

平成 21年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591149
 研究課題名 (和文) ヒト型白血病・リンパ腫モデルの創出と造血細胞・顆粒球の体外増幅に関する研究
 研究課題名 (英文) Modeling human leukemia/lymphoma, and ex vivo expansion of hematopoietic stem cells and granulocytes
 研究代表者 都 築 忍 (SHINOBU TSUZUKI)
 愛知県がんセンター(研究所)・遺伝子医療研究部・室長
 研究者番号：00342965

研究成果の概要：ヒト臍帯血由来造血幹細胞に白血病原因遺伝子の1つであるTEL-AML1をレンチウイルスベクターにより発現させ、免疫不全マウスに移植してヒト白血病のモデルを創出した。また、マウスの未分化造血細胞にある転写因子の特定のアイソフォームを発現させることにより造血幹細胞が増幅され、骨髄移植後の生着能・造血能が大幅に亢進することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：造血器腫瘍

科研費の分科・細目：血液内科

キーワード：TEL-AML1, 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病・リンパ腫のモデルとしてマウスが広く用いられているが、マウスとヒトとは細胞の性質が異なることが知られており、ヒトの細胞を用いたモデル化が必要と考えられた。また、造血細胞を増幅する方法はまだまだ開発途上であり、新規の機構・方法が求められていた。

2. 研究の目的

(1) 白血病・リンパ腫の原因遺伝子をヒトの造血細胞に導入して、免疫不全マウスに移植する系を用いて、TEL-AML1型白血病のモデルを作成する。
 (2) 造血細胞を増幅する新規の機構・方法を開発し、さらにその分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

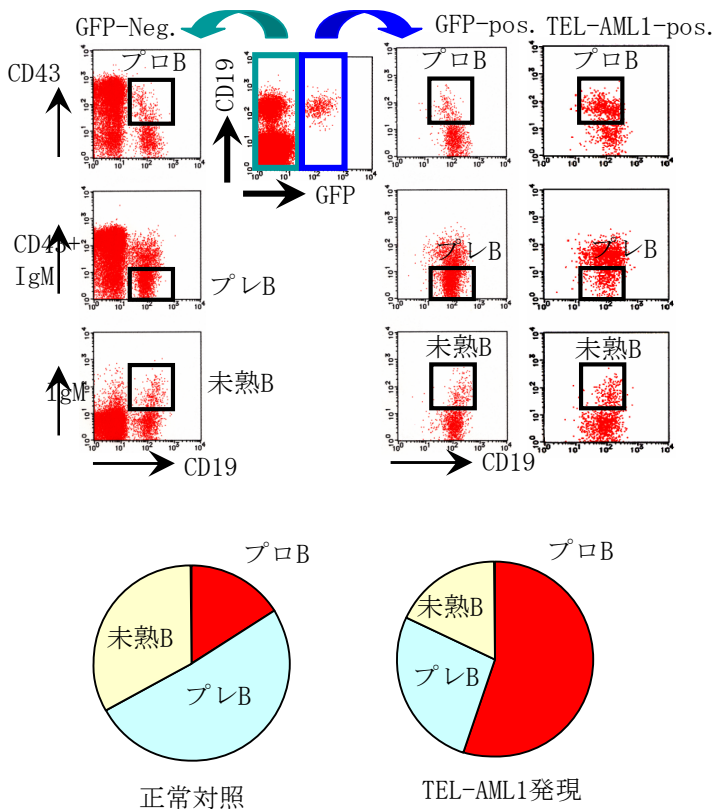
(1) ヒト臍帯血由来造血幹細胞に白血病原因遺伝子の1つであるTEL-AML1をレンチウイルスベクターにより発現させ、免疫不全マウスに移植して解析する。

(2) マウスの造血細胞に遺伝子導入し、特定の遺伝子が造血幹細胞活性に与える効果を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト白血病のモデルを創出するために、ヒト臍帯血由来造血幹細胞に白血病原因遺伝子の1つであるTEL-AML1をレンチウイルスベクターにより発現させ、免疫不全マウスに移植して解析するシステムを確立した。TEL-AML1発現により特殊な細胞表面形質を有するプロB細胞が出現し、自己複製能を発揮して白血病化に寄与することがあきらかとなった(図1-図3およびその説明の項参照)。

図 1



レンチウイルスシステムを用いて、Bリンパ性白血病原因遺伝子であるTEL-AML1をB細胞特異的に発現させ、マウスに細胞を移植してその動態を観察し解析した。TEL-AML1発現細胞はGFP陽性細胞として同定できるようにしてある(図1)。

移植マウスの骨髄細胞のFACS解析から、TEL-AML1発現B細胞はプロB細胞からプレB細胞への分化が阻害されていることが明らかとなった。

一般に、白血病の発症には少なくとも2種類の異常、すなわち(1)細胞分化の阻害と(2)細胞増殖能の亢進が必要であるとされている。

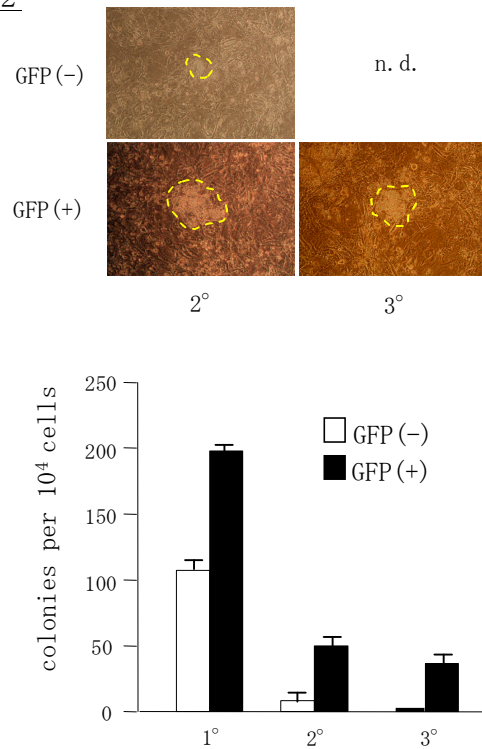
本研究から、TEL-AML1には細胞の分化を阻害する作用があることが判明した(図1)。

そこで次にTEL-AML1には細胞の増殖を亢進させる作用があるのかどうかについて検討した。

図1で得たプロB細胞をin vitroで培養しコロニー形成能試験を行った(図2)。

TEL-AML1を発現しない細胞(GFP(-)と表記)に比べ、TEL-AML1を発現する細胞(GFP(+)と表記)は格段に大きなコロニーを形成することが判明した(図2上段写真)。

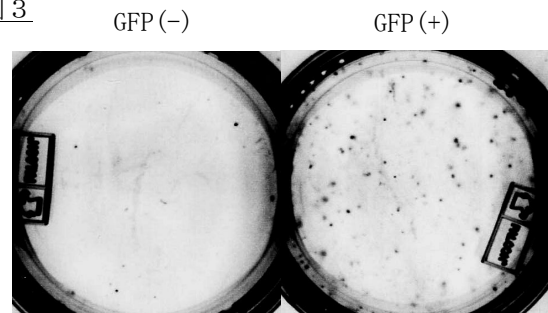
図 2



さらに、生成したコロニーをreplating(もう一度まき直し)すると、TEL-AML1を発現しない細胞(GFP(-)と表記)に比べ、TEL-AML1を発現する細胞(GFP(+)と表記)はまきなおしに際するコロニー形成能が亢進していた。

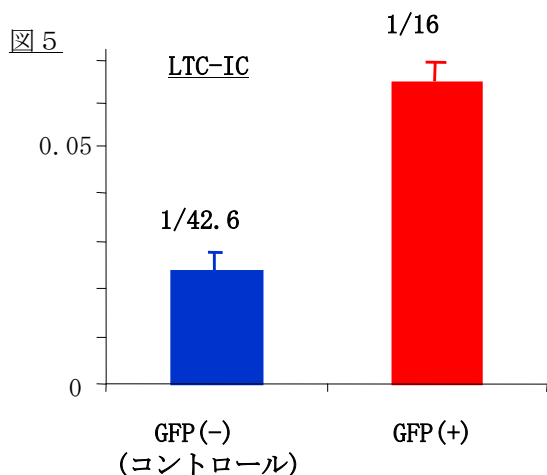
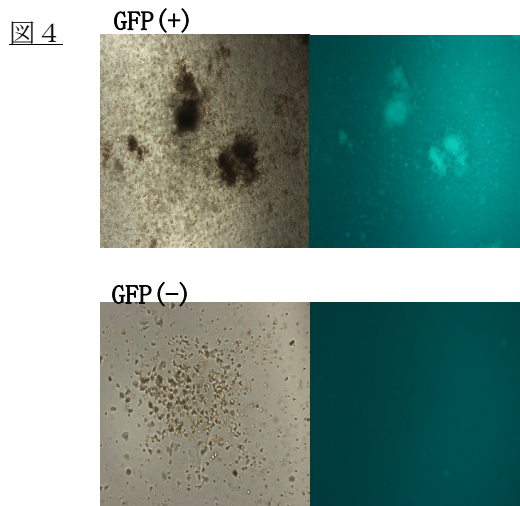
このことより、TEL-AML1にはプロB細胞の増殖を亢進させる能力があることがわかる。

図 3



TEL-AML1を発現しない細胞(GFP(-)と表記)に比べ、TEL-AML1を発現する細胞(GFP(+)と表記)が増殖力が強いことは、図1・図2で示したようなin vivoで生成したTEL-AML1陽性細胞にとどまらない。

プロB細胞を採取してここに直接TEL-AML1を発現させてメチル・セルロース下にコロニーを形成させても、やはりTEL-AML1にはプロB細胞の増殖を亢進させる能力があることが示された(図3)。

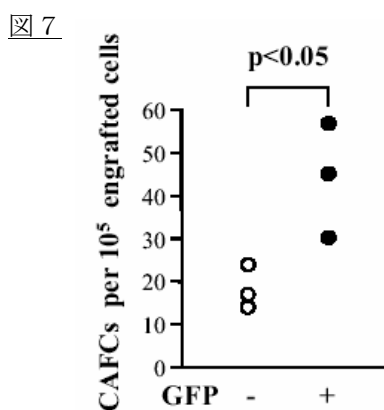
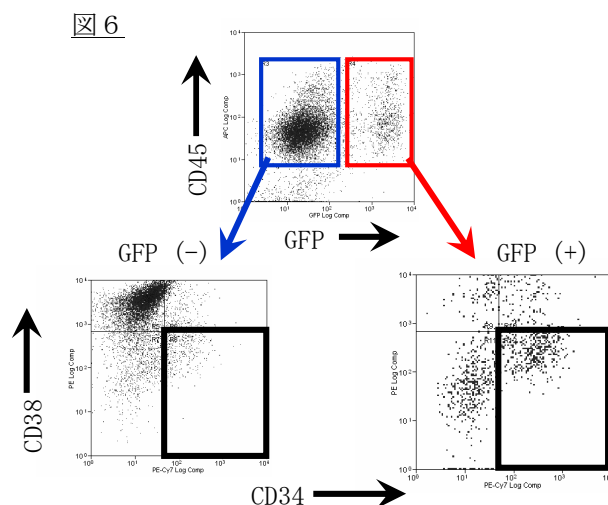


LTC-ICが3倍多い

レンチウイルスシステムを用いてヒト臍帯血由来造血細胞にある転写因子を発現させ、メチルセルロース下にコロニー形成能試験を行った(図4)。遺伝子発現のある細胞(GFP陽性細胞)は、遺伝子発現のない細胞(GFP陰性の細胞)に比べて生成コロニー数が多く、かつ大きなコロニーができた。

次に、コロニー形成能試験で評価できる細胞よりも未分化な細胞の数(LTC-IC: long-term culture initiating cells: 骨髄長期培養開始細胞)を評価した。その結果やはり、遺伝子発現のある細胞(GFP陽性細胞)は、遺伝子発現のない細胞(GFP陰性の細胞)に比べて生成数がコロニー数が多いという結果であった(図5)。

以上から、この遺伝子発現によって造血幹細胞に近い未分化細胞が増幅することが判明した。



遺伝子導入した細胞をMS5ストローマ細胞と共培養することで未分化性の維持能についてさらに検討した(図6)。遺伝子発現のある細胞(GFP陽性細胞)は、遺伝子発現のない細胞(GFP陰性の細胞)に比べて、CD34陽性CD38陰性の細胞の割合が有意に高いことがわかった。このことは、遺伝子導入によって造血幹細胞に近い未分化細胞が維持されることを示す。

この点をさらに確認するために、CAFCアッセイ(cobble stone area forming cells: 敷石状領域形成細胞)を算定すると、約2.5倍多いことが明らかとなった。

以上から、この遺伝子発現によって造血幹細胞に近い未分化細胞が増幅することがさらに確認できた。

このことは、ヒトの造血幹細胞が試験管内で有効に維持・増幅できる可能性を示しており、今後臨床応用へ向けた研究が望まれる。

(2) マウスの未分化造血細胞にある転写因子を発現させることにより造血幹細胞が増幅し、骨髄移植後の生着能・造血能が大幅に亢進することを見出した。この幹細胞の増幅はマウス体内においても体外においても認められた。さらに、この細胞は体外で培養を継続すると1週間で2倍に増え、かつ多分化能を保持していることが判明した。すなわち、この細胞は培養条件を変えることにより、顆粒球・赤芽球・巨核球・Tリンパ球・Bリンパ球に分化させることが可能であった。この事実を応用すれば、血液成分の細胞を体外で大量に産生することが可能となるものと考え、現在より適切な条件を探索している(図4-7およびその説明参照)。

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 5 件)

Honma Kら 9名 2番目 TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2008 Jan;47(1):1-7.

Hong Dら 13名 1番目 Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. Science. 2008 Jan 18;319(5861):336-9.

Tsuzuki Sら 12名 Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: Analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. Cancer Science. 98: 698-706, 2007□□

Tsuzuki Sら 6名 Isoform-specific potentiation of Stem and Progenitor Cell Engraftment by AML1/RUNX1. Plos Medicine. 4: e172, 2007□

Tagawa, Hら 5名 3番目 Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. Cancer Sci. 98: 1482-1490, 2007□□□□

[学会発表] (計 2 件)

都築 忍: t(12;21)染色体転座により形成されるTEL-AML1融合遺伝子の機能解析
第4回日本癌学会学術総会 2007年10月3日横浜

都築 忍: TEL-AML1 白血病における TEL欠失の作用
第67回日本癌学会学術総会 2008年10月28日名古屋

[図書] (計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0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0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

6. 研究組織

(1)研究代表者 都築 忍
愛知県がんセンター・研究所・
遺伝子医療研究部・室長
研究者番号: 00342965

(2)研究分担者

(3)連携研究者