

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659487

研究課題名(和文) NOGマウスを用いた画期的なヒト白血病モデルの開発

研究課題名(英文) Development of a novel human leukemia model using humanized mice

研究代表者

石井 直人 (ISHII, Naoto)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60291267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト白血病の発症原因を見いだすために、超免疫不全マウス(NOGマウス)にヒト造血幹細胞を移植することにより、マウス内でヒト白血病を発症させる実験モデルの開発を行った。その結果、ヒト急性単球性白血病やヒトT細胞白血病をマウス内で発症させることに成功した。これらの白血病モデルを用いることで、ヒト白血病の発症原因の解明を目指すと同時に、白血病の新たな治療法の開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：In vivo studies in which primary human leukemia cells were transplanted into immunodeficient mice, provided significant advances in our understanding of the pathogenesis of human leukemia. However, these models, in which the leukemia cells had already developed in human patients before being transplanted into mice, are not suitable for studying physiological leukemogenesis. Therefore, we here developed a new experimental model for analyzing leukemogenesis in which primary human HSCs are converted into leukemia cells by deliberate genetic hits. We hope that this newly established model using humanized mice will contribute to future studies aimed at revealing the molecular mechanisms for leukemogenesis and developing new therapies against leukemia.

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：白血病 ヒト化マウス 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

本研究室が X 連鎖重症免疫不全症 (Xc 鎖欠損症) の研究過程で開発した IL-2R γ 鎖欠損マウスを元に実験動物中央研究所が開発した超免疫不全 NOG マウスは異種拒絶反応が完全に欠損する。そのため、NOG マウスには、ほぼ全てのヒト細胞、組織が移植・生着可能である。実際に、ヒト造血幹細胞を NOG マウスに移植すると、従来は全く不可能であったヒトリンパ球の正常発生・分化がマウス内で観察できる (*Int Immunol*, 21: 843-858, 2009, *BBRC* 399: 733-737, 2010)。すなわち、NOG マウスの最大の有用性はヒト造血幹細胞などのヒト細胞の分化・増殖・維持機構が生体内で観察可能な点である。そこで申請者は、これまで、NOG マウスにヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移植し、ヒト T 細胞および B 細胞をマウス内に構築することにより、ヒト獲得免疫系をマウス内に再構築する免疫系ヒト化マウスプロジェクトを遂行してきた。その過程で、白血病癌遺伝子を導入すればヒト造血幹細胞の異常な分化、すなわち癌化をも NOG マウス内で再現できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究室が作製した Xc 鎖欠損マウスを用いて実験動物中央研究所で開発された NOD/scid/Xc-KO (NOG) マウスは異種拒絶反応を完全に欠損した超免疫不全マウスである。ヒト造血幹細胞を NOG マウスに移植すると、従来は全く不可能であったヒト血球系・免疫系細胞の正常分化が生じ、ヒト造血系細胞の分化をマウス内で解析することが可能となった。そこで本研究では、NOG マウスのこの画期的な特性を利用して、乳児白血病癌遺伝子 MLL-AF10 や T 細胞白血病関連がん遺伝子 ICN1 (活性化型 Notch1) を導入したヒト造血幹細胞 NOG マウスに移植することにより、正常ヒト造血幹細胞からヒト白血病を発生させ、ヒト白血病細胞の分化・増殖・腫瘍化までを生体内で解析可能な実験モデルを確立する。

3. 研究の方法

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞にレトロウイルス (MLL-AF10-EGFP、Kras^{G12V}-Venus あるいは ICN1-EGFP) を感染させ、NOG マウスに全移植した。移植後経時的に血球細胞をフローサイトメトリー法により解析し、白血病の発症をモニターした。また、一次移植で白血病が発症しない場合には、二次移植を行い、白血病発症の有無について解析した。二次移植の後に白血病が発症した場合には、一次移植後の遺伝子導入血液細胞と白血病細胞の遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンサーによる RNA シーケンシングで比較解析することにより、ヒト白血病多段階発がんの分子機構を明らかにする予定であった。

4. 研究成果

(1) MLL-AF10 遺伝子導入によりヒト急性単球性白血病の発症

白血病関連キメラ遺伝子である MLL-AF10 と、MLL 白血病の 30%以上で検出される活性化型 ras (K-ras^{G12V}) とを同時にヒト造血幹細胞に導入し、NOG マウスに移植することにより、ヒト急性単球性白血病をマウス内に発症させることに成功した (論文 2)。MLL-AF10 あるいは K-ras^{G12V} の単独導入では白血病の発症が全く認められず、白血病細胞は全て両者遺伝子を同時に発現していることが確認された。そこで、さらに、あらかじめ MLL-AF10 遺伝子導入ヒト造血幹細胞を生着させた NOG マウスを作成し、その骨髄から精製した MLL-AF10 遺伝子発現造血幹細胞に K-ras^{G12V} 遺伝子を 2 段階的に導入した後に新たな NOG マウスに 2 次移植することにより、2 段階発がんモデルの開発を試みた。しかし、骨髄から精製した MLL-AF10 遺伝子発現造血幹細胞を培養すると、レトロウイルス感染 5 日目にはほとんどの細胞が死滅し、そのために、現時点で *in vitro* での 2 段階遺伝子導入には成功していない。現在、MLL-AF10 単独導入した造血幹細胞が生着した NOG マウスの骨髄内に、Kras^{G12V} 遺伝子レトロウイルスベクターを直接感染することにより、*in vivo* の 2 段階遺伝子導入実験を試みている。

(2) ヒト T 細胞白血病の多段階発がんモデルの開発

ヒト造血幹細胞に T 細胞白血病がん遺伝子である ICN1 (活性化型 Notch1) 遺伝子を導入した後に NOG マウスに移植したところ、ICN1 発現 (EGFP 陽性) 細胞は全て T 細胞に分化した。すなわち、マウスでは既知である、Notch1 の T 細胞分化促進作用がヒト造血細胞においても同様であることが *in vivo* で証明された。さらに、EGFP 陽性 T 細胞を別の NOG マウスに 2 次移植したところ、T 細胞白血病が発症した。しかし、ICN1 単独導入では T 細胞白血病は 23 匹中上記の 1 匹しかみられなかった (論文 11)。そこで、ICN1 と活性化型 K-ras あるいは活性化型 JAK3 を共導入することにより、より効率的なヒト T 細胞白血病モデルの開発を試みた。しかしながら、上記の組み合わせで遺伝子導入を行うと、EGFP 陽性の血球細胞が全く観察されず、ICN1 単独で誘導された T 細胞分化がむしろ抑制される結果となった。本知見は学術的には有意義であるが、白血病モデルを開発する意味では不利な知見となった。

一方、1 例のみ発症した T 細胞白血病について、白血病細胞における ICN1 ベクターのゲノム挿入部位を LAM-PCR 法で解析し、ベクター挿入部位が、第 2 番染色体短腕の未知遺伝子 (機能不明) の上流 7kb の位置であることを見いだした。現在、同定された未知遺伝子が新たながん遺伝子として (2 ヒット目として) 機能している可能性を考え、その機能

を解析中である。

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 11 件)

1. Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, Croft M, Ishii N, and So T: TNF receptor-associated factor 5 limits inflammatory CD4⁺ T cell differentiation by antagonizing IL-6-receptor signaling. *Nat Immunol*, 15: 449-456, 2014, doi: 10.1038/ni.2863 (査読有り)
2. Haji Y, Suzuki M, Moriya K, So T, Hozumi K, Mizuma M, Unno M, and Ishii N: Activation of Notch1 promotes development of human CD8⁺ single positive T cells in humanized mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 447: 346-351, 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.003 (査読有り)
3. Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, Miyake S, and Akiba H: OX40 ligand regulates splenic CD8-dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444: 235-40, 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.060 (査読有り)
4. Nagata T, Murata K, Murata R, Sun S-L, Saito Y, Yamaga S, Tanaka N, Tamai K, Moriya K, Kasai N, Sugamura K, and Ishii N: Hepatocyte Growth Factor Regulated Tyrosine Kinase Substrate in the peripheral development and function of B-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443: 351-356, 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.029 (査読有り)
5. Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, and Ishii N: Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLOS ONE*, 8: e71594, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0071594 (査読有り)
6. Sun Shu-lan, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Funayama R, Kondo M, Saito H, Matumoto N, Nakayama K, and Ishii N: Y-chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J. Immunol*, 190: 6209-6220, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1300303 (査読有り)
7. Kawabe T, Sun SL, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, and Ishii N: Homeostatic proliferation of naïve CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J. Immunol*. 190: 5788-5798, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1203111 (査読有り)
8. Ichimura, A., Matsumoto, S., Suzuki, S., Dan, T., Yamaki, S., Sato, Y., Kiyomoto, H., Ishii, N., Okada, K., Matsuo, O., Hou, F.F., Vaughan, D.E., de Strihou, Cv, and Miyata, T.: A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33: 935-42, 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301224 (査読有り)
9. Shima K, Mizuma, M., Hayashi, H., Nakagawa, K., Okada, T., Sakata, N., Omura N., Kitamura Y., Motoi, F., Rikiyama, T., Katayose, Y., Egawa, S., Ishii, N., Horii, A., and Unno, M.: Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system. *J. Exp Clin Cancer Res.* 31, 33, 2012, doi: 10.1186/1756-9966-31-55 (査読有り)
10. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, and Ishii N: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS ONE* 7, e37892, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037892 (査読有り)
11. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, and Satake M.: Runx1-deficiency in CD4⁺ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J. Immunol.* 188, 5408-5420, 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102991 (査読有り)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Sun SL, Itoh A, Asao A, Takahashi T, So T, Kondo M, Ishii N: Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉市、2013 年 12 月 11 日-13 日
2. Nagashima H, Yamaki S, Asao A, Croft M, Ishii N, So T: TRAF5 controls inflammatory CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉市、2013 年 12 月 11 日-13 日
3. 河部剛史、孫舒嵐、鈴木信、山木聡史、浅尾敦子、宗孝紀、石井直人: 腸管 Th17 細胞の産生における腸間膜リンパ節の役割, 第 6 7 回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2013 年 8 月 30 日-31 日
4. 長島宏行、山木聡史、浅尾敦子、Michael Croft、石井直人、宗孝紀: TRAF5 欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎が増悪する。第 6 7 回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2013 年 8 月 30 日-31 日
5. Shu-lan Sun, Satoshi Horino, Ari Ito, Takeshi Kawabe, Atsuko Asao, Takeshi Takahashi, Takanori So, Motonari Kondo, and Naoto Ishii, Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. 15th International Congress of Immunology, Milano, Italy, 2013 年 8 月 22 日 - 27 日
6. Takeshi Kawabe, Shu-lan Sun, Satoshi Yamaki, Atsuko Asao, Takeshi Takahashi, Takanori So, and Naoto Ishii, Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. 15th International Congress of Immunology, Milano, Italy, 2013 年 8 月 22 日 - 27 日
7. Takeshi Kawabe, Shu-lan Sun, Satoshi Yamaki, Atsuko Asao, Takeshi Takahashi, Takanori So, and Naoto Ishii, Th17 cell generation and mucosal immunity. Annual International Symposium of Rheumatology Institute of Seoul National University Hospital, Seoul, 2013 年 6 月 28 日
8. Takeshi Kawabe, Shu-lan Sun, Satoshi Yamaki, Atsuko Asao, Takeshi Takahashi, Takanori So, and Naoto Ishii, Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, Sendai, 2013 年 5 月 9 日 - 11 日
9. Takeshi Kawabe, Shu-lan Sun, Satoshi

Yamaki, Atsuko Asao, Takeshi Takahashi, Takanori So, and Naoto Ishii, Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. 東京、The 1st Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum, 2013 年 1 月 29 日

10. Nagashima H, Yamaki S, Croft M, Ishii N, So T: TNF receptor-associated factor 5 inhibits Th17 and Tfh differentiation. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012 年 12 月 5 日-7 日
11. Kawabe T, Sun SL, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, Ishii N "Homeostatic proliferation occurs in mesenteric lymph nodes and supplies effector memory CD4⁺ T cells in the intestine." 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012 年 12 月 5 日-7 日
12. Nagashima H, Yamaki S, Croft M, Ishii N, So T, TNF receptor-associated factor 5 inhibits Th17 and Tfh differentiation. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012 年 12 月 5 日-7 日
13. Asao A, So T, Hoshino T, Asao H, Sugmura K, Ishii N "L-arginine upregulates NO production by macrophages during infection with *Leishmania major*." 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012 年 12 月 5 日-7 日
14. 浅尾敦子、宗孝紀、Lishomwa C. Ndhlovu、浅尾裕信、菅村和夫、石井直人: リーシュマニア原虫感染防御における L-アルギニンの効果, 第 66 回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2012 年 8 月 23 日-24 日
15. 長島宏行、山木聡史、Michael Croft、石井直人、宗孝紀: TNF receptor-associated factor 5 によるヘルパー T 細胞制御機構の解明, 第 66 回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2012 年 8 月 23 日-24 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.immunol.med.tohoku.ac.jp//index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 直人 (ISHII, NAOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60291267