

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791068

研究課題名（和文） HES1 による骨髄性白血病幹細胞の発生および維持の機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of Hes1 mediated development and maintenance of leukemic stem cells for myeloid leukemia

研究代表者

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

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80451805

研究成果の概要（和文）：本研究の結果、急性骨髄性白血病（AML）において、Hes1 は AML の増殖に関わるサイトカイン受容体の発現を抑制することにより、腫瘍抑制因子として働いていることが明らかとなった。Hes1 欠損白血病細胞は Hes1 野生型白血病細胞より増殖能が亢進しているが、サイトカインシグナル阻害剤により Hes1 欠損白血病細胞の増殖は抑制された。白血病の新たな戦略的治療を考案する上で基礎となる大変重要な研究であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We clarified the novel tumor suppressive roles of Hes1 in acute myeloid leukemia. The mechanism was downregulation of cytokine signaling by transcriptional repression of cytokine receptor by Hes1. Growth rate of Hes1-null leukemic cells was higher than that of control cells, which was abrogated by specific inhibitor for cytokine signaling. These data provide a novel insight into a target therapy for myeloid leukemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：血液腫瘍学

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：急性骨髄性白血病、Notch、Hes1、腫瘍抑制、サイトカイン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) Notch シグナルと造血器腫瘍

Notch シグナルは造血細胞の発生・分化・機能において多彩な機能を有することが知られる。なかでも、T 細胞の分化においてはもっとも重要なシグナル機構であることが知られていた。2004 年に T 細胞性白血病の約 50% に活性型変異がみられることが報告され、Notch シグナルが血液細胞の正常の分化と腫瘍化の双方に非常に重要であることが

示された。近年になり、慢性骨髄単球性白血病においては、Notch シグナルが腫瘍抑制的に働く、ということが報告された。このことから、造血器腫瘍において Notch シグナルは腫瘍化と腫瘍抑制の 2 面性を持つと考えられるようになった。

(2) 骨髄性白血病における Notch-Hes1 シグナルの役割-本研究の背景となる申請者のこれまでの研究の成果

申請者は大学院時代から Notch シグナルの

造血細胞の中でも骨髄球の分化と白血病化に焦点をあて、研究に取り組んできた。骨髄球系前駆細胞において、Hes1 (Notch シグナルの下流の転写因子) を過剰発現させると、骨髄球系前駆細胞は未分化な芽球様の形態を維持して増殖し続けることを見いだした。また Hes1 と BCR-ABL を同時に骨髄球系前駆細胞へ導入し、致死量放射線照射したマウスへ移植したところ、急性骨髄性白血病様の病気を発症した。この結果は慢性骨髄性白血病の急性転化において Hes1 と BCR-ABL の協調的発現が重要であることを示唆していた。

申請者は、これらの知見を元に、骨髄性白血病の中でも最も頻度の高い急性骨髄性白血病において、Notch-Hes1 シグナルの役割を明らかにしたいと考えた。とりわけ、白血病においても白血病幹細胞とよばれる一部の分画が白血病の維持、進展に重要であることが広く知られていることから、白血病幹細胞における役割を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

急性骨髄性白血病の病態における Notch-Hes1 シグナル経路の役割を明らかにするために研究を行った。

## 3. 研究の方法

MLL 融合遺伝子 MLL-AF9 による白血病モデルを用いることとした。MLL-AF9 は白血病患者でしばしばみられる融合遺伝子であり、マウス骨髄細胞に導入することで、細胞を不死化し、また致死量放射線照射したマウスへ MLL-AF9 導入骨髄細胞を移植することで、白血病を発症するという実験系がしばしば用いられている。

RBP-Jk コンディショナルノックアウトマウス由来骨髄造血前駆細胞をセルソーターにより分取した。レトロウイルスを用いて、

MLL-AF9 および Cre リコンビナーゼあるいはコントロールウイルスを共感染した(以下 MLL-AF9-RBP-Jk 欠損白血病細胞あるいはコントロール細胞と称する)。 *In vitro* の液体培養により増殖能を評価した。さらに、致死量放射線照射したマウスへ移植した。

また、Hes1 欠損マウスは胎生致死であることから、胎児肝由来造血前駆細胞を用いた。すなわち、MLL-AF9 を Hes1 欠損マウスあるいはコントロールマウスの胎児肝由来造血前駆細胞に導入し、増殖能評価、および致死量放射線照射したマウスへ移植した(以下 MLL-AF9-Hes1 欠損白血病細胞あるいはコントロール細胞と称する)。

さらに、MLL-AF9-Hes1 欠損細胞およびコントロール細胞から RNA を抽出し、mouse exon gene ST array (Affymetrix 社)により遺伝子発現を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

MLL-AF9-RBP-Jk 欠損白血病細胞および MLL-AF9-Hes1 欠損白血病細胞は、それぞれのコントロール細胞より増殖が亢進していた。

また、MLL-AF9-RBP-Jk 欠損白血病細胞および MLL-AF9-Hes1 欠損白血病細胞を致死量放射線照射したマウスへ移植し、白血病の発症を観察したところ、コントロール細胞よりいずれも早期に白血病を発症し、死亡することを見出した(図 1)。すなわち、MLL 白血病モデルでは、Notch シグナルは腫瘍抑制シグナルとして働くことが明らかとなった。

さらに、網羅的な遺伝子発現解析によるスクリーニングから、MLL-AF9-Hes1 欠損白血病細胞では、コントロール細胞より、骨髄性白血病の増殖シグナルとして知られるサイトカイン受容体の発現が上昇していることを見いだした(図 2)。

MLL-AF9-Hes1 欠損細胞ではサイトカイン刺激により、サイトカイン受容体のリン酸化が促進されることを見いだした。サイトカイン阻害剤を用いることにより、MLL-AF9-Hes1 欠損 MLL 細胞の増殖は抑制された。

[今後の展望]

本研究から、Notch-Hes1 シグナルは急性骨髄性白血病モデルにおいては、腫瘍抑制因子としてはたらく、ということが明らかとなった。さらには、Notch-Hes1 下流のシグナル経路を明らかにするとともに、シグナル阻害剤による治療モデル構築の基礎となる成果がえられた。骨髄性白血病は、既存の治療法により治癒するのは一部にとどまることから、新しい概念による治療法の開発が急務である。本研究をさらに発展させることにより、トランスレーショナルな成果をあげることが期待される。

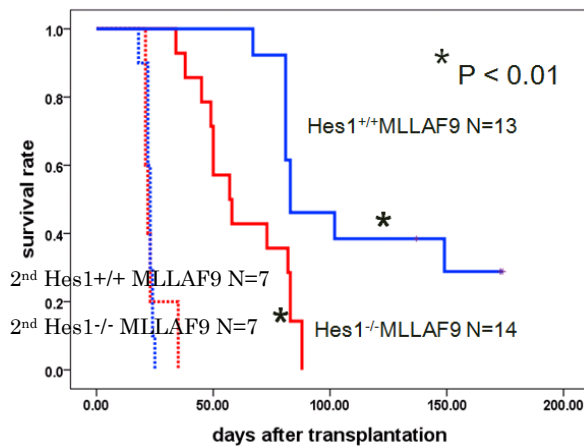


図 1 MLL-AF9 導入 Hes1 欠損細胞あるいはコントロール細胞によるマウス白血病の発症

サイトカイン受容体の発現

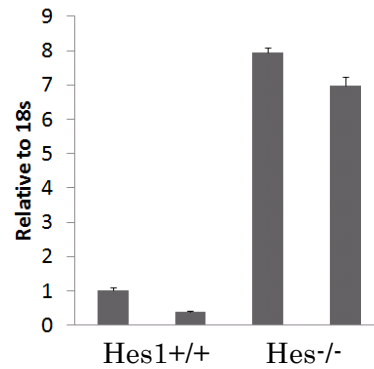


図 2 MLL-AF9-Hes1 欠損およびコントロール白血病細胞におけるサイトカイン受容体の発現

### 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 12 件)

(1) Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S, 'Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis.' Int J Hematol. 96 (4): 492-500, 2012. 査読有

DOI: 10.1007/s12185-012-1171-1.

(2) Matsubara-Nakamoto R, Nishikii H, Yamada K, Ito M, Hasegawa Y, Kurita N, Obara N, Okoshi Y, Suzukawa K, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Noguchi M, Chiba S, 'Early Pathologic findings of bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: a proposal from a case.' Case Report Hematol. 2012: 957612, 2012. 査読有

DOI: 10.1155/2012/957612.

(3) Sakata-Yanagimoto M, Chiba S, 'Notch2 and immune function.' Curr Top Microbiol Immunol. 360: 151-161, 2012. 査読有

DOI: 10.1007/82\_2012\_235.

(4) 坂田 (柳元) 麻実子, 千葉滋 「エピゲノム異常による造血器腫瘍の病態。」 最新医学 67 (10): 2413-2419, 2012. 査読無

(8) 坂田 (柳元) 麻実子 「血液内科学 マスト細胞と Notch シグナル 粘膜免疫における役割。」 医学のあゆみ 240 (7): 599-600, 2012. 査読無

(5) 加藤貴康, 坂田 (柳元) 麻実子, 千葉滋 「造血器腫瘍と Notch シグナル: 腫瘍活性化

および腫瘍抑制の二面的な役割.] 血液内科 64 (6): 756-760, 2012. 査読無

(6) 坂田 (柳元)麻実子, 千葉滋 [Notch シグナルを標的にした新たな分子標的治療薬の開発.] 血液内科 63 (5): 568-573, 2012. 査読無

(7) Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Noguchi M, Chiba S, 'Treatment outcome of adult Burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol : a single center retrospective analysis.' J Clin Exp Hematop. 51 (2): 109-114, 2011. 査読有

(8) Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S, 'Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.' Nature. 478 (7367): 64-69, 2011. 査読有

DOI: 10.1038/nature10496.

(9) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T, 'Neutrilizatio of the  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin.' Oncogene. 9; 31 (6): 787-798, 2011. 査読有

DOI: 10.1038/onc.2011.265.

(10) 坂田 (柳元)麻実子 「腸管免疫と Notch2.」 血液内科 63 (4):488-492, 2011. 査読無

(11) 坂田 (柳元)麻実子 「一般内科医がみる血液疾患 血液専門医との効率的な連携のために 血液に影響を及ぼすさまざまな背景 妊娠と血液疾患 妊娠に伴う血液学的な変化.」 medicina 48 (10): 1745-1747, 2011. 査読無

[学会発表] (計 33 件)

(1) Takayasu Kato, 'Transcription factor Hes1 functions as a tumor suppressor in MLL-associated acute leukemia.' The American Society of Hematology 54th Annual meeting, 口頭発表, 2012年12月8日-11日, Atlanta, USA

(2) Hideharu Muto, 'Reduced TET2 Function Contributes to Development of Peripheral

T-Cell Lymphoma with Follicular Helper T-Cell-Like Features in Mice.' The American Society of Hematology 54th Annual meeting, ポスター発表, 2012年12月8-11日, Atlanta, USA

(3) Mamiko Sakata-Yanagimoto, 'DNA hydroxymethylation in hematologic malignancies.' 第74回日本血液学会学術集会, シンポジウム(Myeloid malignancies in a New Era of Molecularly Targeted Therapy), 2012年10月19日-21日, 京都

(4) Hideharo Muto, 'Reduced TET2 expression confers enhanced competitive repopulation capacity on HSCs.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(5) Takayasu Kato, 'Transcription factor Hes1 functions as a tumor suppressor in MLL-associated acute leukemias.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(6) Terukazu Enami, 'TET2 regulates erythropoiesis from human cord blood progenitors.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(7) Koiti Inokuchi, 'Clinical study of nilotinib in CML-CP patients with imatinib resistance or intolerance: TSSG study.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(8) Kenichi Yoshida, 'Spectrum of gene mutations in myelodysplastic syndromes revealed by whole-exome sequencing.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(9) Ayano Kon, 'Novel Recurrent Mutations of multiple components of cohesion complex in myeloid neoplasms.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(10) Kenji Matsushita, 'Identification of a new class of megakaryocyte progenitors in the mouse bone marrow.' 第74回日本血液学会学術集会, ポスター発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(11) Naoki Kurita, 'Recombinant thrombomodulin for DIC with hematologic malignancy-a single-center re-evaluation.' 第74回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(12) Yuichi Hasegawa, 'Attempting a timeline for survival disadvantage in the recipients who have delayed engraftment.' 第74回日本血液学会学術集会, ポスター発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(13) Naoki Kurita, 'Control of perisurgical hemolysis by temporal induction of eculizumab in a patient with PNH.' 第74回日本血液学会学術集会, ポスター発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(14) Tatsuhiro Sakamoto, 'Efficacy and safety of rabbit anti-thymocyte globulin for aplastic anemia in two different doses.' 第74回日本血液学会学術集会, ポスター発表, 2012年10月19日-21日, 京都

(15) Takayasu Kato, 'Transcription factor Hes1 functions as a tumor suppressor in MLL-associated acute leukemias.' 第71回日本癌学会学術総会, 口頭発表, 2012年9月19日-21日, 札幌

(16) 坂田(柳元)麻実子, 'Notch-Hes1 signaling: double-edged swords for myeloid leukemia.' 第2回つくばがん研究会, 口頭発表, 2012年6月26日, つくば

(17) Yasunobu Nagata, 'Rare mutations of splicing machinery in MDS with complex karyotype.' 17th Congress of EHA, 口頭発表, 2012年6月14日-17日, Amsterdam, Nederland

(18) Ayano Kon, 'Recurrent mutations of multiple components of cohesin complex in myeloid neoplasms.' 17th Congress of EHA, 口頭発表, 2012年6月14日-17日, Amsterdam, Nederland

(19) Kenichi Yoshida, 'Spectrum of gene mutations and their intratumoral structure in myelodysplasia revealed by high-throughput sequencing.' 17th Congress of EHA, 口頭発表, 2012年6月14日-17日, Amsterdam, Nederland

(20) Shigeru Chiba, 'Role of TET2-mediated DNA oxygenation in hematopoiesis.' 第10回幹細胞シンポジウム, 口頭発表, 2012年5月31日-6月2日, 淡路島

(21) Hideharu Muto, 'Impaired Tet2 function leads to enlargement of hematopoietic stem cell compartment and competitive repopulation capacity.' 第10回幹細胞シンポジウム, 口頭発表, 2012年5月31日-6月2日, 淡路島

(22) Hidekazu Nishikii, 'Identification of monolineage megakaryocyte progenitor cells through a previously unidentified differentiation pathway.' 第10回幹細胞シンポジウム, 口頭発表, 2012年5月31日-6月2日, 淡路島

(23) Yuhei Kamada, 'Identification of Unbalanced Genome Copy Number Abnormalities in Patients with Multiple Myeloma.' 第3回JSH国際シンポジウム, 口頭発表, 2012年5月26日-27日, 川越

(24) 加藤貴康, 「Hes1と骨髄性白血病。」第

16回造血器腫瘍研究会, 口頭発表, 2012年1月28日-29日, 東京

(25) Yasunobu Nagata, 'Mutational Spectrum Analysis of Interesting Correlation and Interrelationship Between RNA Splicing Pathway and Commonly Targeted Genes in Myelodysplastic Syndrome.' The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting, 口頭発表, 2011年12月10日-13日, San Diego, USA

(26) Kenichi Yoshida, 'Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia.' The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting, 口頭発表, 2011年12月10日-13日, San Diego, USA

(27) 鎌田勇平「多発性骨髄腫における SNP アレイを用いた網羅的ゲノム異常の解析。」第73回日本血液学術集会, 口頭発表, 名古屋, 2011年10月

(28) 坂田(柳元)麻実子「ヒト造血細胞および白血病細胞におけるハイドロキシメチルシトシンの評価。」第73回日本血液学会学術集会, 口頭発表, 名古屋, 2011年10月

(29) 三宅康行, 「骨髄球系前駆細胞の不死化における Hes-1 の下流メカニズムの解析。」第73回日本血液学会総会, 口頭発表, 2011年10月14日-16日, 名古屋

(30) 坂本竜弘, 「再生不良性貧血に対する ATG 療法の有効性と安全性に関する検討。」第73回日本血液学会総会, ポスター発表, 2011年10月14日-16日, 名古屋

(31) 鎌田勇平, 「多発性骨髄腫における SNP アレイを用いた網羅的ゲノム異常の解析。」第70回日本癌学会, 口頭発表, 2011年10月3日-5日, 名古屋

(32) 坂田(柳元)麻実子, 'Evaluation of 5-hydroxymethylcytosine in blood cells from normal subjects and patients with hematologic malignancies.' 第9回幹細胞シンポジウム, ポスター発表, 2011年5月13日-14日, 東京

(33) 坂田(柳元)麻実子, 'Evaluation of 5-hydroxymethylcytosine in blood cells from normal subjects and MDS/leukemia patients.' 第2回JSH国際シンポジウム, ポスター発表, 2011年4月24日, 長崎

[図書] (計1件)

(1) 坂田(柳元)麻実子, 千葉滋 「1. エピゲノムとがん。」 実験医学 別冊「がんと代謝」 第4章がん代謝と創薬研究、2012, pp. 2468-2473.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 麻実子 (柳元 麻実子) (SAKATA  
MAMIKO, YANAGIMOTO MAMIKO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：80451805

(2) 研究協力者

千葉 滋 (CHIBA SHIGERU)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：60212049