

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790962

研究課題名(和文)急性転化慢性骨髄性白血病に対する新規分子標的療法の構築

研究課題名(英文) Establishment of new targeted therapy against acute blastic transformation of chronic myeloid leukemia

研究代表者

佐藤 智彦 (Tomohiko, Sato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90553694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Evi1-レポーターCML-CPマウスから、Evi1高発現細胞はLSK分画に局限し、Evi1高発現LSK細胞は白血病原性が高く、CML分子標的治療薬ニロチニブに抵抗性であった。Evi1-レポーターCML-BCマウスから、Evi1高発現細胞は前駆細胞を含むLK分画に局限し、Evi1高発現LK細胞は白血病原性が高く、ニロチニブ抵抗性であった。CML-CP・BCいずれのマウスもEvi1ヘテロノックアウトマウスと組み合わせるとCML発症が遅れることから、CML発症・進展におけるEvi1の重要性が示唆された。また、BCR-ABLとEvi1の共発現により新規の骨髄性白血病モデルを構築できた。

研究成果の概要(英文)：Introduction of CML into Evi1-IRES-GFP knock-in mice, a versatile HSC-reporter strain, enables us to separate Evi1-high CML cells from the individual. Evi1-IRES-GFP allele models of CML in chronic phase (CML-CP) revealed that Evi1 is predominantly enriched in the stem cell fraction and associated with an enhanced proliferative as well as a leukemia-initiating capacity and that Evi1-high CML-CP cells exhibit resistance to TKIs. Overexpressing BCR-ABL and NUP98-HOXA9 in Evi1-IRES-GFP knock-in mice to model CML in blast crisis (CML-BC), in which Evi1-high cells turned to be a major population as opposed to a minor population in CML-CP models, showed that Evi1-high CML-BC cells have a greater potential to recapitulate the disease and appear resistant to TKIs. Given that Evi1 heterozygosity ameliorates CML-CP and CML-BC development and that the combination of Evi1 and BCR-ABL causes acute myeloid leukemia resembling CML-BC, Evi1 could regulate CML development as a potent driver.

研究分野：医歯薬学

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：白血病幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病(CML)の慢性期(CP)から急性転化期(BC)への移行メカニズムは十分に解明されていない。CML-CPは分子標的治療が奏効するが、少なからずCML-BCに移行する。CML-BCは予後不良で有効な治療法がない。転写因子 Evi1(Ecotropic Retroviral Integration site 1)はCML-BCでしばしば高発現する。

正常造血では Evi1 陽性細胞は静止期にあるが、癌遺伝子が発現する白血病ではより増殖活性の高い細胞が Evi1 陽性細胞であり幹細胞性も高いことが考えられる。従来の強制発現による Evi1 高発現の解析と、今回樹立した Evi1 レポーターシステムによる白血病モデルは、白血病における内因性 Evi1 を可視化し、Evi1 陽性細胞を前方視的に分離・解析できるものとして一線を画す。また、Evi1 による白血病幹細胞制御の報告はなく、Evi1 陽性細胞が優位であることを可視化した疾患モデル(CML-BCモデルマウス)を作製したのも世界初である。

### 2. 研究の目的

本研究では、チロシンキナーゼ阻害剤による治療での根絶が難しく、有効な治療法が確立されていないCML-BCにおける Evi1 高発現メカニズムの解明と、Evi1 特異的な標的遺伝子の抽出をもとにした、CML-BC新規標的治療の構築を目的とする。すでにわれわれは、Evi1 レポーターマウスとCML-BCモデルマウスとを組み合わせた、Evi1 レポーターCML-BCモデルの作製に成功した。このモデルでは骨髄及び脾臓で Evi1 (GFP) 陽性細胞と陰性細胞がヘテロに存在し、Evi1(GFP)陽性細胞のみ白血病原性がある。

このCML-BCモデルにおける、Evi1 陽性細胞と Evi1 陰性細胞の遺伝子発現解析をマイクロアレイを用いて行い、Evi1 高発現に伴うシグナル経路を抽出する。候補遺伝子の抑制によるCML-BCへの効果をCML-BCモデルで検証する。また、イマチニブなどのTKIの併用による治療効果も検証する。CML-BCにおける Evi1 経路の重要性を確認するため、Evi1 cKOマウスを用いたCML-BCモデルを作製し、Evi1 欠失によるCML-BCマウスの生存延長を確認する。上記からCML-BC新規標的治療の基盤構築を目指す。

### 3. 研究の方法

われわれが樹立した Evi1-GFP ノックインマウスは世界初の、正常造血において「*in vivo* で造血幹細胞を GFP 陽性細胞として追跡できるマウス」である(*J Exp Med.* 2011)。レトロウイルスによるBCR/ABL単独もしくはBCR-ABLとNUP98/HOXA9の共発現を利用したCML-CP/CML-BCモデルを、Evi1-GFP ノックインマウスと組み合わせて、Evi1 レポーターCML-BCマウスを作製した。

急性転化慢性骨髄性白血病(CML-BC)にお

いて白血病幹細胞性を持つ Evi1 高発現細胞のメカニズムを明らかにするために、CML-BCマウスにおいて Evi1 を条件的にノックアウトして、CML-BCにおける Evi1 経路の重要性を検証する。さらに、Evi1 高発現CML-BC細胞と低発現細胞の遺伝子発現パターンを解析し、CML-BCにおける Evi1 高発現に寄与するシグナルを抽出する。そのシグナルを抑制することでCML-BCへの治療効果を検証する。CMLへの分子標的薬であるイマチニブとの併用効果についても検証する。

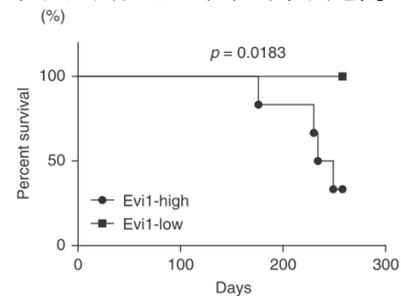
### 4. 研究成果

レトロウイルスによる Evi1 レポーターCML-CPマウスでは、正常 Evi1 レポーターマウスと同様に、Evi1(GFP)陽性細胞は骨髄中の約0.1%でありLSK分画でその割合が最も高かった。Evi1(GFP)陽性CML-CP LSKは陰性CML-CP LSKよりもコロニー形成能が高く、その増殖能が高かった。CML-CPモデルマウスである p210 BCR-ABL トランスジェニックマウス(広島大学 本田浩章教授より)と Evi1 レポーターマウスを組み合わせた、Evi1 レポーターCML トランスジェニックマウスを用いて、Evi1

陽性細胞は *in vitro* の増殖能が高い上に、*in vivo* で白血病原性があるこ

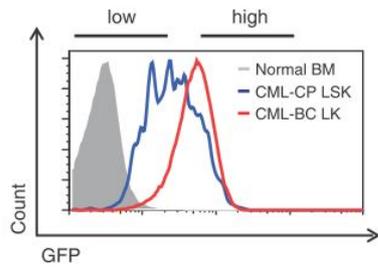
とが明らかになった。(上図参照)また、Evi1 陽性細胞は造血幹細胞の表面マーカーパターンである、CD150+C48-LSK 分画に最も多く分布していた。BCR-ABL 特異的阻害剤であるニロチニブをEvi1 レポーターCMLトランスジェニックマウスに投与し、Evi1 陽性細胞がニロチニブ抵抗性であることが示された。さらに、Evi1 ヘテロノックアウトマウスと p210 BCR-ABL トランスジェニックマウスの交配により、Evi1 ヘテロ欠失はCML発症を遅らせることも明らかになった。以上より、CML-CP発症における Evi1 の重要性が示された。

Evi1 レポーターCML-BCマウスでは、正常マウスやCML-CPマウスと比べて Evi1(GFP)陽性細胞が骨髄の約5%を占めており、Evi1 陽性CML-BC細胞はほぼ芽球で構成されるのに対して、陰性細胞では分化した血球が優位であった。さらにこの Evi1 陽性細胞・陰性細胞を連続骨髄移植すると、Evi1 陽性細胞のみ移植によりCML-BCを発症することができた。以上より、Evi1 陽性CML-BC細胞にCML-BC幹細胞が存在することが示された。CPモデルと異なり、より分化したLK分画にEvi1 陽性細胞が多く存在し、Evi1 陽性細胞が高い白血病原性を持つことが明らかになった。CML-BC LK細胞はCML-CP LSK細胞よりも GFP 発現が



高く、BCR-ABL + NUP98-HOXA9 による Evi1 発現上昇が考えられた。(下図参照)さらに Evi1 高発現 CML-BC LK 細胞はニロチニブ抵抗性であった。

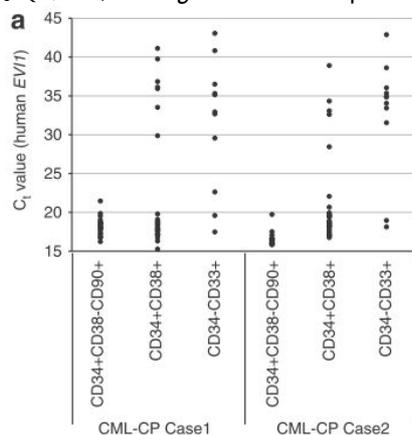
CML-BC における Evi1 経路の重要性を示すために、当初 Evi1 コンディショナル



ノックアウトマウスによる CML-BC モデルの作製を試みたが、CreER システムとタモキシフェンによる Evi1 欠失効率が悪く、その代わりに Evi1 ヘテロノックアウトマウスによる CML-BC モデルを作製した。CML-BC はドナー細胞として Evi1 野生型及びヘテロ型双方の骨髓細胞から発症を認めた。Evi1 野生型もしくはヘテロ型 CML-BC 白血病細胞を連続骨髓移植したところ、野生型 CML-BC が全例移植可能であったのに対し、ヘテロ型 CML-BC では CML-BC を発症することができなかった。これより、Evi1 発現を 50%に低下させることで CML-BC の病勢を弱めることがマウスモデルで明らかになった。

以上より、CML-CP、CML-BC とともに Evi1 陽性細胞が幹細胞であり、かつ病勢のコントローラーになっていることが示唆された。BCR-ABL と Evi1 の、レトロウイルスによる共発現を行い、骨髓移植レシピエントマウスが CML-BC に類似した急性骨髓性白血病様の病態を呈することが明らかになった。これらの結果から、Evi1 は CML-CP と CML-BC の幹細胞マーカーとしてだけではなく、機能的にも CML を制御することが明らかになった。また、ヒト CML 臨床検体を用いて、造血幹細胞分画である、CD34+CD38-CD90+分画に EVI1 が高発現していることをシングルセルで示し(下図参照) 上記のマウスでの解析と合致する結果を得た。(以上、*Oncogene* 2014 in press)

Evi1 陽性 CML 細胞を規定するシグナル経路を抽出するために、Evi1 陽性 CML-CP LSK 細胞・Evi1 陰性 CML-CP LSK 細胞・Evi1 陽性正常 LSK 細胞・Evi1 陰性正常 LSK 細胞の 4 者でマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。GSEA 解析により、Evi1 陽性 CML-CP 細胞は、Evi1 陰性 CML-CP LSK 細胞よりも quiescent であり、Evi1 陽性正常 LSK 細胞より proliferating なプロファイルであり、上記の CML マウスの解析結果と合致していたが、残念ながら CML 特異的な Evi1 の標的シグナルを抽出することはできなかった。



以上を要約すると、Evi1-レポーター CML-CP マウスから、Evi1 高発現細胞は LSK 分画に局限し、Evi1 高発現 LSK 細胞は白血病原性が高く、CML 分子標的治療薬ニロチニブに抵抗性であった。Evi1-レポーター CML-BC マウスから、Evi1 高発現細胞は前駆細胞を含む LK 分画に局限し、Evi1 高発現 LK 細胞は白血病原性が高く、ニロチニブ抵抗性であった。CML-CP・BC いずれのマウスも Evi1 ヘテロノックアウトマウスと組み合わせると CML 発症が遅れることから、CML 発症・進展における Evi1 の重要性が示唆された。また、BCR-ABL と Evi1 の共発現により新規の骨髓性白血病モデルを構築できた。

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 1 件)  
Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 2014 in press. 査読あり  
DOI: 10.1038/onc.2014.108

〔学会発表〕(計 3 件)  
Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Honda H, Nakagawa M, Kumano K and Kurokawa M. Regulation of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells by Leukemia Oncogene Evi1. 第 10 回幹細胞シンポジウム(oral presentation)、2012 年 5 月 31 日~6 月 2 日、淡路夢舞台  
Sato T, Goyama S, Kataoka K, Tsuruta T, Nasu R, Nakagawa M, Kumano K and Kurokawa M. Regulation of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells by Leukemia Oncogene Evi1. The 17th Congress of European Hematology Association, Oral presentation, 2012.6.14 ~ 6.17, RAI Amsterdam, Netherlands.

佐藤 智彦、黒川 峰夫、難治性白血病関連因子 Evi1 による慢性骨髓性白血病幹細胞制御、第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012 年 6 月 27 日~29 日、小倉市西日本総合展示場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-hemat.com/>

## 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輸血部・助教

研究者番号：9 0 5 5 3 6 9 4