

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890055

研究課題名（和文）難治性白血病原因遺伝子 Evi-1 による白血病幹細胞生成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of leukemia stem cell regulation by leukemia oncogene Evi-1

研究代表者 佐藤 智彦 (SATO TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：90553694

研究成果の概要（和文）：

今回われわれは新規に Evi-1-GFP ノックインマウスを作製し、これより胎児期・成体いずれの造血幹細胞(HSC)分画においても Evi-1 (GFP) は高発現しており、マウス骨髄移植の系から Evi-1 陽性 KSL 細胞のみが Long-term HSC として機能し、Evi-1 は血球の中で最も未分化な Long-term HSC をマークすることが示された。(現在投稿中) HSC に高発現する Evi-1 が白血病においても幹細胞をマークすることを明らかにするため、白血病原因遺伝子 BCR-ABL と上記マウスを組み合わせた、Evi-1-GFP ノックイン慢性骨髄性白血病(CML)マウスを作製し、正常骨髄と同様に Evi-1 陽性 CML KSL 細胞で Evi-1 が高発現していることを明らかにした。上記モデルを元に CML 幹細胞への特異的治療に向けてさらなる解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

We have recently generated Evi-1-GFP knock-in mice, which can trace Evi-1 mRNA level in vivo, and we revealed that Evi-1 is highly expressed at both fetal and adult hematopoietic stem cells (HSCs). In addition, we also clarified that Evi-1 positive murine HSC (KSL) function as long-term HSC by bone marrow transplantation assay, and that Evi-1 can mark long-term HSC which is the most immature hematopoietic cells. (These data are now on submission) Next, for the analysis of leukemia stem cell regulation by Evi-1, we made chronic myeloid leukemia (CML) mouse of Evi-1-GFP knockin origin by using BCR-ABL oncogene. We revealed that Evi-1 positive KSL cells had highest Evi-1 expression in these model mice which implied that Evi-1 could regulate CML stem cells. Our original analysis of leukemia stem cell is still ongoing for the purpose of establishing specific therapy of CML stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：血液腫瘍

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：癌、白血病、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病の発症・進展には高い自己複製能を持つ白血病幹細胞の成立が重要とされている。正常造血幹細胞と白血病幹細胞との間には共通点が多い。Evi-1 は急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML) 急性転化、骨髄異形成症候群などでその高発現が認められる。胎生期と成体に共通してその造血幹細胞制御に関わる白血病原因遺伝子 Evi-1 は、幹細胞に限局した発現様式を持つため、Evi-1 高発現状態では造血幹細胞の過剰な活性化が生じ、白血病幹細胞の成立につながり、白血病を発症するとその予後が不良となりうると想定される。

2. 研究の目的

本研究ではわれわれが最近樹立した、Evi-1 の挙動を *in vivo* で追跡できる Evi-1 GFP ノックインマウスを用いて、様々な白血病モデルマウスと組み合わせ、Evi-1 による白血病幹細胞の生成の解析を目的とする。

3. 研究の方法

われわれは最近、Evi-1 遺伝子座に Internal Ribosomal Entry Site (IRES) 配列と GFP を組み込んだ Evi-1-GFP ノックインマウスを作製した。このマウスは Evi-1 の発現量を損なうことなく生体内で GFP を指標に Evi-1 を追跡することができる。このマウスを用いて白血病幹細胞マーカーとしての Evi-1 の有用性を検討していく。具体的には、レトロウイルスを用いた白血病原因遺伝子導入骨髄細胞を放射線照射マウスに静脈注射してできる白血病マウスモデルを用いる。ドナー細胞を Evi-1-GFP ノックインマウス骨髄細胞にすることで Evi-1-GFP ノックイン白血病マウスを作製できる。このモデルにおいて Evi-1 高発現白血病細胞が低発現細胞に比して高い白血病幹細胞活性を持つことを生体内で示し、さらにそれに関与する遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

まず、新規に作製した Evi-1-GFP ノックインマウスの正常造血について解析した。正常造血においては、Evi-1 は造血幹細胞分画に高発現することが知られているが、このマウスを用いても、胎生期・成体いずれにおいてもその造血幹細胞 (HSC) 分画においても Evi-1 は高発現していた。さらにその造血幹

細胞分画 (マウス血球では KSL 分画) は Evi-1 陽性 KSL 細胞と陰性 KSL 細胞に分かれ、Evi-1 陽性 KSL 細胞は細胞表面マーカー上、CD34 陰性、CD150 陽性、CD48 陰性と、長期に骨髄を再構築できる、Long-term HSC の表面マーカーと同じであった。マウス骨髄移植の系より Evi-1 陽性 KSL 細胞が Long-term HSC として機能することを明らかにした。また、Evi-1 ヘテロノックアウトマウス骨髄由来の KSL 細胞は野生型 KSL 細胞に比して造血再構築能が低いことから、Evi-1 は血球の中で最も未分化な Long-term HSC をマークすること、そして Evi-1 が機能的にも造血幹細胞を制御することが示された。(上記内容は現在投稿中)

正常造血における Evi-1 の役割を示した次に、白血病特に白血病幹細胞における Evi-1 の役割を検討した。Evi-1 は MLL 転座は急性骨髄性白血病において予後不良因子として知られており、MLL 転座陽性白血病の一部で Evi-1 高発現例があること、そして MLL 遺伝子およびその融合遺伝子は転写レベルで Evi-1 を制御していることから、Evi-1-GFP ノックイン MLL 白血病モデルを作製した。Evi-1-GFP ノックイン MLL-ENL 白血病マウス骨髄および脾臓では、Evi-1 陽性細胞と Evi-1 陰性細胞が認められた。この白血病細胞を Evi-1 陽性および陰性に分離してそれぞれ放射線照射マウスへ移植する連続移植を行った。その結果、Evi-1 陰性白血病細胞がより高い白血病再構築能を有していた。以上より、MLL 白血病においては、Evi-1 は白血病幹細胞のマーカーたりえないことが示された。MLL 白血病モデルにおいては MLL 融合遺伝子の白血病原性が高く、造血幹細胞のみならず骨髄球系前駆細胞をも白血病幹細胞に形質転換させることができる。このため、正常造血においては造血幹細胞分画のみにその高発現が維持される Evi-1 はこのモデルにおいては白血病幹細胞維持に必要なではなかったと考えられる。

さらに、白血病キメラ遺伝子 MOZ-TIF2 や TEL-PDGFRb を導入した白血病モデルを Evi-1-GFP ノックイン骨髄で作製したが、白血病マウスにおいて Evi-1 陽性細胞がほとんど存在せず、これらのモデルにおいても Evi-1 による白血病幹細胞制御の解析は行うことができなかった。

そこで CML 急性転化で高発現が認められる Evi-1 がその前段階の CML 慢性期において幹細胞分画で機能しているかを検証した。まず、

CML 慢性期症例の CD34 陽性 CD38 陰性分画（ヒトにおける造血幹/前駆細胞分画）が CD34 陽性 CD38 陽性分画（ヒト造血前駆細胞）に比して Evi-1 の発現量が高いことを明らかにした。ヒト慢性期 CML 症例において幹細胞分画に Evi-1 が高発現されていることを示すものである。次に Evi-1-GFP ノックイン骨髄細胞に CML 原因遺伝子である BCR-ABL 遺伝子を導入して CML モデルマウスを作製した。Evi-1-GFP ノックイン CML マウスでは、Evi-1 陽性骨髄細胞は分化血球マーカーを示さず、c-Kit や Sca-1 といった未分化マーカーを示した。また骨髄および脾臓に KSL 細胞が認められ、Evi-1 陽性 CML KSL 細胞と Evi-1 陰性 CML KSL 細胞に分けられた。これらの CML KSL 細胞をコロニーアッセイすると Evi-1 陽性 CML KSL 細胞で有意にコロニー形成能が高く（図 1）、自己複製能が高いことが示された。現在、in vivo において Evi-1 陽性 KSL 細胞が他細胞分画よりも白血病原性が高いか検証している。

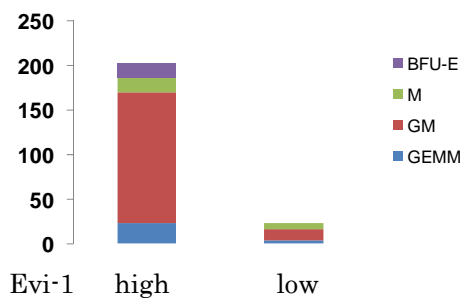


図 1. CML LSK では Evi-1 high KSL でコロニー形成能が高い

そして、CML 急性転化(Blast crisis; BC)モデルを Evi-1-GFP ノックイン骨髄細胞に BCR-ABL 遺伝子と NUP98-HOXA9 遺伝子を共発現させて作製した。CML モデルと比して CML BC では Evi-1 陽性分画により幼若な血球が目立ち、かつ Evi-1 陽性細胞はコロニーアッセイを用いて連続継代が可能であり、Evi-1 陰性細胞に比してその自己複製能、増殖能が高いことが示された。また、生体内においても Evi-1 陽性 CML BC 細胞は陰性細胞よりも白血病原性が高いことが示された。（図 2）

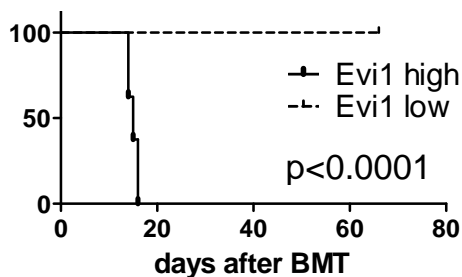


図 2. Evi-1 陽性 CML BC 細胞は白血病原性が高い

以上より、特に CML、CML BC モデルにおいて Evi-1 が白血病幹細胞を制御していることが示唆された。現在、上記知見に基づき、Evi-1 陽性 CML 細胞と陰性細胞における遺伝子発現パターンを解析し、新規分子標的治療の開発を目指している。

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 0 件）

なし

〔学会発表〕（計 4 件）

1) 52nd American Society of Hematology Annual Meeting (838), Oral presentation, Orlando, USA. 2010 年 12 月 4～7 日

Evi-1 Is a Stem Cell-Specific Regulator of Self-Renewal Capacity In the Definitive Hematopoietic System

○Keisuke Kataoka, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Susumu Goyama, Takako Tsuruta, Shunya Arai, Yoichi Imai, Katsuyoshi Kumagai, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki and Mineo Kurokawa

2) 第 72 回日本血液学会学術集会(0S-1-1) 横浜、2010 年 9 月 24～26 日

Evi-1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells.

Keisuke Kataoka, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Susumu Goyama, Shunya Arai, Yoichi Imai, Katsuyoshi Kumagai, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Mineo Kurokawa

3) 第 69 日本癌学会学術総会(0-520)

大阪、2010 年 9 月 22～24 日

Evi-1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells.

Keisuke Kataoka, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Susumu Goyama, Shunya Arai, Yoichi Imai, Mineo Kurokawa

4) 第 8 回幹細胞シンポジウム(0-29)

淡路島、2010 年 5 月 13～15 日

Evi-1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells.

Keisuke Kataoka, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Susumu Goyama, Shunya Arai, Yoichi Imai, Katsuyoshi Kumagai, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Mineo Kurokawa

〔図書〕（計 0 件）
なし

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
なし

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）
なし

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

佐藤 智彦 (SATO TOMOHIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号：90553694

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：