

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390280
 研究課題名 (和文) NOG マウスを用いた遺伝子挿入変異による白血病発症の予知と遺伝子治療安全性の確保
 研究課題名 (英文) Leukemogenesis due to insertional mutagenesis - a NOG mouse model -

研究代表者
 土屋 滋 (TSUCHIYA SHIGERU)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：30124605

研究成果の概要 (和文)：我々は、超免疫不全マウス (NOG マウス) におけるヒト造血再構築系 (ヒト化マウス) が、遺伝子治療の白血病予知や安全性確保のための前臨床モデルとなり得るかを考察した。LMO2 などの癌遺伝子を導入されたヒト造血幹細胞は、NOG マウス内にて一過的にリンパ球分化異常や増殖優位性などを示すも、白血病発症には至らなかった。この結果から、遺伝子治療における有害事象 (白血病発症) がヒト化マウス内にて確実に観察できるモデル系確立のためには、セカンドヒットとなるような第 2 の癌遺伝子導入が必要であると思われる。

研究成果の概要 (英文)：Humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice) model was established in order to know the safety and efficacy of human gene therapy. We found that LMO-2 gene-introduced human cord blood stem cells showed transient proliferation in NOG mice, but did not induce leukemia at all. The conclusion is that the second hit by an additional oncogene must be required to complete the leukemogenic process.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：NOG マウス・遺伝子治療・レトロウイルスベクター・LM02・MLL/AF10・白血病・k-ras・セカンドヒット

1. 研究開始当初の背景

(1) X 連鎖重症複合型免疫不全症 (X-SCID) に対する遺伝子治療は、正常 γ c 鎖を

組み込んだレトロウイルスベクターを患者の造血幹細胞に導入する方法で施行され、免疫能のほぼ完全な再構築という輝かしい結

果を残した。しかし、移植後2年以上を経過して、遺伝子治療を受けた患者からT細胞性白血病が発症したという事例が相次いで報告された。それらの多くは、癌遺伝子 *LMO2* の第1エクソン近傍にレトロウイルスベクターが組み込まれたことで、恒常的に *LMO2* 遺伝子が過剰発現したことが白血病発症に大きく関わっていることが明らかとなった。この重大な有害事象によりX-SCIDに対する遺伝子治療は中断され、より安全な遺伝子治療を開発することが急務となった。そのためには、遺伝子治療の前臨床モデルとなり得るような実験動物モデルの開発が必要不可欠であると考えられた。

(2) X-SCID の原因遺伝子であるサイトカイン共通 γ 鎖 (γ c 鎖) 遺伝子は、東北大学医学部免疫学教室の菅村により単離された遺伝子である。菅村らが樹立した γ c 鎖を欠損するマウス (γ c⁻マウス) は、X-SCID 患者同様に重症な免疫不全を呈するが、従来の免疫不全マウスとして知られていた NOD/SCID マウスに、この γ c⁻マウスを戻し交配することで免疫能を完全に欠如する NOD/SCID/ γ c⁻マウス (NOG マウス) が樹立された。NOG マウスは、細胞移入実験における理想的なレシピエントとして汎用され始めたが、その中でもヒト由来造血幹細胞を移入し NOG マウス体内にヒト造血系を再構築したという Blood 誌(2002)における報告は特筆すべきものであった。

(3) 申請者は免疫学の菅村らと共同して X-SCID 患者に対する遺伝子治療の準備をしていたが、白血病発症の報告を受け治療計画の中断を余儀なくされていた。それに相まって報告された NOG マウスにおけるヒト造血系再構築の実験系は、この系を遺伝子治療の前臨床モデルとして応用すれば、マウスという実験動物内にて、レトロウイルスベクターを導入されたヒト造血幹細胞の動向が解析できるという可能性を感じさせるものであった。この系に着目した申請者と菅村は、すでに確立していたヒト造血幹細胞への遺伝子導入と、菅村らの樹立した NOG マウスの入手というアドバンテージから、NOG マウスを用いた X-SCID 遺伝子治療マウスモデルの開発に着手したのが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルスベクターの挿入変異による白血病発症を予知し、遺伝子治療の安全性を確保し得るような遺伝子治療前臨床動物モデルを開発することである。マウスという小実験動物内にて、ウイルスベクターを導入されたヒト造血幹細胞の動向、分化、白

血病発症の有無が解析可能であれば、更なる適切なウイルスベクターの選択や感染方法の確立など様々な応用が可能であると考えられる。

3. 研究の方法

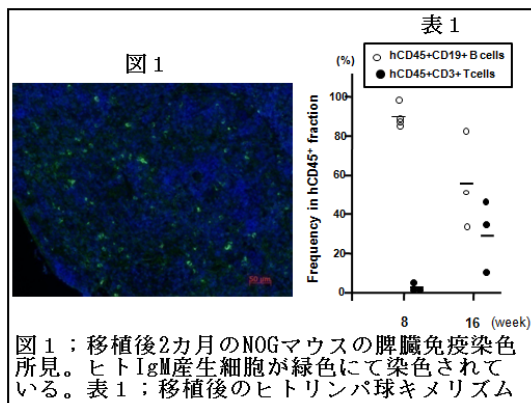
(1) マウス体内にヒトの造血幹細胞が生着・分化することが可能であるか確認するため、臍帯血由来 CD34⁺細胞を放射線照射した NOG マウスへ経静脈的に移植し、経時的に末梢血を採取しヒト血球出現の有無を確認する。ヒト血球が出現するならば、主に表面マーカーを用いて細胞系列を解析する。

(2) NOG マウス内にてヒト造血幹細胞が生着・分化可能であることが確認できれば、次にレトロウイルスベクターが導入された造血幹細胞の移植へ移る。その際に、レトロウイルスベクター (Murine stem cell virus; MSCV) に、*LMO2* を組み込んだものを用意し、遺伝子導入することでT細胞性白血病発症の有無を確認する。白血病発症の陽性コントロール遺伝子として MLL/AF10 を組み込んだベクターも遺伝子導入し、発症の有無を確認する。

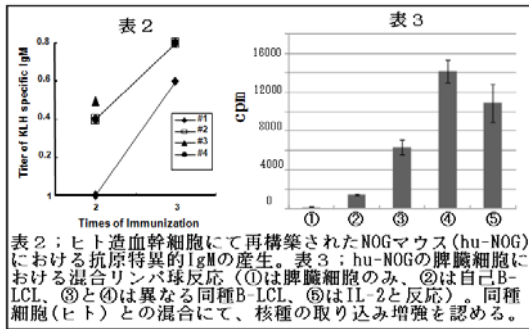
4. 研究成果

(1) NOG マウスにおけるヒト造血系再構築 (hu-NOG の作成)

6~8 週齢の NOG マウスへ 1.2Gy の放射線照射による前処置を施行した。臍帯血から免疫磁気ビーズ法により分離した CD34⁺細胞を経静脈的に NOG マウスへ移入 (hu-NOG) し、末梢

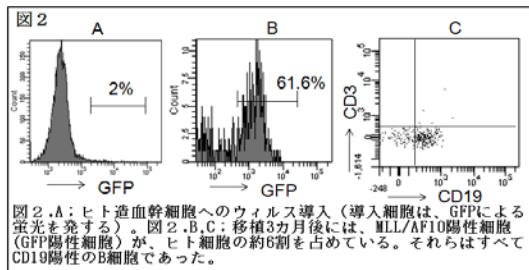


血を経時的に解析した。移植 1 ヶ月後には、ヒト CD45⁺細胞が検出され始め、移植早期 (移植後 4~8 週) においてその殆どは CD19⁺B 細胞であった (図 1 参照)。移植後 16 週を経過すると、胸腺や 2 次リンパ節が形成され、末梢血には CD3⁺T 細胞が検出されるようになった (表 1 参照)。この頃には、NK 細胞や樹状細胞、骨髄系細胞も出現し、殆どの細胞系譜が NOG マウス内にて分化可能であることが証



明された。これらのマウスでは、タンパク抗原 (KLH) における免疫にて、抗原特異的 IgM を産生し (表 2 参照)、hu-NOG マウスの脾臓細胞と、ヒト由来の同種 B 細胞セルラインとの混合リンパ球反応にて、トリチウムサイミジン取り込みの増強を認めた (表 3 参照)。

(2) 癌遺伝子を導入したヒト CD34⁺細胞の NOG マウスへの移植



ヒト白血病の発症への関与が明らかとなっている癌遺伝子 MLL/AF10 を用いて、遺伝子導入 CD34⁺細胞が、NOG マウスの体内にて増殖優位性を示し、白血病を発症するか検討した。MLL/AF10 は約 5kb の比較的大きな融合遺伝子であるため遺伝子導入効率は 2% と低率であったが、MLL/AF10 導入 CD34⁺細胞を移植されたマウスの一部において、移植後 3 カ月に MLL/AF10 が発現している細胞の増殖優位性を示した (図 2 参照)。しかし、移植後 5 カ月を過ぎても白血病発症は認めず、ヒト細胞は減少する傾向を示した。以上より、癌遺伝子 MLL/AF10 により獲得される増殖優位性は一過的であり、MLL/AF10 単一では白血病発症へ至らないことが示唆された。本来白血病発症には、細胞増殖に機能するクラス 1 遺伝子の変異に加えて、細胞分化制御に関与するクラス II 遺伝子の変異が同時に起こることが必要であると考えられており (two hit theory)、我々の実験系においても two hit となるような別の癌遺伝子の導入が必要であると考えられた。小児 ALL において MLL 融合遺伝子と恒常的活性化変異を持つ k-ras が関与することが知られており、変異 k-ras を同時に導入すれば白血病発症へ至るのでないかと考えられた。変異 k-ras を導入されたヒト造血幹細胞を NOG マウスへ移植すると、移植 14 週間後にはマウスの状態が悪化し、末梢血を解析したところ、単球系の表面マーカーが陽性の細胞が著増していた (6 匹中 4 匹、

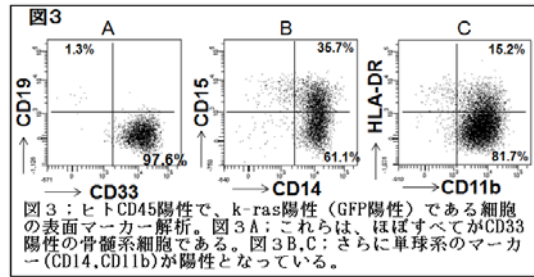
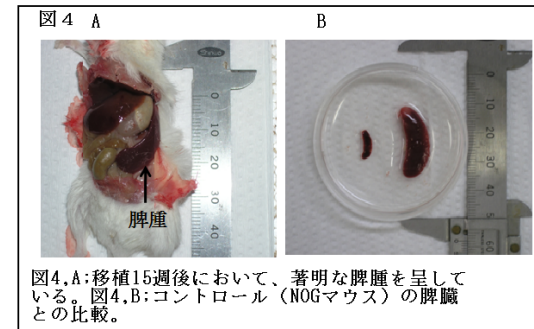


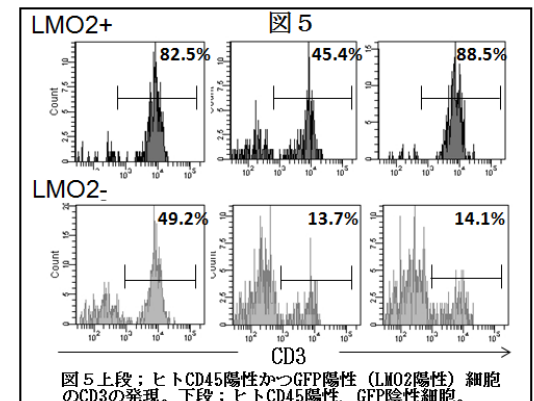
図 3 参照)。これらの細胞は、すべて GFP 陽性 (つまり k-ras 陽性) であり、ヒト細胞のほぼ 9 割をこれら GFP 陽性細胞が占めていたため、著明な増殖優位性を持つ傾向が示唆された。移植 15 週間後の時点で、これらのマウスでは著明な肝脾腫を呈していた (図 4 参照)。このマウスが、白血病を発症するか否かは、今後の解析が必要であるが、k-ras 導入ヒト造血幹細胞が顕著な増殖を来すことは明らかであり、MLL/AF10 に加えて k-ras が導入されれば、さらに増殖を来し、形質転換をおこして白血病発症につながるのではな



いかと考えられた (現在二つの遺伝子を導入して、NOG マウスへ移植している)。

(3) LMO2 を導入したヒト CD34⁺細胞の NOG マウスへの移植

LMO2 を導入されたヒト造血幹細胞は、NOG マウスへの移植後一旦減少する傾向を認めたが、移植後 3 カ月ほどでヒト CD45 陽性細胞が出現し、それらの多くは CD3 陽性 T 細胞であった (7 匹中 4 匹において; 図 5 参照)。これらは、移植後 6 カ月以上経過しても、依然として T 細胞の割合は多いものの、胸腺腫を形成しないことから、LMO2 により T 細胞系へ分化偏向するものの、明らかな増殖優位性を来していないことが示唆された。



(考察)

NOG マウスへのヒト造血幹細胞移植によるヒト造血再構築系では、ほぼすべての細胞系譜が分化可能であることが証明された。この実験系を、ヒトの遺伝子治療の前臨床モデルへ応用できれば、他に類を見ない遺伝子治療モデルマウスになると考えられる。

本研究の目的は、白血病発症という有害事象を招いた X-SCID の遺伝子治療を反省材料として、治療における安全性を担保出来る前臨床モデルの開発を行うことである。レトロウイルスベクターに限らず、ウイルスベクターを使用した遺伝子導入には挿入変異による悪性腫瘍の発症が問題となる。試験管内での実験において、安全性向上のためのベクターの選択や感染方法などは解析可能であるが、実際に生体内においてそれら遺伝子導入細胞がどのような動向を示すか検証する実験系が不可欠である。

本研究では、あらかじめ癌遺伝子をクローニングしたウイルスベクターを使用し、ヒト造血幹細胞へ遺伝子導入後 NOG マウスへ移植するという系を用いた。結果としては、強力な癌遺伝子である MLL/AF10 のみではマウスの生存期間内に白血病発症は確認できず、two hit となりうるような第二の遺伝子が必要であると思われた。我々は、小児 ALL での発症への関与を考慮し、MLL/AF10 に加えて恒常的活性化変異を持つ k-ras を同時に遺伝子導入することを試行中である。LM02 についても、単独では T 細胞への分化偏向しか来たさなかったが、T 細胞性白血病への関与が知られている *Notch1* なども同時に導入することが発症への期間を短縮する可能性がある。発症に関わる遺伝子の組み合わせは多々挙げられるが、二つの遺伝子導入により、NOG マウス内にてヒト白血病発症が確実に再現できるようになれば、将来的には患者検体を用いてその疾患の正常遺伝子と第 2 の遺伝子導入を施行し、NOG マウスへ移植してみる。そして白血病が発症しなければ、使用したベクターの安全性は非常に高いことが言えるのではないかと？

今後の遺伝子治療は、造血幹細胞への遺伝子導入系だけではなく、自己 iPS 細胞を用いた遺伝子治療も臨床応用が進むと思われる。iPS 細胞の樹立には、癌発症の危険を持つ遺伝子の導入が必要であることから、その臨床応用にも、悪性腫瘍発症という有害事象が隣り合わせで存在する。本研究は、従来の遺伝子治療のみならず、iPS 細胞を利用した遺伝子治療の安全性を検証する上でも有用な系となり得ると思われた。

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 6 件) 6 件全て査読有り。

1)Horino S, Rikiishi T, Niizuma H, Abe H, Watanabe Y, Onuma M, Hoshi Y, Sasahara Y, Yoshinari M, Kazama T, Hayashi Y, Kumaki S, Tsuchiya S. Refractory chronic immune thrombocytopenic purpura in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2009 Nov;90(4):483-5

2)Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat*. 2010 Mar;31(3):284-94

3)Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, Yabe H, Nakayama H, Kudo K, Kobayashi R, Hamamoto K, Imaizumi M, Morimoto A, Tsuchiya S, Hanada R. Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 20;27(24):4007-13

4)Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, Ito R, Ito M, Minegishi M, Minegishi N, Tsuchiya S, Sugamura K. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol*. 2009 Jul;21(7):843-58.

5)Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1291-301

6) Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 2007 Aug 30;448(7147):1058-62

〔学会発表〕(計 21 件)

1) 星能元、笹原洋二、力石健、斉藤由佳、新妻秀剛、小沼正栄、久間木悟、土屋滋。派生染色体不均衡転座der(1;7)(q10;p10)を持つ 6 歳MDS女児に臍帯血移植した 1 例。第 112 回日本小児科学会学術集会(奈良県文化会館・奈良県新公会堂・奈良商工会議所・奈良中小企業会館) 2009/04/17~2009/04/19

2) Chung Yeng Looi, Yoji Sasahara, Yuko Watanabe, Satoru Kumaki, Shigeru Tsuchiya. Functional analysis of constitutively active forms of WASP. 第 112 回日本小児科学会学術集会(奈良県文化会館・奈良県新公会堂・奈良商工会議所・奈良中小企業会館) 2009/04/17~2009/04/19

3) 川野研悟、北沢博、新妻秀剛、斉藤由佳、坂本修、笹原洋二、土屋滋。ABCA3 遺伝子の変異を認めた特発性間質性肺炎の兄弟例。第 112 回日本小児科学会学術集会(奈良県文化会館・奈良県新公会堂・奈良商工会議所・奈良中小企業会館) 2009/04/17~2009/04/19

4) 新妻秀剛、土屋滋、他 8 名。先天性胆道閉鎖症に対する生体肝移植後に EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患を発症した 2 例。第 51 回日本小児血液学会(東京ベイホテル東急) 2009/11/27~2009/11/29

5) 堀野智史、土屋滋、他 15 名。骨髄非破壊的前処置による骨髄移植を施行した IPEX 症候群の 1 例。第 51 回日本小児血液学会(東京ベイホテル東急) 2009/11/27~2009/11/29

6) 渡辺庸平、鈴木信、力石健、笹原洋二、土屋滋。ダブルフィラデルフィア染色体陽性の急性リンパ性白血病の 1 例。第 51 回日本小児血液学会(東京ベイホテル東急) 2009/11/27~2009/11/29

7) 渡辺祐子、土屋滋、他 19 名。骨髄移植を行った慢性活動性 EBV 感染症の 4 例。第 51 回日本小児血液学会(東京ベイホテル東急) 2009/11/27~2009/11/29

8) 風間理郎、土屋滋、他 11 名。初発時に両側腎に病変を認めたウィルムス腫瘍の 4 例。第 25 回日本小児がん学会(東京ベイホテル東急) 2009/11/27~2009/11/29

9) 浦野慎一、遠藤一弥、氏家和明、伊藤俊広、中村知子、大森智子、山田朱実、伊藤孝、峯岸正好、土屋滋。宮城県合同輸血療法委員会の設立と活動状況について。第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会(福岡国際会議場) 2008/04/25~2008/04/27

10) 伊藤経夫、土屋滋。採取後 48 時間以内保管された臍帯血の解凍後の品質評価。第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会(福岡国際会議場) 2008/04/25~2008/04/27

11) 鈴木力生、笹原洋二、渡辺祐子、堀野智史、久間木悟、土屋滋。RIST による臍帯血移植を施行した X 連鎖重症複合免疫不全症の 1 例。第 111 回日本小児科学会学術集会(東京国際フォーラム) 2008/04/25~2008/04/27

12) 菅野潤子、吉成みやこ、笹原洋二、佐藤篤、藤原幾磨、小川英伸、峯岸正好、今泉益栄、久間木悟、土屋滋。宮城県における造血幹細胞移植後患者の内分泌学的晩期障害。第 111 回日本小児科学会学術集会(東京国際フォーラム) 2008/04/25~2008/04/27

13) 渡辺祐子、阿部弘、新妻秀剛、星能元、力石健、笹原洋二、坂本修、吉成みやこ、久間木悟、土屋滋。慢性活動性 EBV 感染症の 4 例。第 111 回日本小児科学会学術集会(東京国際フォーラム) 2008/04/25~2008/04/27

14) 久間木悟、峯岸正好、笹原洋二、熊谷直憲、根東義明、谷内江昭宏、土屋滋。同種骨髄移植後特異な臨床経過をたどった重症複合免疫不全症の 3 例。第 50 回日本小児血液学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14~2008/11/16

15) 笹原洋二、渡辺祐子、Chen Looi Yeng、佐藤美季、箱崎郁子、久間木悟、土屋滋。WASP 異常症の多様性とその分子病態の解明に向けて。第 50 回日本小児血液学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14~2008/11/16

16) 斉藤由佳、笹原洋二、新妻秀剛、川野研悟、堀野智史、星能元、峯岸正好、久間木悟、土屋滋。骨髄非破壊的前処置を用いた同胞間造血幹細胞移植を行った高 IgM 症候群の 1 例。第 50 回日本小児血液学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14~2008/11/16

17)川野研悟、堀野智史、新妻秀剛、齊藤由佳、力石健、笹原洋二、久間木悟、峯岸正好、土屋滋。原発巣と転移巣で異なる性質を持つと考えられた神経芽腫の2例。第24回日本小児がん学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14～2008/11/16

18)新妻秀剛、力石健、笹原洋二、岸本光司、大平美紀、中川原章、久間木悟、土屋滋。22q11.2領域のGermline deletionをベースに発症した乳児悪性ラブドイド腫瘍。第24回日本小児がん学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14～2008/11/16

19)青木由貴、遠藤明史、満生紀子、小野敏明、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀、笹原洋二、久間木悟、土屋滋、大石力。免疫不全症に合併した悪性リンパ腫2例。第50回日本小児血液学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14～2008/11/16

20)田淵健、気賀沢寿人、吉見礼美、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊池陽、小林良二、土屋滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺新、加藤俊一。小児造血幹細胞移植登録事業における移植成績の解析 2008。第50回日本小児血液学会(幕張メッセ国際会議場) 2008/11/14～2008/11/16

21) Sasahara y, Ramesh N, Tsuchiya S, Geha R. WIP is a chaperone from Wiskott-Aldrich syndrome protein. 50th annual meeting, American Society of Hematology (San Francisco / California) 2008/12/06～2008/12/09

〔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

土屋 滋 (TSUCHIYA SHIGERU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30124605

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号：