

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790910

研究課題名（和文） Spred-1 の機能に着目した造血幹細胞及び白血病幹細胞ニッチの解析

研究課題名（英文） Analysis of hematopoietic stem cell and leukemic stem cell niche by focusing on Spred-1 functions

研究代表者

田所 優子 (TADOKORO YUKO)

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：00447343

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、造血幹細胞と白血病幹細胞およびそれらのニッチについての相違点を理解することを目的としている。そのために Spred-1 ノックアウト造血幹細胞および白血病発症モデルマウスを用いて競合的骨髄移植法による解析を行なった。その結果、造血幹細胞と白血病幹細胞はよく似た表面マーカー・多分化能を示し、また一時的にニッチにおいて競合していることが示唆された。しかし、有意差を持って白血病発症マウスをレスキューすることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research project is to understand both the similarities and differences between hematopoietic stem cells and leukemic stem cells and their niches. I have carried out competitive repopulation assay using Spred-1 knockout and leukemia-developed mouse bone marrow cells. Leukemic stem cells showed cell surface marker phenotype and multipotency similar to that of hematopoietic stem cells. Furthermore, competitive repopulation assay with Spred-1 knockout bone marrow cells suggested that both stem cells might compete in their sharing niches. However, Spred-1 knockout cells could not significantly rescue the leukemia-developed mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：幹細胞生物学

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：幹細胞, 白血病幹細胞, 幹細胞ニッチ, がん

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞を標的とした再生医療や癌の発生・治療の研究を進めていくためには、組織幹細胞の特性や維持・増殖・分化の制御機構について理解する必要がある。そのためには、幹細胞ニッチ（幹細胞の維持・増殖・分化を制御している微小環境）の実体とそこから受

けた刺激に対する幹細胞側の分子レベル・細胞レベルでの応答を理解しなければならない。また最近では白血病にも白血病幹細胞とそのニッチが存在することが多くのレポートから示唆されている。

まず組織幹細胞に関して、造血幹細胞は様々な組織に存在する組織幹細胞の中でも最も純化することが可能であり、また移植実

験により定量的に造血幹細胞の数や能力を解析することができるという利点がある。そこで白血病細胞にも白血病幹細胞が存在するのであれば、造血幹細胞との比較によりその存在が明らかにすることができ、またその相違点を見ることにより白血病幹細胞の特質について理解することができると期待される。

さらに幹細胞ニッチに関して、白血病幹細胞においてもニッチが存在するのか、存在するのであれば正常造血幹細胞のニッチと場所や外的刺激・シグナルなどにおいて共有している部分があるのかどうか、という疑問について未だ十分に理解されていない。このことは白血病幹細胞を細胞生物学的に理解し、また白血病幹細胞を治療の標的とするうえで重要な解決すべき問題であると考えられる。

本研究代表者は、これまでに幹細胞ニッチとの強い親和性を示す Spred-1 ノックアウト造血幹細胞の解析を行ってきた。Spred-1 (*Sprouty-related EVH1 domain protein*) とは、c-Kit レセプター・チロシンキナーゼに会合する分子で様々な成長因子やサイトカインの刺激によって活性化される細胞内 Ras/Raf/ERK シグナル経路を抑制する因子として発見された分子である (*Nature* 412, p647, 2001)。最近ではヒトにおいて *SPRED1* に変異を持つ家系が存在することが報告されたことから (*Nature Genetics* 39, p1120, 2007)、神経線維腫症 1 型のような NCF1 (Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous) 症候群の新たな原因遺伝子の 1 つとして注目されている。研究代表者は、この Spred-1 ノックアウト造血幹細胞を用いることによって、白血病幹細胞ニッチと正常造血幹細胞ニッチとの相違点について明らかにできるのではないかと考えた。

さらにこのようなニッチに対する考え方から、Spred-1 ノックアウト造血幹細胞の白血病幹細胞との競合以外に正常造血幹細胞との競合が考えられる。造血幹細胞移植治療法を適用する疾患は、白血病以外にも先天性の遺伝病なども存在する。このような患者さんは、移植の前処置として造血幹細胞を生着させるために大量の放射線を浴びなければならない。このように、造血幹細胞移植を成功させるためだけに本来受ける必要のないダメージを受けなければならない。また白血病に対する移植治療においても、最近ではミニ移植と呼ばれる、なるべく前処置を軽くするために放射線照射量を低くしようとする試みや放射線照射を行わずに薬剤処置のみにおいて骨髄移植を行なう試みがなされている。Spred-1 ノックアウト造血幹細胞は正常造血幹細胞とも競合することから、研究代表者はこの Spred-1 ノックアウト造血幹細胞

を応用することによって前処置を軽減した移植法が可能になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究はまず、白血病において幹細胞として振舞うような細胞を同定し、正常造血幹細胞との間の表面マーカー・特質などについて相違点を明らかにする。そして幹細胞としての能力の有無について、正常造血幹細胞と比較を行ないながら検討を行なう。さらに白血病幹細胞のニッチを探索することを目的として、正常造血幹細胞の骨髄ニッチに対して強い親和性を持つ Spred-1 ノックアウト造血幹細胞を用いてその分子メカニズムを解明し、Spred-1 ノックアウト造血幹細胞の表現型を利用して造血幹細胞ニッチと白血病幹細胞ニッチの共通性の有無について明らかにすることを旨とする。さらに Spred-1 ノックアウト造血幹細胞の表現型を応用し、前処置を軽減した移植法の可能性について検討を行なうことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【使用するマウス】

#### ・白血病発症モデルマウス (1)

正常 C57BL/6 マウスの骨髄から CD34-KSL 細胞を FACS で採取し、レトロウイルス感染により MSCV-HoxA9-Meis1 を強制発現させる。数日培養した後マウスに移植し、急性骨髄性白血病を発症させる。

#### ・白血病発症モデルマウス (2)

正常 C57BL/6 マウスの骨髄から CD34-KSL 細胞を FACS で採取し、レトロウイルス感染により MSCV-BCR-ABL-IRES-GFP を強制発現させる。数日培養した後マウスに移植し、慢性骨髄性白血病を発症させる。

#### ・白血病発症モデルマウス (3)

Pten (flox); Mx1Cre コンディショナルノックアウトマウスに polyI:polyC を投与して Pten 遺伝子を欠損させ、一か月ほどで白血病を発症させる。

#### ・Spred-1 ノックアウトマウス

### 【競合移植解析】

・急性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から c-Kit 陽性細胞を採取し、細胞数を振って別の放射線照射マウスに移植する。この時、

一定数の Spred-1 野生型およびノックアウトマウス骨髄細胞を同時に移植する。移植後、経時的に末梢血を解析し、骨髄細胞解析、継代移植を行なう。

・慢性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から GFP 陽性/CD34-KSL 細胞および GFP 陽性/CD34+KSL 細胞を採取し、細胞数を振って別の放射線照射マウスに移植する。この時、一定数の野生型マウス骨髄細胞を同時に移植する。移植後、経時的に末梢血を解析し、骨髄細胞解析、継代移植を行なう。

・Pten コンディショナルノックアウトマウスから骨髄細胞を採取し、Spred-1 野生型およびノックアウトマウス骨髄細胞とミックスして移植する。この時、細胞混合比をいくつかの条件で変えて行なう。移植後マウスに polyI:polyC を投与し、Pten 遺伝子を欠損させる。polyI:polyC の投与時期は、移植後 1 週間後あるいは 8 週間後で検討を行なった。移植後、経時的に末梢血を解析し、マウスの生存率、骨髄細胞解析を行なった。

#### 【in vitro コロニー解析】

慢性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から GFP 陽性/CD34-KSL 細胞および GFP 陽性/CD34+KSL 細胞を採取し、メチルセルロース培地において 2 週間培養を行なう。コロニーの細胞数・大きさを調べる。またコロニーをピックアップし、サイトスピン、メイ・ギムザ染色を行ない、顕微鏡下にて各コロニーの分化パターンを解析する。

#### 【低放射線量照射前処置マウスへの移植】

C57BL/6-Ly5.2 マウスに 0, 1, 2, 3 Gy の放射線を照射し、Spred-1 野生型およびノックアウトマウス骨髄細胞を移植する。移植後、経時的に末梢血を解析し、骨髄細胞解析を行なう。

## 4. 研究成果

#### 【HoxA9-Meis1 強制発現により発症した急性骨髄性白血病細胞のニッチ解析】

急性骨髄性白血病をモデルとして急性骨髄性白血病細胞と Spred-1 欠損造血幹細胞との競合的移植解析を行なった。

まず、造血幹細胞を起源として急性骨髄性白血病を発症するマウスを作製することを試みた。造血幹細胞が高頻度に含まれる正常マウスの CD34-KSL 細胞を採取し、この細胞に HoxA9-Meis1 を強制発現させ、これら細胞と Spred-1 欠損あるいは野生型骨髄細胞を競合移植した。その結果、野生型骨髄細胞を

移植したマウスに比べ Spred-1 欠損骨髄細胞を移植したマウスで急性骨髄性白血病発症の遅延や白血病細胞の末梢血細胞数・骨髄内キメリズムの上昇を一時的に抑えているマウスが観察されたが、有意な差を見出すことは出来なかった。続いて急性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から急性骨髄性白血病幹細胞が含まれていると考えられる c-Kit 陽性細胞を採取し、Spred-1 欠損あるいは野生型骨髄細胞と共に様々な細胞数で競合移植を行なった。この実験においても、一次移植の時と同じく発症の遅延や白血病細胞の末梢血細胞数・骨髄内キメリズムの上昇を一時的に抑えているマウスが観察されたものの、有意な差を見出すことは出来なかった。原因として、急性骨髄性白血病を発症したマウスにおいて血液の症状を抑制しても肺や脾臓への白血病細胞の浸潤が激しく、マウス個体が持ちこたえることができなくなっていることが考えられた。

#### 【BCR-ABL 強制発現により発症した慢性骨髄性白血病細胞のニッチ解析】

慢性骨髄性白血病をモデルとして慢性骨髄性白血病細胞と Spred-1 欠損造血幹細胞との競合的移植解析を行なった。

まず、造血幹細胞を起源として慢性骨髄性白血病を発症するマウスを作製することを試みた。造血幹細胞が高頻度に含まれる正常マウスの CD34-KSL 細胞を採取し、この細胞に BCR-ABL-IRES-GFP を強制発現させ、まずはこれら細胞をマウスに移植して慢性骨髄性白血病発症マウスを作製した。続いてこの慢性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から慢性骨髄性白血病幹細胞が含まれていると考えられる GFP 陽性/CD34-KSL 細胞および GFP 陽性/CD34+KSL 細胞を採取し、まずは慢性骨髄性白血病再構築能について確認するために野生型骨髄細胞と共に様々な細胞数で競合移植を行なった。この移植実験の結果、GFP 陽性/CD34-KSL 細胞では長期間にわたって正常な造血を行なうことが観察されたが慢性骨髄性白血病を発症する割合が非常に低かった。一方 GFP 陽性/CD34+KSL 細胞では多分化能に欠けるものが多く、長期の造血を行なうものは少数であった。しかし移植細胞数を増やした場合、白血病を発症するマウスが観察された。これらの結果から、今回用いた BCR-ABL 強制発現系による慢性骨髄性白血病モデルでは安定した慢性骨髄性白血病再構築系を確立することができなかつたため、今後慢性骨髄性白血病モデルの再検討が必要とされる。

#### 【Pten 遺伝子欠損により発症した慢性骨髄性白血病細胞のニッチ解析】

白血病自然発症モデルとして Pten 欠損マ

ウス骨髄細胞と Spred-1 欠損骨髄細胞との競合的移植解析を行なった。実験デザインとして、Pten コンディショナルノックアウトマウス骨髄細胞と Spred-1 欠損骨髄細胞および野生型骨髄細胞の混合比を変えて移植を行なった場合、Pten 遺伝子欠損のための polyI:polyC 投与の時期を変えた場合、の検討を行なった。その結果、Spred-1 欠損骨髄細胞により Pten 欠損骨髄細胞由来の白血病を抑えたマウスが観察されたが、長期間の観察では Pten 欠損細胞由来のリンパ腫を発症するマウスが多く、生存率において有意な差を見出すことができなかった。しかし白血病を抑えたマウスでは、骨髄中の細胞はすべて Spred-1 欠損細胞に置き換わっていた。このことは、タイミングや条件を整えることによって Spred-1 欠損造血幹細胞が白血病を起こしうる細胞を追い出す可能性があることを示唆している。

【BCR-ABL 強制発現により発症した慢性骨髄性白血病細胞における白血病幹細胞の特質の解析】

慢性骨髄性白血病細胞の未分化な細胞画分である GFP 陽性/CD34-KSL 細胞と GFP 陽性/CD34+KSL 細胞に関して、正常造血幹細胞画分 CD34-KSL 細胞と前駆細胞画分 CD34+KSL 細胞との間でそれぞれ比較を行なった。

造血幹細胞が高頻度に含まれる正常マウスの CD34-KSL 細胞を採取し、この細胞に BCR-ABL-IRES-GFP を強制発現させ、まずはこれら細胞をマウスに移植して慢性骨髄性白血病発症マウスを作製した。続いてこの慢性骨髄性白血病を発症したマウス骨髄から GFP 陽性/CD34-KSL 細胞および GFP 陽性/CD34+KSL 細胞を採取した。

移植実験による機能解析では、前述のように GFP 陽性/CD34-KSL 細胞で長期の骨髄再構築能が認められた。しかしながら、慢性骨髄性白血病の再構築能は低く、また骨髄再構築能も正常 CD34-KSL 細胞に比べて低い傾向があった。

In vitro コロニー解析では、GFP 陽性/CD34-KSL 細胞の方が GFP 陽性/CD34+KSL 細胞に比べて多分化能を維持している傾向があった。

【低放射線量照射前処置マウス移植法の検討】

Spred-1 欠損造血幹細胞を用いた移植においてレシピエントに対する前処置軽減の検討に関して、低放射線量の照射処置での移植を試みた。その結果、0 Gy, 1Gy の処置では生着できなかったものの、2 Gy, 3Gy においては Spred-1 欠損骨髄細胞で野生型に比べ優位に移植効率が上昇した。このことから、Spred-1 の機能抑制は造血幹細胞移植におい

て有効な手段として利用できることが期待された。

## 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3件)

① Shintaro Tanimura\*, Yuko Tadokoro(\*co-first author), Ken Inomata, Nguyen Thanh Binh, Wataru Nishie, Satoshi Yamazaki, Hiromitsu Nakauchi, Yoshio Tanaka, James R. McMillan, Daisuke Sawamura, Kim Yancey, Hiroshi Shimizu, and Emi K. Nishimura (2011). Hair Follicle Stem Cells Provide a Functional Niche for Melanocyte Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 8 (2), 177-187, 査読有.

② Teruyuki Muraguchi, Shingo Tanaka, Daisuke Yamada, Akira Tamase, Mitsutoshi Nakada, Hideo Nakamura, Takayuki Hoshii, Takako Ooshio, Yuko Tadokoro, Kazuhito Naka, Yasushi Ino, Tomoki Todo, Jun-ichi Kuratsu, Hideyuki Saya, Jun-ichiro Hamada, and Atsushi Hirao (2011). NKX2.2 Suppresses Self-Renewal of Glioma-Initiating Cells. *Cancer Research*, 71 (3), 1135-1145, 査読有.

③ Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii, Teruyuki Muraguchi, Yuko Tadokoro, Takako Ooshio, Yukio Kondo, Shinji Nakao, Noboru Motoyama & Atsushi Hirao (2010). TGF- $\beta$ -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 463, 676-680, 査読有.

〔学会発表〕(計1件)

① Yuko Tadokoro, Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1., USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, 2011年2月26日, 湘南国際村センター(神奈川県)

〔図書〕(計1件)

① 田所 優子, 西村 栄美, 最新医学社, “幹細胞研究の最近の進歩(後篇) 組織幹細胞「毛包における幹細胞とそのニッチ」” 2009年, 157 (1391)頁~169 (1403)頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 優子 (TADOKORO YUKO)  
金沢大学・がん研究所・助教  
研究者番号：00447343

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし