

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290047

研究課題名(和文)Two-hitヒト白血病発症モデルを用いた悪性形質転換機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of transformation processes by using the "two-hit leukemogenesis model"

研究代表者

菅村 和夫 (Sugamura, Kazuo)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：20117360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病の発症あるいは悪性形質転換に関与する因子を同定するため、白血病由来樹立培養細胞から、免疫不全NOGマウス皮下での造腫瘍性を指標に白血病幹細胞様細胞亜株を分画、樹立した。マイクロアレイ、RNA-Seq解析により、樹立した細胞ではCADM1、CA9という細胞表面分子をコードする遺伝子の発現が変動していることが明らかになった。これら分子の機能解析から、造腫瘍性に関してこれまで報告されていなかった分子機構の存在が示唆された。この結果は、白血病の悪性形質転換に関する理解に資するとともに、新規治療標的の同定の可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：To identify a molecule which plays a role in the initiation or malignant transformation of leukemia, we established leukemia stem cell-like cells from leukemia-derived cell lines which show high tumorigenicity in NOG mice. Micro array analysis and RNA-seq analysis revealed the aberrant expression patterns of CADM1 and CA9 genes, both of which encode cell surface proteins. Further analysis on these molecules indicated unveiled molecular mechanisms underlying tumorigenicity of leukemia cells. Our results help understanding malignant transformation of leukemia cells and suggest new possible targets for the leukemia intervention.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：白血病 免疫不全マウス

## 1. 研究開始当初の背景

申請者と実験動物中央研究所が共同で開発した NOD/Scid/γc-KO (NOG) マウスは、免疫能を殆ど消失したいわゆる超免疫不全マウス (Blood, 2002) で、ヒトがん細胞の生着が比較的容易に成立することから、ヒトがん幹細胞のスクリーニングに最適なマウスとして、国内外で活用されている。我々は、ヒト造血幹細胞を NOG マウスに移植すると、ヒト血液系細胞の分化過程をマウス生体内で解析できること (Int. Immunol, 2009)、HLA-DR 遺伝子導入 NOG マウスではヒト免疫系が構築されること (Int. Immunol, 2012)、等を報告してきた。さらに、ヒト白血病の two-hit 発がんモデル系を下記の手法を用いて確立することに成功した (PLoS ONE 2012)。ヒト白血病の発症に関わる変異がん遺伝子には、主として細胞増殖に関わる I 型変異遺伝子群と、細胞の分化抑制や自己複製能に関わる II 型変異遺伝子群の少なくとも 2 つのタイプの存在が指摘されている。ヒト急性骨髄性白血病 (AML) の発症では、これら両がん遺伝子の変異、すなわち two-hit 発がんメカニズムが想定されている。このような背景から、我々は、I 型として Ras<sup>G12V</sup> 変異遺伝子を、II 型として MLL-AF10 融合遺伝子をヒト造血幹細胞に導入し、NOG マウスへ移植した。各遺伝子を単独で導入した場合には、白血病発症はみられなかったが、両遺伝子を共に導入した造血幹細胞の移植では、遅くとも 3 ヶ月後にヒト白血病の発症がみられた。それまでヒト白血病の two-hit 発がんモデルの報告はなく、我々が確立したモデルは、ヒト白血病発症メカニズムを研究する上で、恰好の解析系となることが期待された。他方、最近の AML 患者検体を用いたゲノム解析では 1 検体当たり 1~5 個程度の driver 変異の存在が推定され、さらに DNA メチル化阻害剤の臨床応用等から epigenetic な変動の重要性も指摘されているが、決定的な発症機構解明には至っていなかった。白血病細胞の増殖維持や治療抵抗性の原因としてがん幹細胞が近年注目を浴び、そのコンセプトに修正を加えながら、新規診断・治療戦略のターゲットとして精力的な研究が展開されている。申請者は最近、成人 T 細胞白血病 (ATL) 由来細胞を、NOG マウスで複数回継代することにより、がん幹細胞の指標であるマウスでの造腫瘍能の高い細胞集団を濃縮できることを見いだし (投稿準備中)、この成果を基にがん幹細胞の分離法を開発した。この分離法をモデル白血病に適用し、そのがん幹細胞を分離し、性状を解析することで、白血病細胞の増殖維持 / 抗がん剤耐性機構の解明が期待された。

## 2. 研究の目的

以上の背景をもとに、NOG マウス移植を技術基盤としたモデル系で白血病細胞の幹細胞を分画しその正常を明らかにする研究を

行った。

## 3. 研究の方法

1) 白血病細胞株から白血病幹細胞様画分を NOG マウスにおける造腫瘍能を指標に分画する。

2) 分画細胞の遺伝子発現をマイクロアレイなどにより網羅的に解析し、マーカーとなる分子を同定する。

3) 白血病幹細胞様画分で亢進 / 抑制されているシグナル伝達系を同定する。

## 4. 研究成果

1) 樹立白血病細胞株の limiting dilution による細胞クローニングおよび NOG マウスでの移植継代という 2 つの方法で、NOG 皮下での造腫瘍性が更新した細胞 (集団) を得ることができた。これらは細胞数 10 個以下でも腫瘍を形成することから、白血病幹細胞様の性質を持つものと考えられた。

2) 上記細胞で発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイなどにより網羅的に検索した。発現変動を示す遺伝子のうち、高造腫瘍性細胞で発現が低下している CADM1 と逆に発現が亢進している CA9、2 つの遺伝子に特に着目し以降の解析を進めた。いずれも細胞表面分子であり治療標的となる可能性があること、また、白血病での機能に関して報告が少ないことから着目した。

3) CADM1 の過剰発現あるいは発現抑制では造腫瘍性に変化が認められないことから、CADM1 が直接造腫瘍性に関与している可能性は低いと考えられた。これは本分子に関するこれまでの報告と異なっており、CADM1 発現制御の新たな側面を示唆している。CADM1 低発現細胞では JAK/STAT シグナル伝達系が亢進しており、これが造腫瘍性亢進に関与していることが推察された。さらに RNA-Seq による解析から、この細胞では EYA2, ETV5, ETS2, WNT10B などの興味深い遺伝子の発現変動が明らかになった。JAK/STAT シグナルとの関連を現在解析している。

4) CA9 の過剰発現により造腫瘍性が亢進し、逆に発現抑制で造腫瘍性が低下したことから、CA9 は白血病細胞の造腫瘍性に関与していることが示された。血球系細胞で本分子の発現は検出できなかったが、リンパ腫の一部症例で発現亢進が認められ、CA9 発現の臨床上の意義が示唆された。

## 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 10 件)

1) Yamaguchi K, Takanashi T, Nasu K, Tamai K, Mochizuki M, Satoh I, Ine S, Sasaki O, Satoh K, Tanaka N, Harigae H, Sugamura K.

Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant

AKT activation.  
Cancer Sci. 2016 Feb 29. doi: 10.1111/cas.12921.

2) Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I.

Identification of TL-Om1, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR for human T-lymphotropic virus 1.

J Clin Microbiol. 2015 53(2):587-96.

3) Shiozaki K, Takahashi K, Hosono M, Yamaguchi K, Hata K, Shiozaki M, Bassi R, Prinetti A, Sonnino S, Nitta K, Miyagi T.

Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration.

FASEB J. 2015 May;29(5):2099-111.

4) Hata K, Tochigi T, Sato I, Kawamura S, Shiozaki K, Wada T, Takahashi K, Moriya S, Yamaguchi K, Hosono M, Miyagi T.

Increased sialidase activity in serum of cancer patients: Identification of sialidase and inhibitor activities in human serum.

Cancer Sci. 2015 Apr;106(4):383-9.

5) Takahashi K, Hosono M, Sato I, Hata K, Wada T, Yamaguchi K, Nitta K, Shima H, Miyagi T.

Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling.

Int J Cancer. 2015 Oct 1;137(7):1560-73. doi: 10.1002/ijc.29527.

6) Yamamoto K, Takahashi K, Shiozaki K, Yamaguchi K, Moriya S, Hosono M, Shima H, Miyagi T.

Potentiation of Epidermal Growth Factor-Mediated Oncogenic Transformation by Sialidase NEU3 Leading to Src Activation.

PLoS One. 2015 Mar 24;10(3):e0120578. doi: 10.1371/journal.pone.0120578.

7) Tamai K, Nakamura M, Mizuma M, Mochizuki M, Yokoyama M, Endo H, Yamaguchi K, Nakagawa T, Shiina M, Unno M, Muramoto K, Sato I, Satoh K, Sugamura K, Tanaka N.

Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma.

Cancer Sci. 2014 Jun;105(6):667-74. doi: 10.1111/cas.12406.

8) Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, Fujiya T, Sato I, Yamaguchi K, Tanaka N, Iijima K, Shimosegawa

T, Sugamura K, Satoh K.

Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer.

PLoS One. 2013 Oct 10;8(10):e77070. doi: 10.1371/journal.pone.0077070.

9) 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, Ishii N.

Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector.

PLoS One. 2013 Aug 21;8(8):e71594. doi: 10.1371/journal.pone.0071594.

10) Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, Satoh K, Matsuura K, Saijo S, Sugamura K, Tanaka N.

CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer.

PLoS One. 2013 Apr 23;8(4):e62002. doi: 10.1371/journal.pone.0062002.

〔学会発表〕(計 19 件)

1) 那須健太郎, 山口壹範, 玉井恵一, 井根省二, 佐々木治, 佐藤賢一, 田中伸幸, 張替秀郎, 菅村和夫: 高造腫瘍能 ATL 細胞における炭酸脱水酵素 IX( CA9 )発現亢進の意義. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

2) 玉井恵一, 中村真央, 小鎌直子, 渋谷莉恵, 望月麻衣, 山口壹範, 菅村和夫, 佐藤賢一, 田中伸幸: BEX2 は静止期がん幹細胞の維持に重要な役割を果たす. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

3) 望月麻衣, 今井隆之, 玉井恵一, 松浦一登, 佐藤賢一, 小鎌直子, 中村真央, 山口壹範, 菅村和夫, 本橋ほづみ, 田中伸幸: 下咽頭癌の悪性化における CD271 の役割. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

4) 三浦康, 島礼, 佐藤賢一, 山口壹範, 田沼延公, 角川陽一郎, 佐藤正幸, 木内誠, 山本久仁治, 長谷川康弘, 河合賢朗, 大沼忍, 藤谷恒明: 大腸癌における天然物を用いた抗がん剤開発の現況. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

5) 方山博路, 玉井恵一, 中村真央, 川村貞文, 栃木達夫, 佐藤郁郎, 山口壹範, 田中伸幸, 荒井陽一, 佐藤賢一: HOTAIR の発現は腎癌進展に関連する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

6) 玉井恵一, 中村真央, 望月麻衣, 小鎌直子, 横山美沙, 山口壹範, 佐藤賢一, 菅村和

夫、田中伸幸：BEX2 は静止期がん幹細胞の維持に重要な役割を果たす。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

7) 望月麻衣、今井隆之、玉井恵一、山口壹範、佐藤賢一、松浦一登、小鎌直子、横山美沙、菅村和夫、田中伸幸：下咽頭癌の浸潤における CD271 の役割。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

8) 横山美沙、白木健悠、田沼延公、玉井恵一、山口壹範、田中伸幸、菅村和夫、佐藤賢一：ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は膀胱癌で高発現し、細胞増殖能を亢進させる。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

9) 白木健悠、横山美沙、田沼延公、玉井恵一、山口壹範、佐藤郁郎、田中信幸、菅村和夫、佐藤賢一：ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は正常胃粘膜で有意に発現しており、その発現増強が胃癌の進展に關与している。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

10) 田中伸幸、今井隆之、望月麻衣、玉井恵一、山口壹範、佐藤賢一、佐藤郁郎、松浦一登、西條茂、菅村和夫：PDX モデルを用いた CD271 陽性頭頸部癌幹細胞の解析。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

11) 宮城妙子、高橋耕太、細野雅祐、塩崎一弘、山口壹範：シアリダーゼはがんの発がん過程と進展に關与する。第 73 回日本癌学会学術総会，横浜，2014.9

12) 山口壹範、玉井恵一、佐藤賢一、井根省二、佐々木治、田中伸幸、菅村和夫：免疫不全 NOG マウスを用いた高造腫瘍性 ATL 細胞の単離。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

13) 玉井恵一、中村真央、望月麻衣、小鎌直子、山口壹範、横山美沙、佐藤賢一、菅村和夫、田中伸幸：BEX2 は胆管癌細胞株においてがん幹細胞様の性質を制御する。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

14) 今井隆之、玉井恵一、山口壹範、佐藤郁郎、佐藤賢一、松浦一登、西條茂、菅村和夫、田中伸幸：下咽頭癌における新規がん幹細胞表面マーカー"CD271"の同定。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

15) 白木健悠、田沼延公、玉井恵一、佐藤郁郎、山口壹範、田中伸幸、菅村和夫、佐藤賢一：ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は胃癌の進展に關与している。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

16) 虻江誠、濱田晋、玉井恵一、田中伸幸、山口壹範、菅村和夫、佐藤郁郎、佐藤賢一：膀胱癌における血漿中 miR-483-3p の発現解析。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

17) 高橋耕太、細野雅祐、和田正、山口壹範、仁田一雄、宮城妙子：シアリダーゼ NEU3 による Wnt シグナルを介した大腸がん細胞の造腫瘍能制御機構。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013.10

18) 宮城妙子、高橋耕太、細野雅祐、山本晃司、和田正、秦敬子、森谷節子、塩崎一弘、山口壹範、仁田一雄：シアリダーゼ NEU3 によるがん化能の制御。第 32 回日本糖質学会年会，大阪，2013.8

19) Takahashi, K., Hosono, M., Hata, K., Wada, T., Yamaguchi, K., Nitta K., Miyagi, T. : Plasma membrane-associated sialidase NEU3 confers neoplastic potential on colon cancer cells by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. GLYCO22, Dalian, China, 2013.6

〔図書〕(計 2 件)

1) Miyagi T., Takahashi K., Shiozaki K., Yamaguchi K.: Mammalian Sialidase Assays. *Glycoscience: Biology and Medicine* (Eds. Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H.) Springer pp1395-1402, 2014

2) Miyagi T, Takahashi K, Shiozaki K, Yamaguchi K.: Mammalian sialidase and tumor development. *Sugar Chains* (Eds. Suzuki T., Ohtsubo K., Taniguchi N.) Springer pp159-176, 2015

〔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

<http://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/hatugan-seigyoo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅村 和夫 (KAZUO SUGAMURA)

宮城県立がんセンター研究所 発がん制御研究部 特任部長

研究者番号：20117360

### (2) 研究分担者

佐々木 治 (OSAMU SASAKI)

宮城県立がんセンター研究所 発がん制御研究部 特任研究員

研究者番号：40538055

山口 壹範 (KAZUNORI YAMAGUCHI)  
宮城県立がんセンター研究所 発がん制  
御研究部 上席主任研究員  
研究者番号：80373215

(3)連携研究者  
該当なし