

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22890043

研究課題名（和文） 慢性骨髄性白血病の急性転化および白血病幹細胞維持におけるメカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of blast crisis transition and maintenance of leukemic stem cells in chronic myelogenous leukemia

研究代表者

中原 史雄 (NAKAHARA FUMIO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80581181

研究成果の概要（和文）：

今回我々は、Hes1 が本来継代不可能な造血前駆細胞である CMP や GMP に導入された場合、これらの細胞を不死化させる作用があることを見いだした。またマウス移植モデルを用いて、KSL 分画や造血前駆細胞（CMP、GMP）に Hes1 を単独で導入し移植した場合には白血病を発症させないが、Hes1 と BCR-ABL を同時に導入する実験では、KSL 分画だけではなく前駆細胞（CMP、GMP）の移植においても移植後非常に早期に CML-BC 様の病態を発症し死に至らしめることを見いだした。興味深いことに、ヒト CML-BC 20 サンプルのうち 8 サンプルにおいて Hes1 の発現上昇を認めた。

さらにヒト CML-BC 細胞株ではその約半数において Hes1 の発現が高値であり、Hes1 高値の 3 細胞株中 2 細胞株において dominant negative Hes1 の導入により増殖が抑制され、ヒトの CML-BC 発症においても Hes1 発現が強く関与している可能性を示した。これらの結果は、Hes1 が造血前駆細胞に白血病幹細胞特性を付与し、造血前駆細胞段階での分化をブロックすることで CML-BC 発症に強く関与していることを示唆している。本研究での CML-BC 発症マウスモデルは、今後非常に有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We show here that Hairy enhancer of split 1 (Hes1) has a role in blast crisis transition of CML. Hes1 is a basic helix-loop-helix transcriptional repressor that affects differentiation and often helps maintain cells in an immature state in various tissues. Also we show that expression of Hes1 immortalizes common myeloid progenitors (CMPs) and granulocyte-macrophage progenitors (GMPs). Whereas these cells did not develop myeloproliferative neoplasms when intravenously administered into irradiated mice, combination of Hes1 and BCR-ABL in both CMPs and GMPs caused a blast crisis of human CML-like disease, resulting in the rapid death of all the recipient mice. Intriguingly, Hes1 was highly expressed in 8 of 20 patients with CML in blast crisis, but not in the chronic phase, and dominant negative Hes1 retarded the growth of some CML cell lines expressing Hes1. These results taken together suggest that our model provides a good model to study mechanisms of the blast crisis transition in CML.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

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、白血病幹細胞、慢性骨髄性白血病、急性転化

### 1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは個体発生から成体まで、さまざまな細胞の生存、増殖、分化などを決定するシステムとして、ショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存されている。成人および小児のヒト T 細胞性急性リンパ性白血病において 50%以上という非常に高い頻度で Notch1 活性化型変異が検出されたという報告が 2004 年になされ(Science 2004)、白血病などの悪性腫瘍発症の原因として Notch シグナルの制御異常がにわかに注目されるようになった。

一方、Notch シグナルの下流遺伝子として同定されている Hes1 は basic helix-loop-helix 型の転写抑制因子であり、種々の系統の細胞において主として分化抑制的に働く。Hes1 欠損マウスは胎生致死もしくは出生直後に死亡し、大脳欠損、無眼球症、腭臓低形成などを認める。T 細胞性前駆細胞 (early T cell precursor) ではその発生や分化に Hes1 が必須であるという報告があるものの、それ以外の血球での異常はこれまで報告されてこなかった。

その後 2003 年には、骨髄由来の CD34low/- 造血幹細胞 (cKit+Sca1+Lin-:KSL) 分画にレトロウイルスで Hes1 を導入し強制発現させた細胞をマウスに移植すると、末梢血において半年以上にわたり Hes1 陽性細胞が高い割合で認められることから、Hes1 は造血幹細胞維持に何らかの寄与をする可能性があることが報告された(Blood 2003)。また 2008 年には、分裂期に戻ることでできる可逆的な静止期を長期に渡って維持するためには Hes1 が必須であることが示され(Science 2008)、Hes1 が造血幹細胞をはじめとする各種幹細胞の維持や分化に与える作用が注目されるようになった。

慢性骨髄性白血病 (CML) は BCR-ABL 融合遺伝子によって引き起こされ、最終的に急性転化 (BC) に至るが、BC 発症の分子メカニズムの大部分は未だ不明のままである。マウスモデルを利用して、BCR-ABL 融合遺伝子は造血幹細胞に導入された場合には骨髄増殖性疾患 (MPN) を引き起こすが、骨髄系共通前駆細胞 (CMP) や顆粒球・マクローファージ前駆細胞 (GMP) といった造血前駆細胞に導入された場合には MPN を発症させないことがこれまで報告されている。

### 2. 研究の目的

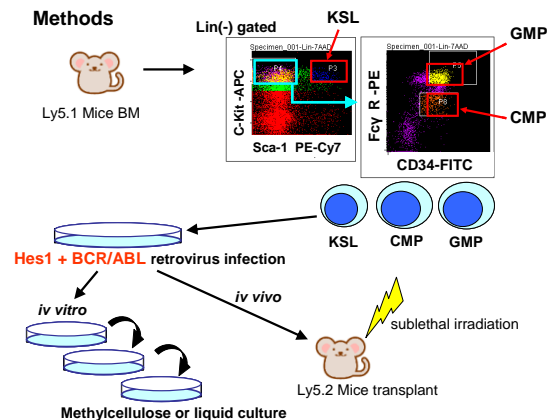
Notch シグナル亢進が急性リンパ性白血病

の発症に関与していることは既に複数のグループにより報告されてきたが、急性骨髄性白血病および慢性骨髄性白血病の急性転化における Notch シグナルやその下流分子の重要性はこれまで明らかでなかった。

本研究の目的は Hes1 シグナルによる慢性骨髄性白血病の急性転化への関与の有無とその機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

本研究ではマウス骨髄細胞を C57BL/6 Ly5.1 マウスより採取し、FACS Aria cell sorter を用いて KSL、CMP、GMP 分画を単離し、パッケージング細胞 PLAT-E で作成したレトロウイルスにより Hes1 もしくは bcr-abl 遺伝子を感染導入する。感染 48 時間後に 5.25Gy の放射線照射をした 8 週齢レシピエントマウス (C57BL/6 Ly5.2) の尾静脈から細胞を注入移植することで、CML-BC を発症するかを検討した。また、Hes1 導入 KSL、CMP、GMP 分画を液体培地もしくは半固形培地を用いて培養し、Hes1 による細胞分化への影響を確認した。



### 4. 研究成果

今回我々は Hes1 が本来継代不可能な造血前駆細胞である CMP や GMP に導入された場合、これらの細胞を未分化な形態に保ち、不死化させる作用があることを見いだした。Hes1 導入細胞は N/C 比が大きく芽球様の未分化な形態であり、さらに液体培養、半固形培地培養において Hes1 導入細胞が不死化することを確認した。(図 1)

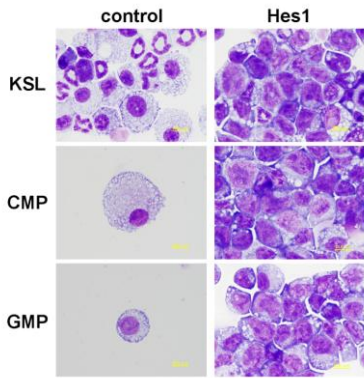


図 1

またマウス移植モデルを用いて、KSL 分画や造血前駆細胞 (CMP、GMP) に Hes1 を単独で導入し移植した場合には白血病を発症させないが、Hes1 と BCR-ABL 融合遺伝子を同時に導入する実験では、KSL 分画だけではなく前駆細胞 (CMP、GMP) の移植においても移植後非常に早期に慢性骨髄性白血病急性転化 (CML-BC) 様の病態を発症し死に至らしめることを見いだした。(図 2)

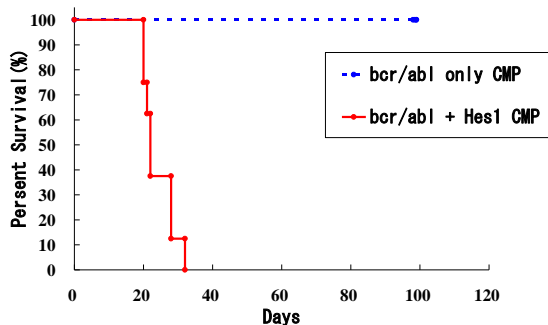


図 2

興味深いことに、ヒト慢性骨髄性白血病急性転化 (CML-BC) サンプルでは 20 症例中 8 症例という高い頻度で Hes1 の発現上昇を認めた。(図 3)

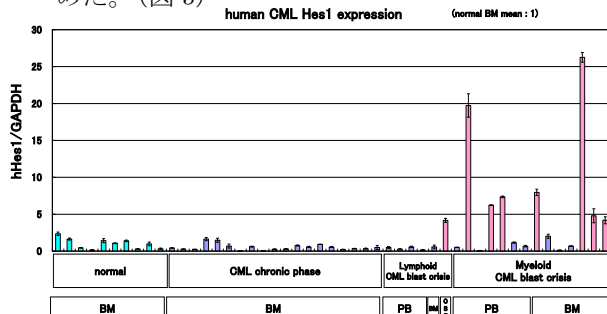


図 3

CML-BC 発症における Hes1 の関与を調べるため、既知の CML-BC 細胞株 (K-562、JK-1、

KCL-22、TS9:22、JURL-MK1) を用いて、まず Hes1 の発現を real-time RT-PCR により確認した。すると、5 細胞株のうち 3 細胞株 (K-562、TS9:22、JURL-MK1) において Hes1 の発現上昇を認めた。次に dominant-negative Hes1 (dnHes1) コンストラクトを Hes1 発現が高いこれら 3 細胞株にレトロウイルスにより導入したところ、2 細胞株 (K-562、TS9:22) において増殖が有意に抑制され、Hes1 が CML-BC 発症やその維持に関与している可能性が示された。

#### 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 4 件)

1. Kato, N., J. Kitaura, N. Doki, Y. Komeno, N. Watanabe-Okochi, K. Togami, F. Nakahara, T. Oki, Y. Enomoto, Y. Fukuchi, H. Nakajima, Y. Harada, H. Harada, and T. Kitamura. 2011. Two types of C/EBPalpha mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117:221-233.
2. Oshima, K., T. Takahashi, T. Mori, T. Matsuyama, K. Usuki, Y. Asano-Mori, F. Nakahara, S. Okamoto, M. Kurokawa, and Y. Kanda. 2010. One-year low-dose valacyclovir as prophylaxis for varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A prospective study of the Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group. *Transpl Infect Dis* 12:421-427.
3. Komeno, Y., J. Kitaura, N. Watanabe-Okochi, N. Kato, T. Oki, F. Nakahara, Y. Harada, H. Harada, R. Shinkura, H. Nagaoka, Y. Hayashi, T. Honjo, and T. Kitamura. 2010. AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 24:1018-1024.
4. Nakahara, F., M. Sakata-Yanagimoto, Y. Komeno, N. Kato, T. Uchida, K. Haraguchi, K. Kumano, Y. Harada, H. Harada, J. Kitaura, S. Ogawa, M. Kurokawa, T. Kitamura, and S. Chiba. 2010. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115:2872-2881.

[学会発表] (計 2 件)

1. Fumio Nakahara, Toshio Kitamura, 他. Hes1 immortalizes committed progenitors

and plays a role in blast crisis transition in chronic myeloid leukemia. 日米血液腫瘍セミナー2011. 2011年2月26日. 神奈川県葉山湘南国際村センター.

2. Fumio Nakahara, Toshio Kitamura, 他. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myeloid leukemia. 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ. 2011年2月3日. 滋賀県琵琶湖ホテル.

〔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〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中原 史雄 (NAKAHARA FUMIO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：80581181

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし