

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007 -2008
課題番号：19790662
研究課題名（和文）バイオイメージング技術で検出される活性化シグナルを指標とした白血病幹細胞の解析
研究課題名（英文）Bioimaging analysis of stem cell signal activity in leukemia cells

研究代表者

氏名（アルファベット）小林 誠一郎（KOBAYASHI SEIICHIRO）
所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号 70376622

研究成果の概要：

近年、白血病、乳癌、大腸癌等、各種悪性腫瘍において腫瘍幹細胞の存在が報告されている。それらは細胞表面マーカーをもとに解析されたものであり、機能的な側面から同定された報告はない。今回我々は、正常幹細胞でその活性が高いことが知られている各種シグナル(Wnt, Notch, NF B, テロメラーゼ)を蛍光蛋白あるいはルシフェラーゼを用いて検出するレポーター法を開発した。この方法により、(1) 細胞個別に、(2) 細胞が生きたままの状態でのシグナル(レポーター)活性の解析が可能となった。また、レンチウイルスベクターの高い感染効率は、今まで困難であった初代培養細胞での解析を可能にした。以下に、得られた主な知見を示す。

(1) 各種造血器腫瘍細胞株における Wnt, NF B 活性について解析した。この方法でシグナル活性を検出できる細胞株は限られたが、細胞株によりシグナル活性分布は特異的であった。NF B シグナルは慢性骨髄性白血病細胞株、成人 T 細胞性白血病株、骨髄腫細胞株において特に高く、Wnt シグナルは慢性骨髄性白血病細胞株、骨髄腫細胞株において特に高かった。今後、患者検体を用いて同様の解析を行い、臨床データと照合し、この方法が新たな予後予測因子となりうるかどうか検討したい。

(2) ルシフェラーゼ発現ベクターを作製し、Ph 染色体陽性急性リンパ性白血病細胞株における NF B シグナルを調べた。TNF 刺激と骨髄ストローマ細胞の共培養は、NF B シグナルに対して相加的な効果を生じた。これにより造血微小環境(ニッチ)が白血病細胞に及ぼす効果を、細胞が生きたままの状態でイメージングすることが可能になった。

今後、これらの幹細胞シグナル陽性細胞が機能的な腫瘍幹細胞活性を持っているかどうか、コロニーアッセイや免疫不全マウスへの移植実験等により調べたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

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：レポーター法、腫瘍幹細胞、レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、個体の造血環境下で何らかの遺伝子異常を生じた結果、不死化と分化停止という二つの特徴を獲得した芽球細胞が単クローン性に増大し、正常造血を抑制する病態である。細胞形態や表面形質では均一に見える白血病芽球も、分裂能力の点ではかなり不均一な集団である。つまり白血病に代表される腫瘍性造血にも、正常造血同様に分裂能力の階層性(ヒエラルキー)が存在することが知られている(Huntly, B. J. and D. G. Gilliland, Nat Rev Cancer Vol5, No4, 311-21, 2005)。自己複製能力を有する白血病幹細胞が集団の維持と拡大を担う一方、ほぼ同じ形態と表面形質を呈する大多数の白血病芽球は数回程度の分裂能力しかもたないか、すでに最終分裂を終えている。つまり腫瘍性造血の治療には腫瘍幹細胞(白血病幹細胞)の根絶が必要であると考えられる。

白血病幹細胞は造血幹細胞のように、CD34やCD38など特定の表面抗原の組み合わせで純化できることが報告されている(D. Bonnet and J. E. Dick, Nature Med, Vol3, No7, 730-737, 1997)。また、乳癌・脳腫瘍等、他の悪性腫瘍においても同様に表面抗原の組み合わせから腫瘍幹細胞の存在が最近報告された。しかし腫瘍幹細胞あるいは白血病幹細胞を、機能的マーカーを用いて前方視的に同定しようとする試みにはほとんど先例がない。後述の本研究のように幹細胞の機能的特性を反映した識別法を併用すれば、より精度の高い白血病幹細胞の同定が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

機能的マーカーを用いて白血病幹細胞を

単離し、その特性を把握する。

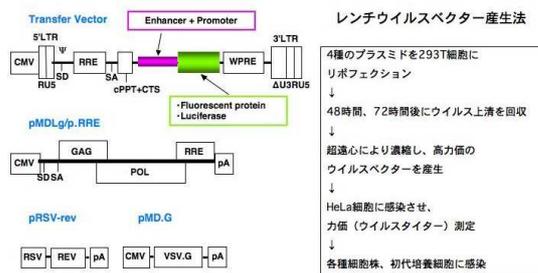
造血幹細胞の維持,増幅のメカニズムとして、Wnt シグナルの重要性が指摘されている(T. Reya et al, Nature, Vol423, 409-412, 2003)。Wnt リガンドからのシグナルは、恒常的に産生,分解が行われている。カテニンに対して、その分解を抑制する方向に働く。カテニンは核内に移行後、転写因子 LEF/TCF と結合し、標的遺伝子に作用することにより、幹細胞の自己複製等の機能を引き起こす。そこで、LEF/TCF 分子の結合サイト+TATA box をプロモーターとするタンパク質発現ユニットをレンチウイルスベクターを用いて白血病細胞内に導入することにより、そのレポーター活性を指標として(LEF/TCF レポーターアッセイ)、Wnt シグナル活性の高い細胞集団を単離できる。これは白血病幹細胞を含む細胞集団であると予想され、その性状解析を目的とした。同様に、別の幹細胞シグナル(Notch, NF B, hTERT)についてもレポーターアッセイ系の構築を試みた。

3. 研究の方法

Wnt シグナルを初めとする幹細胞シグナル活性測定のため、レンチウイルスベクターを用いたレポーターアッセイ系を構築・検証した。

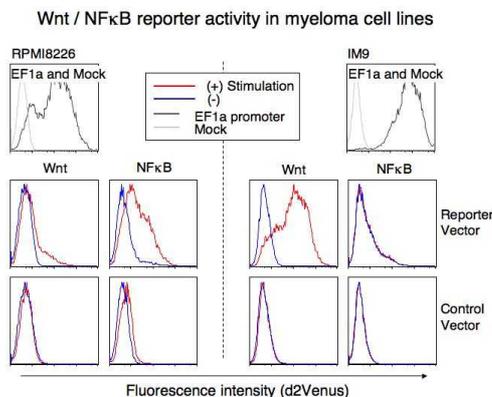
各種幹細胞シグナル(Wnt, Notch, NF B, hTERT)のレポーター(d2Venus, ルシフェラーゼ)発現ユニットを搭載したトランスファーベクター(プラスミド)を構築した。次にリポフェクション法を用いて各種シグナルレポーター・レンチウイルスベクターを作製し、細胞株に感染後、フローサイトメトリー(d2Venus), ルシフェラーゼアッセイによりレポーター活性を測定した。その際、Wnt シ

グナルを刺激する目的で、Bio(カテニン分解を阻止し、Wnt シグナルを刺激する試薬) や恒常活性型 カテニンを発現するレトロウイルスベクターを使用し、レポーター活性の変化を測定した。Notch, NF Bシグナルに関しても上記に準じてレポーター活性を測定した。Notchシグナル刺激としてNotch-IC発現レトロウイルスベクターを、NF B刺激としてサイトカイン TNF を使用し、それぞれレポーター活性の変化を測定した。293T細胞等を用いた結果、上記レポーターベクター感染細胞では、シグナル特異的な刺激によりレポーター活性の上昇を認め、機能することが示された。



4. 研究成果

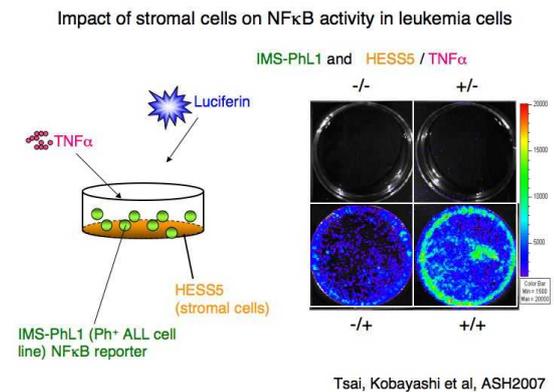
(1) 各種造血器腫瘍細胞株における Wnt, NF B 活性について解析した。この方法でシグナル活性を検出できる細胞株は限られたが、細胞株によりシグナル活性分布は特異的であった。NF Bシグナルは慢性骨髄性白血病細胞株, 成人T細胞性白血病株, 骨髄腫細胞株において特に高く、Wntシグナルは慢性骨髄性白血病細胞株, 骨髄腫細胞株において特に高かった(骨髄腫細胞株における結果を示す)。今後、患者検体を用いて同様の解析を行い、臨床データと照合し、この方法が新たな予後予測因子となりうるかどうか検討したい。



(2) ルシフェラーゼ発現ベクターを作製し、Ph 染色体陽性急性リンパ性白血病細胞株に

おける NF Bシグナルを調べた。TNF 刺激と骨髄ストローマ細胞の共培養は、NF Bシグナルに対して相加的な効果を生じた。これにより造血微小環境(ニッチ)が白血病細胞に及ぼす効果を、細胞が生きたままの状態で見えることが可能になった。

今後、これらの幹細胞シグナル陽性細胞が機能的な腫瘍幹細胞活性を持っているかどうか、コロニーアッセイや免疫不全マウスへの移植実験等により調べたい。



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2件)

- Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Kobayashi S et al. Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Experimental Hematology*. 36:1634-1641, 2008.
- Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S et al. RNAi mediated silencing of p190Bcr-Abl inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190Bcr-Abl-expressing leukemia cells. *Leukemia*. 22:1131-1138, 2008.

[学会発表](計7件)

- Tsai H, Kobayashi S et al, Tumor necrosis factor- contributes to microenvironmental up-regulation of NF-B activity in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia: implication for a novel therapeutic target. *アメリカ血液学会*, 2008.

2. Nagamura -Inoue T, Ogami K, Yokoyama K, Izawa K, Kobayashi S, Nakayama S, Ishige I, Inoue Y, Ooi J, Uchimaru K, Takahashi S, and Tojo A. Large Scale Selective *Ex Vivo* Expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells from Peripheral Blood. アメリカ血液学会, 2008.
3. Yokoyama K, Nagamura -Inoue T, Nakayama S, Ishige I, Ogami K, Futami M, Kobayashi S, and Tojo A. Imatinib Mesylate Has a Stage-Specific Inhibitory Role in Generation of CD26^{high}CD8⁺ Central Memory T Cells *in Vitro* and *in Vivo*. アメリカ血液学会, 2008.
4. Kobayashi S, Tsai H, Izawa K, Inoue Y, Tojo A. Bioimaging analysis of stem cell signals in cancer cells using lentiviral reporter vector system. 日本癌学会総会, 2007
5. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi mediated silencing of p190^{Bcr -Abl} inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190^{Bcr -Abl} expressing leukemia cells. アメリカ血液学会, 2007
6. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. Inhibition of Stat5 phosphorylation and enhancement of imatinib/17-AAG induced cell death by anti p190^{Bcr -Abl} shRNA. 日本癌学会総会, 2007
7. Tsai H, Kobayashi S, Itoh K, Ishida T, Umezawa K, Tojo A. Microenvironmental up-regulation of NF-κB activity via p65-dependent and independent pathways in a bioimaging model of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. アメリカ血液学会, 2007

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 誠一郎 (KOBAYASHI SEIICHIRO)
 東京大学・医科学研究所・特任助教
 70376622

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

以上