

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659463

研究課題名(和文) ヒト型完全マクロファージ寛容導入免疫不全マウスによる新規がん幹細胞アッセイの確立

研究課題名(英文) Cancer stem cell assay by a new immunodeficient mouse model harboring a complete macrophage tolerance

研究代表者

赤司 浩一 (AKASHI, KOICHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80380385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞研究には、がん幹細胞同定のためのアッセイ系の確立が必須である。これまで、T、B細胞を欠損したNOD-scidマウスを基本として、さらに免疫不全のための修飾を加えたマウスが開発され、異種移植を用いたがん幹細胞研究にも応用されてきたが、造血系腫瘍の一部や固形癌では生着効率が低く、がん幹細胞研究には、さらなる改良が必要であった。我々は、免疫不全マウスへのヒト細胞の生着には、リンパ球欠損に加えて、マクロファージ寛容が必要であることを見出し、より強化されたマクロファージ寛容を導入したBRGhSラインを樹立した。このマウスは、ヒト細胞の生着効率が著しく改善し、今後のがん細胞研究に有用である。

研究成果の概要(英文)：To evaluate human cancer stem cells in xenotransplant models, a variety of immunodeficient mouse lines have been developed. We found that in xenograft engraftment, inhibition of phagocytic reaction of mouse macrophages is essential in addition to lymphoid depletion. Murine signal regulatory protein alpha (mSIRPA) on macrophages cannot bind to human CD47 (hCD47), resulting phagocytic reaction against human cells. Here, we have established a new immunodeficient BRGhS mouse line, B6.Rag2(null)Il2rg(null), harboring a complete macrophage tolerance. BRGhS mouse line was introduced by human SIRPA, which allows to bind human CD47, resulting in inhibition of phagocytosis against human cell graft. BRGhS strain should be very useful in future xenotransplant experiments of human cancer stem cells.

研究分野：血液内科

キーワード：がん幹細胞 異種移植アッセイ マクロファージ SIRPA

1. 研究開始当初の背景

がん克服へのパラダイムシフトを呼ぶものとして、「がん幹細胞」が注目を集めている。がん幹細胞とは、自己複製能力と未分化性の維持能力を新たに獲得した悪性の幹細胞であり、腫瘍の源である。国民の死因の約半分を占める難治性悪性腫瘍の治療成績の向上には、がん幹細胞自身を標的とした新規治療法の開発が求められている。がん幹細胞を標的とする治療法の開発には、1) がん幹細胞の純化、2) その純化したがん幹細胞の生体内での機能、を知る必要がある。これらを明らかにするために必須の基本技術が、高度免疫不全マウスを用いた異種移植アッセイシステムである。

マウスなどの実験動物にヒト細胞を移植して、その生物学的活性を評価する実験系は、当初ヒト造血幹細胞活性を測定する目的で開発され、様々な改良が重ねられてきた。1995年に開発されたNOD-scidマウスはT細胞、B細胞の欠損に加え、NK活性や補体活性の低下などNOD特有の様々な免疫異常を導入したマウスラインであった。現時点で最もヒト細胞移植効率が高いマウスラインは、NOD-scidマウスからc鎖(112rg)をノックアウトし、NK細胞を完全に除いたNOD-scid.112rg-null(NOG)ラインである。ヒト細胞の異種移植実験において、NOGマウスは必須のラインとなっているが、繁殖能力が弱いためラインの維持が難しく、さらに、急性白血病以外の造血器腫瘍や固形がんの生着率が低い。したがって、さらに効率を高めた汎用性の高いラインにするための改良が、今後の幹細胞研究の発展には不可欠な状況である。

我々は、NOGマウスの高い異種移植効率に注目し、その原因遺伝子の抽出を試みた。ポジショナルクローニング法を用いた検索の結果、NODマウスラインは第2染色体上のSIRPA遺伝子に特有の変異を持つことを発見した。マウスマクロファージ上のNOD型変異SIRPAは、マウス野生型SIRPAと異なり、造血細胞上のヒトCD47と効率よく結合可能なため、SIRPA-CD47結合による“don't eat me”シグナルによりマクロファージの貪食による生着拒絶が抑制(マクロファージ寛容)される(Nature Immunol, 2007)。さらに、T, B, NK細胞を欠損したC57/BL6マウスに、NOD型SIRPA変異を導入したB6-Rag2^{null}.112rg^{null}.SIRPA^{NOD/NOD}(BRGS)ラインを樹立した結果、B6バックグラウンドでありながら、NOG同等のヒト細胞の生着効率を有することが明らかになった(論文準備中)。以上から、NOD特有の異種移植効率の高さは、NOD型SIRPA変異のみで説明できることを証明した。しかし、NOD型SIRPAにおいても、ヒトCD47への結合は、ヒトSIRPA-ヒトCD47の結合に比べれば弱いため、ヒト細胞移植後の貪食を完全に抑えこむには不十分で、マク

ロファージ寛容強化に大きな改良の余地を見出した。今後、高度に純化したがん幹細胞を高効率に生着させうる異種移植システムの開発が、がん幹細胞研究、あるいはがん幹細胞を標的とした新規治療法開発のために必要不可欠な状況である。

2. 研究の目的

本研究では、より広いがん種におけるがん幹細胞の同定とその根絶法の開発を可能にする技術基盤確立のために、既存の移植効率を大幅に上回る次世代免疫不全マウスを開発することを目的とする。

具体的には、RAG1および112rgの完全欠損による従来のT, B, NK細胞欠損に加えて、完全ヒト型SIRPAをノックインし、ヒト型の完全SIRPA-CD47結合を得た新規マウスラインを作製する。このラインでは、完全なヒト細胞へのマクロファージ寛容が得られる。ヒトがん細胞では、CD47発現が上昇していることが報告されており、ヒトがん幹細胞の異種移植効率を高める上でマクロファージ寛容の誘導は特に重要であると予想される。本研究で開発されたヒト型SIRPAノックイン次世代免疫不全マウスラインでは、がん幹細胞の同定感度の飛躍的向上が期待でき、造血器・固形がん幹細胞の生体内での挙動がより詳細に解析可能となるため、がん幹細胞の特性や転移メカニズム、再発機序の解明などに貢献できる。本研究では、新規免疫不全マウスの作成を通して、これらの基礎的解析技術の確立を目指す。

上述のように、がん幹細胞を標的とする新規治療法開発のためには、がん幹細胞を高効率にアッセイする方法の確立が必須である。我々が提唱する「SIRPA-CD47を介したマクロファージ寛容」は、異種移植の理論構築を新展開させた極めて独創的な発見であり、これを生体内に世界で初めて人為的に導入することで、がん幹細胞の同定感度の飛躍的な上昇が期待できる。本課題の成果によって、ヒト造血幹細胞学のみならず、今後、正常組織幹細胞や、がん幹細胞のアッセイにきわめて有用なモデルを提供することが可能となり、その臨床応用への検討に大きく貢献することが可能である。さらに、このマウスラインを用いれば、ヒトiPSや、ヒトiPSからの分化誘導実験、各臓器におけるヒトの正常幹細胞の同定や機能評価、ヒト細胞のin vivoにおける薬剤感受性試験などにも利用可能であり、再生医療・分子標的治療・遺伝子治療分野の基礎的研究成果の実地医療への応用を検討する際に、必須の異種移植実験系としての重要性が極めて高い実験系を提供可能となる。以上のように本研究課題を通じて、ヒトがん幹細胞研究および新規治療法開発のみならず、広くヒト幹細胞研究分野における基盤技術の整備に貢献することが、本研究課題の最終的な目標である。

3. 研究の方法

(1) マウスバックグラウンドストレインの改良とマクロファージ寛容の導入・強化

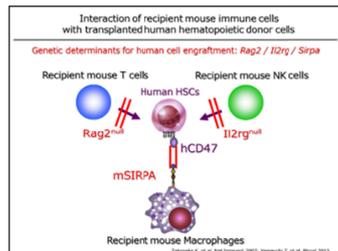
我々は既に、C57/BL6 バックグラウンドで Rag2 および IL2R を欠損したマウスに、NOD 型 SIRPA 変異を導入した免疫不全マウス B6.Rag2^{nu1}IL2r^{nu1}SIRPA^{NOD/NOD} ライン (BRGS) を樹立している。この BRGS マウスにおいては、T細胞のリークがなく、NOD 型 SIRP を持つために、NOD/SCID と比べて良好なヒト造血細胞生着がみられ、B6 ラインであることから、高い生存・繁殖能力もみられている。この結果は、CD47-SIRPA の結合強化により、さらにヒト細胞の生着効率の改善が期待できることを示している。これまでの我々の知見をもとに、バックグラウンドストレイン、ヒト型完全マクロファージ寛容の導入の観点から、本研究課題では、既存の NOG ラインを越えた汎用性の高い次世代ラインを開発する。具体的には、繁殖能力の高い C57/BL6 ストレインに、Rag2 欠損、IL2rg 欠損によってマウス T 細胞分化を完全遮断した B6.Rag2^{nu1}.IL2rg^{nu1} (BRG) ラインに、ヒト型 SIRPA 遺伝子をノックインし、完全ヒト CD47-ヒト SIRPA 結合可能による完全マクロファージ寛容を導入した B6.Rag2^{nu1}.IL2rg^{nu1}.SIRPA^{human/human} ライン (BRGs) の樹立を目指す。このために、まず、B6. SIRPA^{human/human} ラインを樹立する。完全ヒト型マクロ

ファージ寛容の導入には、ヒト型 SIRPA をマウスマクロファージに至適量の発現を得ることが必須であり、マ

ウス SIRPA プロモーター下にヒト型 SIRPA cDNA をノックインする。ヒト SIRPA cDNA はクローニング済みで、ターゲティングベクターの構築も完了しており、マウス B6 由来 ES 細胞にエレクロトポレーションし、G418 による薬剤耐性選択で陽性クローン ES 細胞を得る。ノックインサイト確認後、B6 由来プラストシストにマイクロインジェクションし、キメラマウスを得る。キメラマウスの交配により、B6. SIRPA^{human/human} ラインを得る。樹立した B6. SIRPA^{human/human} ラインと BRG ラインを交配し、BRGs ラインを完成させる。

(2) BRGs ラインの異種移植片効率の評価

新規に開発した BRGs マウスについて、life span、繁殖能力、マウス造血系、免疫系について解析する。また、同時に、ヒト骨髓・末梢血・臍帯血造血幹細胞を移植し、ヒト造血細胞の生着、多系統への分化能について解析する。また、造血器腫瘍幹細胞のアッセイ系としての評価のため、急性骨髄性白血病検体から分離した白血病幹細胞を移植し、



その生着について解析を行う。同時に、NOD-scid マウス、NOD.Rag1^{nu1}IL2rg^{nu1} (NRG) マウス、BRGS マウスへも同じ検体を移植し、比較を行う。

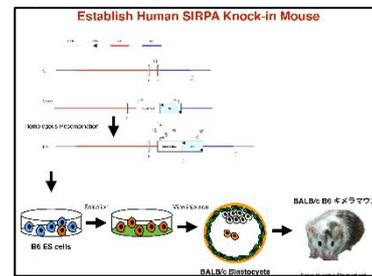
(3) 次世代免疫不全マウスラインの確立と固形がん幹細胞の至適異種移植法の確立

現在の固形がんの異種移植アッセイでは、分離した幹細胞分画は、皮下投与で移植されるが、生着効率が低く、詳細な幹細胞分画の同定が困難であった。本課題で樹立するマウスラインでは、ヒト移植片に対して完全なマクロファージ寛容が成立しており、幹細胞分画を皮下投与しても、マウス皮下に存在するマクロファージによって拒絶されることなく、高効率な生着が期待できる。造血器腫瘍のほか、大腸がん、乳がんなど広く悪性腫瘍組織より FACS Aria SORP を用いて高純度に分離した細胞分画を、静注、骨髄内、新生仔マウス顔面静脈、皮下などの投与経路で移植し、マウスでの腫瘍再構築能を検証し、至適移植法の確立とともに固形がんにおける幹細胞分画の高度純化を目指す。

4. 研究成果

(1) B6.human-SIRPA ラインの樹立

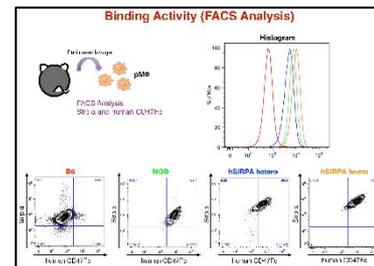
ヒト型 SIRPA をマウスマクロファージに至適量の発現を得ることが必須であり、



マウス SIRPA プロモーター下にヒト型 SIRPA cDNA をノックインするために、下記ターゲティングベクターの構築し、マウス B6 由来 ES 細胞にエレクロトポレーションし、G418 による薬剤耐性選択で陽性クローン ES 細胞を得た。ノックインサイト確認し、B6 由来プラストシストにマイクロインジェクションし、得られたキメラマウスの交配により、B6. SIRPA^{human/human} ラインを樹立した。

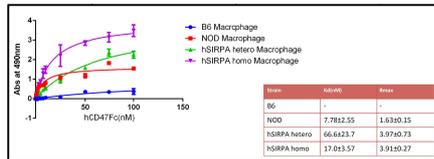
(2) マウスマクロファージに発現するヒト型 SIRPA の機能解析

樹立した B6.human-SIRPA マウスより DNA, RNA を抽出し、ヒト型 SIRPA 遺伝子が組み込まれていること、また、ヒト型 SIRPA RNA が発現していることを確認した。また、マウスマクロファージ上に、ヒト型 SIRPA が発現していることも、FACS にて確認できた。



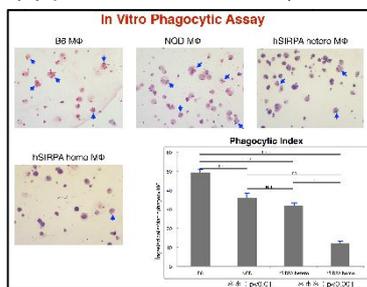
さらに、ヒト CD47 との結合を蛋白結合実験にて確認した。96 ウェルプレートに培養したマウスマク

ロファージを静置し、これに、ヒト CD47-Fc 蛋白を結合させ、HRP 標識抗 Fc 抗体を反応



させた後、吸光度を測定することで、SIRPA とヒト CD47 の結合強度を定量した。下記に示すように、B6.human-SIRPA 由来マクロファージは、他のストレインに比較して、ヒト CD47 と有意に強い結合を示した。

次に、この結合が、マウスマクロファージによるヒト血球細胞の貪食抑制に反映されているかを検討した。下記に示すように、オプソニイズしたヒト臍帯血 CD34 陽性 CD38 陰性細胞を、活性化したマウスマクロファージと混合し、貪食感受性について検討してみると、B6.human-SIRPA 由来マクロファージは、ほとん

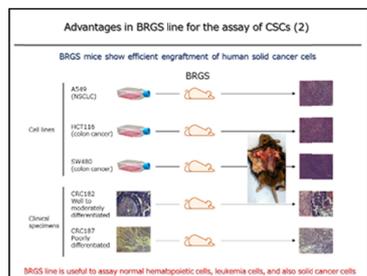


(3) BRGhS ラインの樹立

ヒト型 SIRPA ノックインマウスの有効性が確認されたため、B6.human-SIRPA と BRG マウスを交配し、最終目標ラインである BRGhS ラインの樹立を行った。現在、マウスコロニーを拡大中である。これまでの移植実験では、良好なヒト臍帯血 CD34 陽性 CD38 陰性細胞の生着が得られており、今後、腫瘍細胞を含めたアッセイを行って行く予定である。

(4) 固形がん幹細胞の至適異種移植法の確立と薬効評価に関する有用性について

我々の樹立した BRGS ラインでは、下図のように肺癌、大腸癌の細胞株のほか、大腸癌の臨床サンプルの生着が得られている。これらは、皮下への移植であるが、完全マクロファージ寛容が得られている BRGhS ラインでは、同様の移植

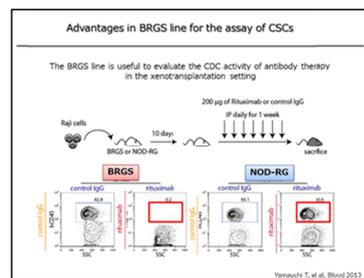


法でも、移植効率は著しく改善していることが予想され、今後、指摘移植経路を含めて検討予定である。

さらに、腫瘍性幹細胞特異的に発現する治療表面分子の同定を試みる予定である。NOD バックグラウンドは、C5 欠損により補体活性が著しく低下しているため、抗体製剤の補体依

存性細胞障害作用の薬効評価が極めて困難であるが、BRGS ラインは、正常補体活性を有し、抗体製剤の補体依存性細胞障害作用の薬

効評価にも有用である。本課題で樹立したラインも正常補体活性を有するため、



樹立したラインを用いて、がん幹細胞アッセイのみでなく、効率的 in vivo スクリーニングモデルとして有効である。下図に示すように NOD ベースの NOD-RG マウスには、補体 C5 が欠損しているため、CDC 活性のある anti-CD20 抗体 Rituximab を用いても、移植した Raji 細胞をほとんど殺すことができない。一方、BRGS マウスにおいては速やかに Raji 細胞が除去される。すなわちある抗原に対する抗体の薬効評価(Proof of concept)のために、BRGhS マウスは極めて有用である。

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 77 件)

Kikushige Y, Akashi K. TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1266: 118-123, 2012.

Kuriyama T, 以下 13 名、13 番目 . Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120: 4058-4067, 2012.

Shima T, 以下 16 名、16 番目 . Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013.

Yamauchi T, 以下 13 名、13 番目 . Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316-1325, 2013.

Iwamoto C, 以下 15 名、15 番目 . The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol* 42: 163-171, 2013.

Shima T, 以下 11 名、11 番目 . The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human

t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp Hematol* 42: 955-965, 2014.

Miyawaki K., 以下 10 名、10 番目 .CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: Redefinition of murine common myeloid progenitor. *Stem Cells* 33: 976-987, 2014

〔学会発表〕(計 13 件)

赤司浩一 .「慢性リンパ性白血病幹細胞の特性と治療応用」第 10 回日本臨床腫瘍学会, 2012 年 7 月, 大阪

赤司浩一 .「悪性造血器腫瘍における癌幹細胞の病理」第 71 回日本癌学会, 2012 年 9 月, 札幌

赤司浩一 .「造血幹細胞と造血器癌幹細胞」第 110 回日本内科学会, 2013 年 4 月, 東京

Koichi Akashi .「Epigenetic Landscape of Hematopoietic Lineage Commitment Can Be Visualized by Analysis of Incorporated H3.3 Variant」ISEH 42nd Annual Scientific Meeting, 2013 年 5 月, Vienna, Austria

Koichi Akashi .「Epigenetic landscape of hematopoiesis visualized by histone H3.3 incorporation is deregulated in acute myeloid leukemia」第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月, 横浜

Koichi Akashi .「Cancer Stem Cells in Human Hematological Malignancies」第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月, 横浜

Koichi Akashi .「Visualization of the epigenetic landscape of hematopoietic lineage commitment based on the analysis of histone H3.3 incorporation」第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月, 札幌

赤司浩一 .「TIM-3, as a Target for Eradication of Cancer Stem Cells」The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014 年 6 月 17 日、東京 (ハイアットリージェンシー東京)

赤司浩一 .「造血器腫瘍幹細胞」第 101 回近畿血液学地方会 (特別講演) 2014 年 6 月 28 日、大阪 (テイジンホール)

赤司浩一 .「白血病幹細胞研究のすゝめ」第 76 回日本血液学会学術集会 (学会賞受賞講演) 2014 年 11 月 2 日、大阪 (大阪国際会議場)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

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

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

赤司 浩一 (Akashi Koichi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号 : 80380385

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :