

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年3月19日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890046

研究課題名（和文）赤白血病モデルにおける白血病幹細胞形成・維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the nature of leukemic stem cells in murine erythroleukemia model.

研究代表者

片岡 圭亮 (KATAOKA, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90631383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）2300千円、（間接経費）690千円

研究成果の概要（和文）：JAK2 V617F 変異を持つ骨髄増殖性腫瘍の白血化において p53 不活化が重要であることに着目し、p53 ノックアウトマウスの骨髄細胞に JAK2 V617F 変異遺伝子を導入し、マウスに移植することにより白血病モデルを作成した。このマウスモデルは真性多血症を発症後に赤白血病に移行し、継代移植可能であった。さらに、白血病幹細胞分画の同定を試み、未分化な細胞と赤芽球系細胞に白血病幹細胞分画が存在するが、両者は異なる機序にて白血病を発症させることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We retrovirally transduced JAK2V617F into bone marrow cells from p53 wild-type and knockout mice and transplanted them into irradiated recipients. As previously shown, JAK2V617F expression in wild-type hematopoietic cells causes polycythemia vera (PV). In contrast, in the absence of p53, recipients developed fatal leukemia after the preceding PV phase, characterized by expansion of dysplastic erythroid progenitors. These leukemic cells are serially transplantable. Both primitive leukemia cells and erythroid progenitors possess leukemia-initiating capacity, whereas myeloid populations cannot recapitulate the disease.

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、急性骨髄性白血病、p53、JAK2

## 1. 研究開始当初の背景

最近、白血病を含む悪性腫瘍においてがん幹細胞の存在が確認されつつあり、多くの悪性腫瘍で少数の自己複製能を持つがん幹細胞を頂点とする幹細胞システムが形成されていると考えられている。白血病幹細胞は、他の悪性腫瘍に先駆けてその存在が実験的に確認されており、免疫不全マウスを用いたヒト白血病細胞の異種移植により、白血病を構成する細胞の中にも正常造血システムと同様に階層性が存在し、自己複製能を持つ白血病幹細胞によりこの階層性が維持されていることが証明されている (Nat. Med. 3(7):730-737, 1997)。さらに、最近のヒト急性骨髄性白血病検体の白血病幹細胞分画における網羅的遺伝子発現解析により、白血病幹細胞と造血幹細胞に共通する幹細胞プロ

グラムが患者の予後に対する有意な予後因子であることが示されている (Nat. Med. 17(9):1086-1093, 2011)。この結果は、“白血病幹細胞”という概念が臨床的にも重要であることを示唆している。したがって、白血病の治癒のためには白血病幹細胞の根絶が必要であり、この白血病幹細胞の形成・維持を制御するシグナル経路の同定は新たな治療戦略の発展のためには有用な方法であると考えられる。この白血病幹細胞分画は、ヒト検体では白血病幹細胞が存在する分画や割合が異なることが知られており、ヒト検体を対象とした白血病幹細胞の形成・維持機構の解析は困難である。しかし、MLL 関連急性骨髄性白血病や慢性骨髄性白血病のマウスモデルでは、白血病幹細胞分画が同定されており、高効率に白血病幹細胞を純化可能であ

ることが知られている。実際にこのようなマウスモデルを用いた白血病幹細胞の形成・維持機構の解明により、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、Hedgehog 経路などの様々な白血病幹細胞を標的とした新たな治療法が提案されている (Science 327(5973):1650-1653, 2010; Nature 458(7239):776-779, 2009)。このことは白血病マウスモデルを用いた病型特異的な白血病幹細胞の分子機構の解明が新規の治療戦略に結びつく可能性を実証しており、白血病幹細胞研究を土台にした新規分子標的探索の重要性を示すものである。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに急性骨髄性白血病の難治化の分子機序の解明とその克服に主眼に置いた研究を行ってきた (J Exp Med. 208(12): 2403-2416, 2011)。代表的な難治性白血病の一つとして、骨髄増殖性腫瘍より白血化した二次性白血病が挙げられる。これまで骨髄増殖性腫瘍の白血化の機序はほとんど明らかではなかったが、最近の臨床研究により JAK2 V617F 変異陽性例を含む骨髄増殖性腫瘍より白血病に移行した症例において p53 経路の異常が多く認められることが報告された (N Engl J Med 364(5): 488-490, 2011)。申請者はこの JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍の白血化における p53 経路異常の意義を検証するために、これらの遺伝子異常を併せ持つ白血病モデルの作成を試みた。具体的には p53 ノックアウトマウスの骨髄細胞に JAK2 V617F 変異遺伝子を導入し、致死量放射線照射マウスに移植することにより白血病モデルを作成した。野生型マウス骨髄細胞に JAK2 V617F 変異遺伝子を導入した場合、真性多血症を発症することが知られているが (Blood 108(5): 1652-1660, 2006)、p53 ノックアウトマウス骨髄細胞を用いた場合、移植後 3 週程で真性多血症を発症し、その後 5~8 週で急性白血病を発症し死亡することを見出した。

### p53 loss leads to leukemic transformation in a mouse Jak2V617F-induced PV model.

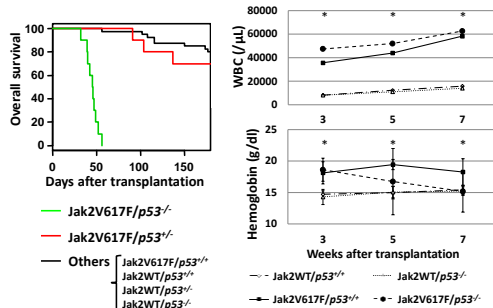


図 1 p53 ノックアウトマウスの骨髄細胞に JAK2 V617F 変異遺伝子を導入し移植したレシピエントマウス (Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>) の

## 生存曲線および血算値

この白血病マウスでは、白血球数の増加、ヘモグロビン・血小板数の減少、肝脾腫、肺出血を認め、末梢血及び骨髄において形態学的に異型性を伴う未熟な赤芽球の増加を認めた。細胞表面マーカー解析では Mac-1 陽性、Gr-1 陽性の骨髄球系細胞の増加と CD71 陽性、Ter-119 弱陽性、c-kit 弱陽性の赤芽球系細胞の増加を認めた。さらにこの白血病細胞は 2 次移植により同じ急性白血病を再現可能であり、2 次移植後の白血病細胞はほとんど赤芽球系細胞により占められていた。これらの結果より、このマウスモデルは真性多血症を発症後、赤白血病に移行したと考えられ、この JAK2 V617F 変異と p53 不活性化の組み合わせにより骨髄増殖性腫瘍からの白血化モデルを作成できることを証明した (未発表)。この結果から、申請者はこの白血病モデルにおける白血病幹細胞分画の形成・維持機構を解明が、前述のように新規の白血病の治療戦略の発展につながると考えた。本研究の目的は、この申請者が作成した新たな白血病モデルを利用し、赤白血病における白血病幹細胞分画の同定することにある。さらにその分画と真性多血症モデルにおける同分画を比較することにより、骨髄増殖性腫瘍が白血化する分子機序及び赤白血病における白血病幹細胞の形成・維持機構を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 連続骨髄移植による赤白血病モデルの白血病幹細胞分画の同定

上述の通り、p53 ノックアウトマウスの骨髄細胞にレトロウイルスを用いて JAK2 V617F 変異遺伝子を導入し、致死量放射線照射マウスに移植することにより赤白血病モデルを作成する実験系を確立した (未発表)。申請者はこの赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画を同定するために、1 次移植で発症した白血病細胞を、セルソーターを用いて分画ごとに分離し、致死量放射線を照射したレシピエントマウスに移植した。

### ① 赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画の細胞系列の同定

申請者は、すでに 1 次移植後の解析によりこの白血病細胞の骨髄及び脾臓においては、Mac-1 陽性、Gr-1 陽性の骨髄球系細胞と CD71 陽性、Ter-119 弱陽性、c-kit 弱陽性の赤芽球系細胞が主な割合を占めることを見出していたため、まず、Mac-1 陽性の骨髄系細胞、CD71 陽性の赤芽球系細胞、Mac-1 陰性、CD71 陰性の細胞の 3 分画に分離して 2 次移植実験を行った。この結果により、本モデルにおける白血病幹細胞が骨髄球系細胞、赤芽球系細胞

胞、または未分化な細胞であるか同定可能であると考えられた。

## ②赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画の細分化

白血病幹細胞分画の細胞系統を同定後は、さらに同様の実験を繰り返し、より細分化された白血病幹細胞分画の同定を試みた。すでに申請者が見出している2次移植後の白血病細胞は赤芽球系細胞ほとんどを占めるという結果より、この赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画は赤芽球系細胞にある可能性が最も高いと予想された。実際に本モデルにおける白血病幹細胞が赤芽球系細胞である場合、同時に一部の細胞に発現しているTer-119及びc-kitにて細分化した。異なる可能性として、白血病幹細胞分画が骨髄球系細胞であった場合、Mac-1に骨髄系マーカーである、Gr-1、CD115、F4/80などを組み合わせて細分化した。あるいはMac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞であった場合、その他のlineageマーカーの有無、c-kitやSca-1などの造血幹細胞マーカーなどを組み合わせた。

## 4. 研究成果

### ①赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画の細胞系列の同定

本研究において樹立されたJak2 V617F p53<sup>-/-</sup>赤白血病モデルの骨髄または脾臓からMac-1陽性の骨髄系細胞、CD71陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞に分離し、2次移植を行った結果、Mac-1陽性の骨髄系細胞は白血病を再現することはできなかったが、CD71陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞の2分画は白血病を再現可能であった(図2)。

Both erythroid progenitors (CD71(+)) and immature leukemic cells (Mac-1(-) CD71(-)) possess leukemia-initiating capacity.

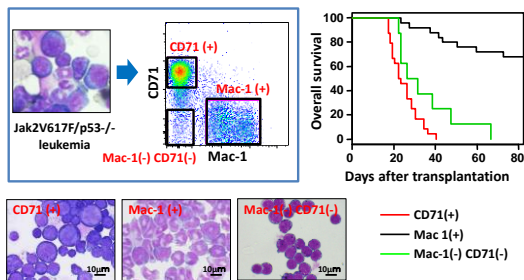


図2 Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>赤白血病モデルの骨髄・脾臓からMac-1陽性の骨髄系細胞、CD71

陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞に分離し、2次移植を行ったレシピエントマウスの生存曲線

さらに、このCD71陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞の2分画は異なる白血病発症能を有していると考えられた。すなわち、CD71陽性の赤芽球系細胞は移植後早期に赤白血病を発症したが、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞は移植後に多血症を発症した後に致死的な白血病を発症した。さらに、CD71陽性の赤芽球系細胞を移植されたマウスの造血組織はほとんどが赤芽球系細胞で占められていたが、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞を移植されたマウスの造血組織では骨髄球系細胞と赤芽球系細胞の両者を認めた(図3)。

Erythroid progenitors (CD71(+)) and immature leukemic cells (Mac-1(-) CD71(-)) have distinct leukemia-initiating capacity.

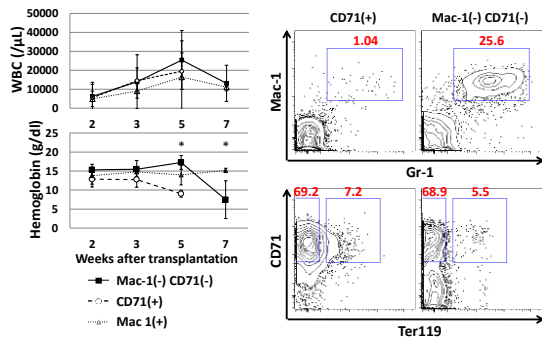


図3 Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>赤白血病モデルの骨髄・脾臓からCD71陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞に分離し、2次移植を行ったレシピエントマウスの血算値および骨髄におけるフローサイトメトリー解析

### ②赤白血病モデルにおける白血病幹細胞分画の細分化

これまでの実験により、Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>赤白血病モデルにおいてCD71陽性の赤芽球系細胞、Mac-1陰性、CD71陰性の未分化な細胞の2分画に白血病幹細胞が存在することが判明したため、同様の実験を繰り返し、より細分化された白血病幹細胞分画の同定を

試みた。CD71 陽性の赤芽球系細胞を Ter-119 発現の有無により 2 分画に分けて移植した結果、Ter-119 陰性分画のみ白血病発症可能であった。さらに、Mac-1 陰性、CD71 陰性の未分化な細胞の中で、lineage マーカー陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性分画(LSK 分画)を分離し、2 次移植した結果、この分画に白血病発症能を認めた。これらの結果より、などの造血幹細胞マーカーなどを組み合わせた。CD71 陽性の赤芽球系細胞の中でも Ter-119 陰性分画に、Mac-1 陰性、CD71 陰性の未分化な細胞の中でも LSK 分画に白血病幹細胞が存在することが示唆された。

### 考察

本研究により Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>白血病は赤白血病であり、その白血病幹細胞は CD71 陽性 Ter-119 陰性分画および LSK 分画に存在することが明らかとなった。CD71 陽性の赤芽球系細胞は移植後早期に赤白血病を発症するが、Mac-1 陰性、CD71 陰性の未分化な細胞は移植後に多血症を発症した後に致死的な白血病を発症すること、および CD71 陽性の赤芽球系細胞を移植されたマウスの造血組織はほとんどが赤芽球系細胞で占められているが、Mac-1 陰性、CD71 陰性の未分化な細胞を移植されたマウスの造血組織では骨髓球系細胞と赤芽球系細胞の両者を認めることから、Mac-1 陰性、CD71 陰性分画は CD71 陽性の赤芽球系細胞より未分化な分画であることが示唆された(図 4)。

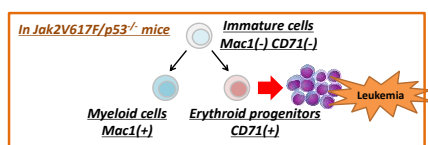


図 4 Jak2 V617F p53<sup>-/-</sup>赤白血病モデルにおける白血病進化のモデル

### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①Takako Tsuruta-Kishino, Keisuke Kataoka, Hiroshi Kobayashi, Junji Koya, Kensuke Narukawa, Tomohiko Sato, and Mineo Kurokawa, Loss Of p53 Induces Leukemic Transformation In a Murine Model Of JAK2V617F-Induced Polycythemia Vera, 55<sup>th</sup> ASH Annual meeting, 2013 年 12 月 7 日～10 日、New Orleans

② 木住野 貴子、片岡 圭亮、小林 央、古屋 淳史、成川 研介、佐藤 智彦、黒川 峰夫、Loss of p53 induces leukemic transformation in a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日～13 日、札幌

③木住野貴子、片岡圭亮、古屋淳史、佐藤智彦、黒川峰夫、JAK2V617F 変異による真性多血症マウスモデルにおいて p53 欠失は白血病化を引き起こす。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日～5 日、横浜

[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

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 圭亮 (KATAOKA, Keisuke)  
 東京大学・医学部附属病院・特任助教  
 研究者番号：90631383