得する細胞が増加し、骨梁辺縁のニッチに定着することが示唆された。

(2) 急性骨髄性白血病(AML) マウスモデルにおける白血病幹細胞の解析

マウスモデルの作製

レトロウイルス感染の系を用いて MOZ-TIF2 と GFP をエンコードするプラスミドを形質導入したマウス造血幹前駆細胞をレシピエントマウスに移植すると、Mac-1 陽性、Gr-1 陽性の AML を発症した(図4)。この白血病細胞は複数回移植が可能であり、レシピエントマウスに白血病を誘導することから、白血病幹細胞の存在が示唆された。

図4

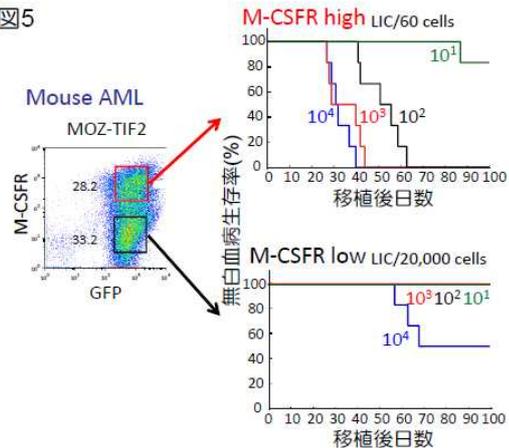


AML を発症したマウスの白血病幹細胞の解析

白血病マウスの骨髄細胞を回収し、フローサイトメトリーで表面抗原の解析を行った。その結果、白血病細胞の中に、M-CSFR 高発現分画と低発現分画が存在することが見出された。M-CSFR 高発現分画と低発現分画の細胞をフローサイトメトリーでソートし、規定の細胞数でマウスに二次移植すると、M-CSFR 高発

現の細胞は 10^2 個の移植で全レシピエントマウスが AML を発症したのに対し、M-CSFR 低発現の細胞は 10^4 個の移植でも約半数のレシピエントマウスは白血病を発症しなかった(図5)。以上より、MOZ-TIF2 白血病幹細胞は、M-CSFR 高発現分画により高頻度に存在することが示唆され、M-CSFR は白血病幹細胞に対する治療の標的としての可能性が見出された。M-CSFR は MOZ 白血病のみならず、様々な AML 患者で発現上昇が報告されており、幅広い AML 患者において臨床応用が期待される。

図5



(3) ヒト AML マウスモデルの作製

(2)と同様にヒト臍帯血細胞に MOZ-TIF2 を導入し白血病マウスモデルの作製を試みたが、導入効率不良および NOG マウスの長期生存が困難なことから、実験系の改良が必要である。今回のマウスでの知見のヒト造血化マウスモデルへの応用が今後の課題である。

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5件)

嶋晴子、北林一生、幹細胞生物学からみた AML 治療の新たな方向性、血液内科、査読なし、62 巻、4 号、2011、98-105.

嶋晴子、北林一生、MOZ-TIF2 白血病における白血病幹細胞の生成機構、血液内科、査読なし、62 巻、1 号、2011、409-414.

Shima H, Takubo K, Tago N, Iwasaki H, Arai F, Takahashi T, Suda T. Acquisition of G(0) state by CD34 positive cord blood cells after bone marrow transplantation. Experimental Hematology. 査読あり, Vol.38, No.12, 2010, 1231-1240.

Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H,

Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of CSF1R is crucial for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. Nature Medicine. 査読あり、Vol.16、No.5、2010、580-585.

〔学会発表〕(計3件)

Haruko Shima, Yukiko Aikawa, Kumiko Yamanaka, Takuo Katsumoto, Mika Shino, Akihiko Koseki, Issay Kitabayashi, Regulation of stem cells in MOZ and other leukemias, 第8回幹細胞シンポジウム、2010年5月14日、淡路

Haruko Shima, Keiyo Takubo, Naoko Tago, Hiroko Iwasaki, Kentaro Hosokawa, Hiroki Yoshihara, Fumio Arai, Takao Takahashi, Issay Kitabayashi, Toshio Suda. Acquisition of G0 state in CD34-positive cord blood cells after bone marrow transplantation. 第71回日本血液学会総会、2009年10月23日、京都

〔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

嶋 晴子 (SHIMA HARUKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80424167

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし