

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15365

研究課題名(和文) 骨髄ニッチを最適化した異種移植アッセイによる新規がん幹細胞アッセイ系の確立

研究課題名(英文) Cancer stem cell assay by a new immunodeficient mouse model Cancer stem cell assay by a new immunodeficient mouse model harboring with optimal bone marrow microenvironment

研究代表者

赤司 浩一 (Akashi, Koichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80380385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞研究には、がん幹細胞同定のためのアッセイ系の確立が必要である。これまでに T、B 細胞を欠損した免疫不全マウスが開発され、異種移植を用いたがん幹細胞研究にも応用されてきたが、造血系腫瘍の一部や固形がんの生着効率が低く、がん幹細胞研究にはさらなる改良が必要であった。我々は、免疫不全マウスへのヒト細胞の生着には、リンパ球欠損に加えて、マクロファージ寛容が必要であることを見だし、さらに骨髄微小環境をヒト細胞の正着に最適化した BRGhSK ラインを樹立した。このマウスは、ヒト細胞の生着効率が著しく改善し、今後のがん幹細胞研究に有用である。

研究成果の概要(英文)：To evaluate human cancer stem cells in xenotransplantation models, a variety of immunodeficient mouse lines have been developed. We found that in xenograft engraftment, inhibition of phagocytic reaction of mouse macrophages is essential in addition to lymphoid depletion. Here, we have established a new immunodeficient BRGhS mouse line, harbouring a complete macrophage tolerance. Furthermore, we introduced KITW/v mutation into BRGhS line to optimize mouse bone marrow microenvironment for human cell engraftment. This strain should be very useful for human cancer stem cell assay.

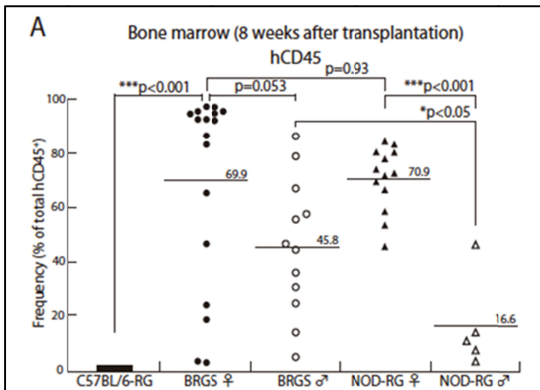
研究分野：血液内科

キーワード：がん幹細胞 異種移植アッセイ 免疫不全マウス マクロファージ SIRPA 骨髄ニッチ

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞研究を進めるためには、幹細胞同定のためのアッセイ系の確立が必須である。これまで、ヒト造血幹細胞のアッセイ系では T、B 細胞を欠損した NOD-*scid* マウスを基本として、さらに免疫不全のための修飾を加えた重症免疫不全マウスを用いた異種移植系が開発されてきた。*Il2rg* をノックアウトした NOD-*scid Il2rg^{null}* (NOG/NSG) ストレインでは、ヒト造血細胞の生着効率が著しく改善されたが、急性白血病以外の造血器腫瘍や固形癌では十分な生着が得られない。したがって、さらに生着効率を高めた汎用性の高いラインの樹立が必要である。我々は、NOD ライン特有の異種移植寛容の原因が *Sirpa* 多型にあることを突き止めた。NOD では、マクロファージ系の貪食細胞の表面に発現する変異 SIRPA がヒト細胞上の CD47 と結合できることで、貪食シグナルを抑制し、拒絶を回避する (Nat Immunol 2007)。NOD 型 SIRPA と異なり C57/BL6 型 SIRPA はヒト CD47 と結合しない。そこで、C57/BL6 バックグラウンドで *Rag2* および *Il2rg* を欠損した C57/BL6.*Rag2^{null}Il2rg^{null}* マウスに、NOD 型 SIRPA 変異を導入した免疫不全マウス (BRGS) を作製した。このマウスにおいては、良好な異種細胞生着能力に加え、さらに C57/BL6 ラインのため高い生存・繁殖能力が見られ、さらに NOG マウスより良好なヒト造血幹細胞の異種移植効率が得られた (Blood 2013) (図 A)。この結果は、CD47-SIRPA 結合の強化によって、さらにヒト細胞の生着高率の改善が期待できることを示している。

ヒトがん幹細胞においては、ヒト CD47 の発現が著しく上昇していることが報告されており、ヒトがん幹細胞の異種移植効率を高める上でマクロファージ寛容の誘導が特に重要であること、また、骨髓ニッチを開放することで、既存のマウスではアッセイ不可能であった造血器腫瘍幹細胞の生着効率が著しく改善することが予想される。本研究で開



発する骨髓ニッチを最適化した次世代免疫不全マウスラインを用いれば、がん幹細胞の同定感度の飛躍的向上が期待できる。さらに、がん幹細胞の生体内での挙動がより詳細に解析可能であるため、がん幹細胞の特性や転

移メカニズムの解明に貢献できる。本研究では、以上の基礎的解析技術を確立する。本研究は、ヒトがん幹細胞研究および新規治療法開発、さらに広くヒト幹細胞研究全般に大きな貢献を果たすことができる。

2. 研究の目的

がん克服へ治療標的として、「がん幹細胞」が注目を集めている。がん幹細胞とは、自己複製能力と未分化性の維持能力を新たに獲得した悪性幹細胞であり、腫瘍の源である。国民の死因の約半分を占める難治性悪性腫瘍の治療成績の向上には、がん幹細胞自身を標的とした新規治療法の開発が求められている。そのためには、1)がん幹細胞の純化、2)その純化したがん幹細胞の生体内での機能、を解析する必要がある。この解析のために必須の基本技術が、高度免疫不全マウスを用いた異種移植アッセイシステムである。本研究では、より広いがん種におけるがん幹細胞の同定とその根絶法の開発を可能にする技術基盤確立のために、「完全マクロファージ寛容」「骨髓ニッチオープン化」導入により、マウス骨髓微小環境を改変し、既存の移植効率を大幅に上回る次世代免疫不全マウスを開発する。

がん幹細胞を標的とする新規治療法開発のためには、がん幹細胞を高効率にアッセイする方法の確立が必須である。我々が提唱する「SIRPA-CD47 を介したマクロファージ寛容」「骨髓ニッチのオープン化」は、異種移植の理論構築を新展開させた極めて独創的な発想であり、これをマウス生体内に積極的に導入することで、がん幹細胞の同定感度の飛躍的な上昇が期待できる。本課題の成果により、ヒト造血幹細胞学のみならず、がん幹細胞のアッセイにきわめて有用なモデルを提供することが可能となり、その臨床応用への検討に大きく貢献することができる。さらに、このマウスラインを用いれば、ヒト iPS や、ヒト iPS からの分化誘導実験、各臓器におけるヒトの正常幹細胞の同定や機能評価、ヒト細胞の *in vivo* における薬剤感受性試験などに利用可能であり、再生医療・分子標的治療・遺伝子治療分野の基礎的研究成果の実地医療への応用を検討する際に、必須の異種移植実験系としての重要性が極めて高い実験系を提供可能となる。以上のように本研究課題を通じて、ヒトがん幹細胞研究および新規治療法開発のみならず、広くヒト幹細胞研究分野における基盤技術の整備に貢献することが、本研究課題の最終的な目標である。

3. 研究の方法

高効率な癌幹細胞アッセイのための次世代異種移植モデルを確立する。C57/BL6 ストレインに、*Rag2* 欠損、*Il2rg* 欠損を導入してマウスリンパ球分化を完全遮断し、ヒト型 SIRPA 遺伝子をノックイン、さらに *Kit^{Wv}* 変異を挿入し、完全マクロファージ寛容と骨髓

ニッチオープン化を導入したマウスラインを樹立する。

(1)BRGS マウスへの完全マクロファージ寛容と c-Kit 変異の導入

免疫不全マウスの改良によるホスト側の問題点の改善と、腫瘍性幹細胞分画の高度な純化法の確立により、これまで異種移植系でのアッセイが困難であった腫瘍において、機能的腫瘍性幹細胞分画の純化、同定を行う。

これまで、ヒト造血幹細胞のアッセイ系のために開発された重症免疫不全マウスは、いずれも T、B 細胞を欠損した NOD-scid マウスを基本として、さらに免疫不全のための修飾を加えたものである。Il2rg をノックアウトした NOD-scid Il2rg^{nu1} (NOG/NSG) ストレインが現在標準的に用いられているが、急性白血病以外の腫瘍の再構築は困難である。

我々は、NOD ライン特有の異種移植寛容の原因が Sirpa 多型にあることを突き止めた。NOD では、マクロファージ系の貪食細胞の表面に発現する変異 SIRPA がヒト細胞上の CD47 と結合できることで、貪食シグナルを抑制し、拒絶を回避可能である (Nat Immunol 2007)。NOD 型 SIRPA と異なり C57/BL6 型 SIRPA はヒト CD47 と結合しない。そこで、まず C57/BL6 バックグラウンドで Rag2 および Il2rg を欠損した C57/BL6. Rag2^{nu1} Il2rg^{nu1} マウス (BRGS) に、NOD 型 SIRPA 変異を導入した免疫不全マウスを作製した。この BRGS マウスにおいては、T 細胞の leak がなく、良好な異種細胞生着能力に加え、高い生存・繁殖能力が見られ、さらに NOG マウスより良好なヒト造血幹細胞の異種移植効率が得られた (Blood 2013)。この結果は、CD47-SIRPA 結合の強化によって、さらにヒト細胞の生着高率の改善が期待できることを示している。この BRGS マウスラインをベースに、完全ヒト型 SIRPA の導入を行う。ヒト型 SIRPA ノックインマウスはすでに作製済みであり、BRG マウスと交配して、ヒト型 SIRPA ノックイン BRG マウス (BRGhS) を樹立する。さらに骨髓ニッチオープン化のために、Kit^{Wv} 変異を挿入する。C57BL/6. Kit^{Wv/+} マウスはすでに入手済みである。BRGhS マウスとの交配を行い、初年度中に、最終目的である BRGhS-Kit^{Wv/Wv} マウスの樹立を目指す。この新規ラインは、これまで再構築困難であった腫瘍を高効率にマウス内に再構築可能な非常に強力なツールになる。

(2)次世代免疫不全マウスラインの確立と固形がん幹細胞の至適異種移植法の確立

新規ラインの確立、バッククロスなど作製には時間がかかるため、平成 28 年度以降も引き続いてラインの確立を継続する。

現在の固形がんの異種移植アッセイでは、分離した幹細胞分画は、皮下投与で移植されるが、生着効率が低く、詳細な幹細胞分画の同定が困難であった。本課題で樹立するマウスラインでは、ヒト移植片に対して完全なマクロファージ寛容が成立しており、幹細胞分画を皮下投与しても、マウス皮下に存在するマ

クロファージによって拒絶されることなく、高効率な生着が期待できる。BRGS ラインでは、右図のように肺癌、大腸癌の細胞株のほか、大腸癌の臨床サンプルの生着が得られている。当該年度では、造血器腫瘍のほか、大腸がん、乳がんなど広く悪性腫瘍組織より FACS Aria SORP を用いて高純度に細胞分画を分離した、静注、骨髓内、新生仔マウス顔面静脈、皮下などの投与経路で移植し、マウスでの腫瘍再構築能を検証し、至適移植法の確立とともに固形がんにおける幹細胞分画の高度純化を目指す。

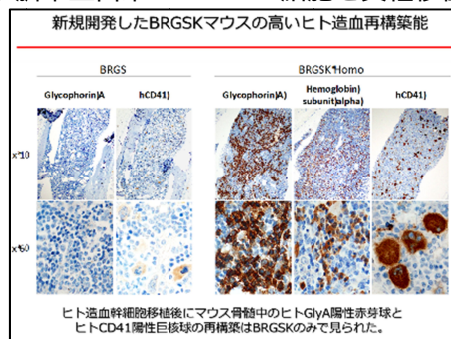
(3)腫瘍幹細胞のプロファイリングと治療標的分子の探索

前述のようにヒト型マクロファージ寛容導入・骨髓ニッチオープン化導入新規免疫不全マウスによる異種移植システムの改良によって、腫瘍性幹細胞の同定とともに、その機能解析を行い、さらに純化した腫瘍性幹細胞のプロファイリングを行う。純化した腫瘍性幹細胞の解析には、マイクロアレイによる mRNA および microRNA の発現プロファイルなどを行う。異種移植アッセイによる機能的幹細胞分画の純化と、スモールスケールでの新規プロファイリング解析系を組み合わせることにより、幹細胞の腫瘍化や病期進行に鍵となる遺伝子・転写因子の抽出から腫瘍化メカニズムを解明するとともに、腫瘍性幹細胞特異的に発現する治療表面分子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) BRGS-Kit^{Wv/Wv} ラインの樹立

免疫不全マウスを用いた異種移植モデルでは、ヒト造血細胞をマウスに移植することにより、マウス内にヒト造血を再構築することが可能である。しかし、既存の免疫不全マウスでは、マウス内のヒト造血が B 細胞に偏ること、ヒト赤血球や血小板の産生が殆どみられないことが課題として残っている。本研究では、Kit^{Wv} ホモ変異を免疫不全マウスに導入することにより、ヒト造血細胞の多系統への再構築能が飛躍的に向上することを見いだした。我々は、BRGS マウスに Kit^{Wv} ホモ変異を導入した C57BL/6. Rag2^{nu1} Il2rg^{nu1} NOD-Sirpa Kit^{Wv/Wv} (BRGSK^{Wv/Wv}) マウスを新規樹立した。ヒト臍帯血由来 CD34⁺CD38⁻ 細胞を異種移植後、

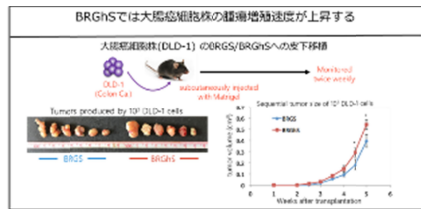
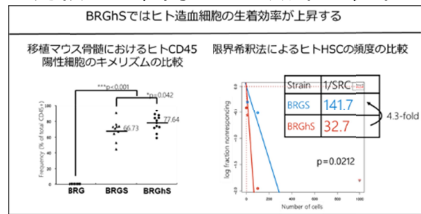


BRGSK^{Wv/Wv} マウスでは、BRGS マウスと比較して

有意に高いヒト細胞の生着効率および長期にわたる多系統の造血細胞の再構築を認められた。最も特筆すべき点は、マウスの骨髄において最終分化を伴うヒト赤血球・血小板造血が顕著に認められた点である。さらに、クロドロン酸投与によりマウスマクロファージを除去すると、骨髄から末梢血へヒト赤血球・血小板の動員が認められた。本研究結果は、*Kit^{flv}*変異によるマウス KIT シグナルの減弱により、ヒト造血幹・前駆細胞 (HSPC) がマウス HSPC をマウス骨髄至適微小環境から競合排除することによって、多系統への分化能が得られたことを示している。BRGSK^{flv/flv} マウスモデルは、赤血球・血小板を含む多系統にわたるヒト造血の研究に極めて有用なレシピエントマウスとして応用可能である。

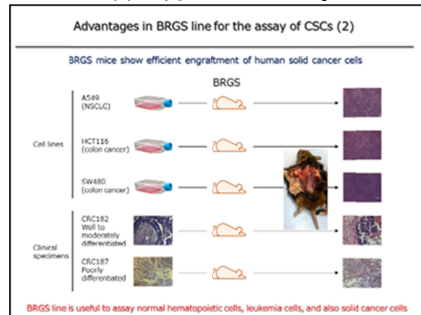
(2) BRGhS ラインの樹立

樹 BRGS にヒト SIRPA をノックインした BRGhS ラインも樹立しており、下記に示すように、BRGS に比較して、高い PDX 効率と、末梢でのマクロファージの完全寛容により、皮下移植した大腸癌細胞株の増殖速度の亢進が得られている。今後は、BRGSK と BRGhS を交配し、次世代 PDX モデルの完成形である BRGhSK の樹立とラインの拡大を行う。



(3) 固形がん幹細胞の至適異種移植法の確立と薬効評価に関する有用性について

我々の樹立した BRGS ラインでは、下図のように肺癌、大腸癌の細胞株のほか、大腸癌の臨床サンプルの生着が得られている。これらは、皮下への移植であるが、完全マクロファージ寛容が得られている



BRGhS ラインでは、

同様の移植法でも、移植効率は著しく改善していることが予想され、今後、指摘移植経路を含めて検討予定である。

さらに、腫瘍性幹細胞特異的に発現する治療表面分子の同定を試みる予定である。NOD バックグラウンドは、C5 欠損により補体活性が著しく低下しているため、抗体製剤の補体依存性細胞障害作用の薬効評価が極めて困難であるが、BRGS ラインは、正常補体活性を有

し、抗体製剤の補体依存性細胞障害作用の薬効評価にも有用である。本課題で樹立したラインも正常補体活性を有するため、樹立したラインを用いて、がん幹細胞アッセイのみでなく、効率的 in vivo スクリーニングモデルとして有効である。下図に示すように NOD ベースの NOD-RG マウスには、補体 C5 が欠損しているため、CDC 活性のある anti-CD20 抗体 Rituximab を用いても、移植した Raji 細胞をほとんど殺すことができない。一方、BRGS マウスにおいては速やかに Raji 細胞が除去される。すなわちある抗原に対する抗体の薬効評価 (Proof of concept) のために、BRGhS マウスは極めて有用である。

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 160 件)

Uryu H, 以下 14 名, 14 番目. Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. Blood 125: 3014-3023, 2015.

Kiyasu J, 以下 16 名, 14 番目. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood 126: 2193-2201, 2015.

Kikushige Y, 以下 11 名, 12 番目. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. Cell Stem Cell 17: 341-352, 2015.

Daitoku S, 以下 13 名, 14 番目. Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. Exp Hematol 44: 817-825, 2016.

Yurino A, 以下 12 名, 13 番目. Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with Kit(Wv) Mutations. Stem Cell Reports 7: 425-438, 2016.

Tsuzuki H, 以下 12 名, 13 番目. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. Immunology. 150: 64-73, 2017.

Miyawaki K, 以下 19 名, 20 番目. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. Blood. 129: 3332-3343, 2017.

Mizuno S, 以下 5 名, 6 番目. Notch1

expression is regulated at the post-transcriptional level by the 3 untranslated region in hematopoietic stem cell development. Int J Hematol. 107: 311-319, 2017.

Yuda J, 以下 10 名, 11 番目. Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. Cancer Sci. 108: 2204-2212, 2017

Kawamura S, 以下 10 名, 10 番目. Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. Immunity. 46: 835-848, 2017.

〔学会発表〕(計 12 件)

赤司 浩一「ヒト白血病幹細胞研究の進歩」第 20 回日本がん分子標的治療学会 学術集会、2016 年 5 月 31 日、別府国際 コンベンションセンター B-CON PLAZA、別府

Koichi Akashi「A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression」THE 41st 1NAITO CONFERENCE、2016 年 7 月 6 日、SAPPORO, Japan

Koichi Akashi「TIM-3 and Its Ligand, Galectin-9, Constitute an Autocrine Loop Universally Critical for Development of Human Myeloid Leukemia Stem Cells」JCA-AACR Special Joint Conference、2016 年 7 月 14 日、Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort

赤司 浩一「TIM-3/Galectin-9 axis is a potential therapeutic target for human myeloid leukemia stem cells」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2016 年 7 月 29 日、神戸展示場・神戸国際会議場

赤司浩一「ヒト骨髄性白血病に共通する悪性幹細胞の自己再生メカニズム」The 47th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund、2016 年 11 月 8 日、東京、パレスホテル

赤司浩一「がん幹細胞研究の進歩と治療開発」第 114 回日本内科学会総会・講演会 2017 年 4 月 15 日、東京

赤司浩一「骨髄性白血病幹細胞成立における TIM-3/Gal-9 オートクラインシグナルの役割」第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 29 日、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
赤司 浩一 (Akashi Koichi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80380385

(2) 研究分担者 ()
研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号：

(4) 研究協力者 ()