

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20390276

研究課題名（和文）ヒト造血ニッチ分子を利用した造血幹細胞および白血病幹細胞異種移植系の開発

研究課題名（英文） Establishment of xeno-transplantation model for normal and malignant hematopoiesis using human niche.

研究代表者

安藤 潔（ANDO KIYOSHI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

研究成果の概要（和文）：

本研究課題はヒト正常造血における造血幹細胞維持メカニズムを解明すると同時に造血器悪性腫瘍の病的造血動態を明らかにすることを目的として以下の研究を行った。①免疫不全マウスを用いた異種移植系によりヒト正常造血における造血幹細胞維持・老化メカニズムを解明した。②免疫不全マウスを用いた異種移植系により骨髄異形成症候群の病的造血動態を明らかにした。③ニッチ因子であるヒト SDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1 遺伝子を導入した免疫不全マウスを作成し、正常ヒト造血幹細胞および白血病幹細胞を移植して解析した。以上の研究により、今後造血幹細胞移植後の幹細胞保護療法の開発や新規白血病幹細胞標的治療薬の開発を行う基盤とする。

研究成果の概要（英文）：

We established xeno-transplantation model using immune-deficient mice to analyze normal and pathological human hematopoiesis. First we demonstrated that replication stress induces intracellular elevation of reactive oxygen species (ROS) that results in accumulated and persistent DNA damage in human HSCs both in vitro and in vivo. The oxidative DNA damage causes premature senescence among HSCs, leading to loss of stem cell function. Importantly, treatment with an antioxidant can antagonize oxidative DNA damage and consequent HSC dysfunction. Our results reveal that ROS play a causative role for DNA damage, and mechanisms of ROS regulation have a major influence on human HSC aging. Then, to establish suitable *in vivo* MDS model, we intramedullarily transplanted CD34⁺ cells from the patients with MDS, acute myelogenous leukemia (AML) derived from MDS (MDS-AML), and AML with trilineage dysplasia into nonobese diabetic / Severe combined immunodeficient / IL-2Ry^{null} (NOG) mice with co-injection of human mesenchymal stem cells. They were engrafted in bone marrow (BM) of NOG mice, although their efficiency was less than the normal CD34⁺ BM cells. Histologically, CD34⁺ cells derived from MDS patients were aligned along endosteus of BM, whereas the differentiated cells were located in the central medullary regions. The distribution was abrogated using CD34⁺ BM cells from MDS-AML. These findings suggest that this *in vivo* MDS model is useful for elucidating the pathogenesis of MDS

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：血液腫瘍内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学（7209）

キーワード：ヒト造血ニッチ、造血幹細胞、白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病および前白血病状態である骨髄異形成症候群は国民の高齢化とともにわが国でも増加傾向にある。慢性骨髄性白血病では分子病態の解明を基に開発された薬剤イマチニブが画期的な治療効果を示し、分子標的療法の成功モデルとなり分子病態解明の臨床的重要性が確認された。一方、白血病細胞が消失した（分子的寛解）状態であっても薬剤投与を中断すると白血病が再発することが報告され、細胞レベルでは**白血病幹細胞を治療標的とすることの重要性**が示された。

(Nature 435:1267-70, 2005) 白血病幹細胞は造血幹細胞に由来する概念であり、「白血病も均一細胞集団ではなく、正常造血と同様に一部の幹細胞が自己複製能を有し、一部分化した白血病細胞を作り続けているとするもの」であり、近年その存在が証明された。

(Nat Med 3:730-737, 1997) 以上より白血病の予後を改善するためには治療抵抗性であり再発をもたらす「白血病幹細胞」の体内動態を明らかにし、特にその維持機構を分子レベルで解明することが重要である。

マウスにおける単一造血幹細胞の移植実験から、幹細胞も分裂に従って老化しやがては枯渇してしまうことが明らかにされ、幹細胞を静止期に停めておくことにより不必要な分裂を行わせないようにする環境因子（ニッチ）の重要性が認識されている。(Nature 425: 836-841, 2003) ニッチを担う細胞としては骨髄内の骨芽細胞、細網細胞、血管周囲細胞が想定されており、Notch ligand, N-cadherin, SDF-1, Angiopoietin-1 などが重要なニッチ分子であることがマウスで示されている。

上記背景より、正常造血における造血幹細胞維持の分子メカニズムの解明が白血病の根治的治療法の開発にも重要であることが推察されるが、まず**マウスで得られた知見が本当にヒトでもあてはまるのか否かを検証することは重要なステップである**。申請者はヒト正常造血幹細胞による造血解析を主なテーマとして研究を進めてきた。この過程で、①従来困難であったヒト T 細胞の分化まで再構成可能な免疫不全マウス（NOG マウス）を実験動物中央研究所と共同開発したこと、②遺伝子マーキングされたヒト造血幹細胞を NOG マウスに移植し、linear amplification-mediated PCR 由来プライマー

を用いる nested PCR を利用することによりクローンレベルでの造血幹細胞生体内動態の解明に成功したこと、③一方でヒト間葉系幹細胞を骨髄内移植法することによりマウス骨髄をヒト骨髄微少環境に置換することに成功したことは特筆すべき業績であった。一方研究過程で明らかとなった問題点としては、①生着したヒト造血幹細胞は2次移植までは造血再構築能を維持しているが、それ以上移植すると枯渇してしまう。これは80年のヒト寿命を考慮するとヒト個体内での動態を反映していない可能性を示唆する。②白血病幹細胞は生着不可能ではないが、その生着率は正常造血幹細胞と比較して著しく低い。これらの問題点を解決するために、本研究課題を設定した。

2. 研究の目的

本研究課題はヒト正常造血における造血幹細胞維持メカニズムを解明すると同時に造血器悪性腫瘍の病的造血動態を明らかにすることを目的として以下の研究を行った。①免疫不全マウスを用いた異種移植系によりヒト正常造血における造血幹細胞維持・老化メカニズムを解明した。②免疫不全マウスを用いた異種移植系により骨髄異形成症候群の病的造血動態を明らかにした。③ニッチ因子であるヒト SDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1 遺伝子を導入した免疫不全マウスを作成し、正常ヒト造血幹細胞および白血病幹細胞を移植して解析した。以上の研究により、今後造血幹細胞移植後の幹細胞保護療法の開発や新規白血病幹細胞標的治療薬の開発を行う基盤とする。

3. 研究の方法

(1). ヒト造血幹細胞の移植

NOG マウスに、ヒト HSC を移植することによって HSC の生体内動態に及ぼす影響を解析する。特に、HSC の自己複製能については、ニッチと相互作用する HSC の増減、複数回継代移植能、などについての詳細な解析を行うことによって、**ニッチの HSC 制御機構の解明を目指す**。また、新規に作製された NOG-Tg マウスは遺伝子を骨芽細胞に発現させていることから、骨代謝に及ぼす影響についても解析し、骨代謝活性の変動がニッチの規模、すなわち stem cell pool size の増減に及ぼす影響を詳細に解析する。

(2). 幹細胞老化の網羅的解析

ヒト HSC を NOG マウスに移植し(1次移植)、

ヒト造血系を再構築させた後、別個体に再度移植を繰り返す（2次移植、3次移植）ことにより、ヒトHSCの幹細胞活性の低下、すなわち老化が認められることを明らかにした。そこで、**ヒト幹細胞の老化機構を遺伝子発現・代謝活性レベルで総合的に理解**することを目的として、（1）移植前のCD34⁺細胞、1次移植、2次移植、そして3次移植後のCD34⁺細胞をNOGマウス骨髄より回収し、マイクロアレイ法により幹細胞の老化に伴う遺伝子発現の動態を網羅的に解析する。

（3）. 白血病細胞の生体内動態の解析および薬物感受性の検討

移植した白血病細胞の生着率および造血系の各系列細胞への分化能を各種モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて解析する。さらに、染色体異常の有無を検査することにより、生着した造血系細胞に白血病細胞が含まれるか否かを確認する。白血病細胞が生着したマウスに白血病抗原特異的なモノクローナル抗体や分子標的薬剤を投与し、その抗癌作用を白血病細胞の増減、マウスの生存率などを指標として検討する。

（4）. 遺伝子導入免疫不全マウスの作成

導入遺伝子は骨芽細胞特異的に発現するa-collagenプロモーターを用いた発現ベクターを作成する。本ベクターはすでにNotch ligandであるヒトjagged-1やdelta-1をマウス個体で発現することに利用されており、骨芽細胞特異的な発現が確認されている。ヒトSDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1遺伝子はそれぞれTAクローニングベクターにPCRクローニングし、塩基配列を決定して複製ミスのないことを確認する。NOGマウス受精卵に遺伝子導入して個体を得ることは効率が悪いので、免疫不全ではないNODマウス受精卵にマイクロインジェクション法により遺伝子導入してファウンダーマウスを得た後に、NOGマウスとかけ合わせることで目的の個体を得ることとする。この際、スピードコンジュニク法を用いることにより、3-4代の交配で目的の個体を得られる。

4. 研究成果

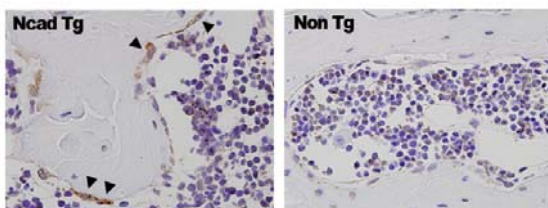
ヒト造血幹細胞（HSC）の老化モデルを作成するために、ヒトHSCを免疫不全マウスに移植し、ヒト造血系を再構築させた後、再度別個体に移植を繰り返すと、ヒトHSCの幹細胞活性が著しく低下し、多くのHSCが幹細胞プールから枯渇してしまういわゆる早期老化状態に陥ることを明らかにした。そこで、移植前、1次移植、2次移植の各段階におけるCD34+CD38-細胞の性状解析を行なった。その結果、移植の進行にともなってCD34+CD38-

細胞の活性酸素種（ROS）レベルが上昇するとともに、 γ H2AXを指標としたDNA損傷が、特に2次移植骨髄に生着しているCD34+CD38-細胞において顕著に蓄積していることを見いだした。このDNA損傷の蓄積はCD34+CD38+の前駆細胞集団には認められなかった。DNA損傷は、不可逆的な細胞周期の停止状態、いわゆるセネッセンスを誘導することから、細胞老化の主因として注目されている。ROSの増加とDNA損傷の関係を明確にするために、試験管内においてCD34+CD38-細胞にL-Buthionine-sulfoximine (BSO)を添加して培養することにより細胞内ROSの蓄積を誘導したところ、BSOの濃度依存的にDNA損傷が引き起こされた。DNA損傷によってヒトHSCにおけるink4aなどのCDKIの発現が亢進し、細胞増殖停止状態に陥っていた。さらに、ROSによるDNA損傷を受けたヒトHSCの骨髄再建能が低下していた。ROSによるDNA損傷は抗酸化剤であるN-Acetyl-L-Cysteine (NAC)の添加によって抑制された。重要なことに、複数回移植実験系においてNACをマウスに投与することにより、ヒトHSCにおけるDNA損傷の蓄積が回避され、非常に高い自己複製能を維持するということが明らかにした。これらの結果はBlood誌に投稿し、現在revise中である。

骨髄異形成症候群(MDS)は汎血球減少と3系統の骨髄系血液細胞の形態異常を主徴とする疾患で、わが国でも人口の高齢化とともに増加傾向にある。しかしながら、MDSに対する治療法は依然として輸血などの保存的療法が中心であり、有効な治療法の開発のためにはその分子病態解明が重要である。急性骨髄性白血病については免疫不全マウスへの生着が報告され生体内での病態解析が可能となっており、治療法開発の前臨床試験に利用されている。一方MDSでは生着が困難であり、安定した報告が存在しない。われわれはこれまでにヒト間葉系幹細胞(MSC)を骨髄内移植法することによりマウス骨髄をヒト骨髄微少環境に置換することに成功し、ヒト環境下でヒト正常造血幹細胞の生体内機能解析を進めてきたが、今年度は本法を用いて、従来困難であったMDS細胞をマウスの骨髄に生着させ、ヒトMDSモデル作成を試みた。これまでに14例のMDS患者の骨髄CD34陽性細胞をMSCと同時にマウスに移植し、6例についてヒト造血細胞の生着を確認した。興味深いことに、CD34陽性細胞のみを移植した群では、生着率が非常に低い、もしくは生着が確認できなかった。さらに細胞表面マーカーの解析により、マウス骨髄内でも移植前と同様

の表現型を維持していることが明らかとなった。キメリズムが高い一例において、染色体解析を行ったところ移植前骨髄と同じく17番長腕の同腕染色体が認められた。また、この一例については継代移植（これまでに6代）によりMDS細胞を2年以上にわたって維持し続けている。マウス骨髄の組織学的解析により、分化した細胞を含むCD45陽性細胞は骨髄腔内に点在しているのに対し、CD34陽性細胞は骨内膜近傍に限局して存在していることが明らかとなった。特筆すべきは、マウス骨髄内で3系統の形態異常も再現されている点である。さらに、細胞外マトリックス蛋白質とMDS細胞の相互作用について解析を進めており、これらの成果をもとにMDS幹細胞の骨髄微少環境における維持機構を明らかにすることは有効な治療法を開発する上で重要である。これらの結果は業績1として公刊された。

ヒトSDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1遺伝子を導入した免疫不全マウスを作成した。具体的には、骨芽細胞特異的に発現する α -collagenプロモーターの下流にヒトSDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1遺伝子を導入した発現ベクターを作成した。NOGマウス受精卵に遺伝子導入して個体を得ることは効率が悪いので、免疫不全ではないNODマウス受精卵にマイクロインジェクション法により遺伝子導入してファウンダーマウスを得た後に、NOGマウスとかけ合わせることにより目的の個体を得た。更にマウス骨髄をヒトSDF-1、N-cadherin、Angiopoietin-1抗体を用いて染色して導入遺伝子の蛋白質レベルの発現を検出した（下図）。今後はこれらのマウスにヒト白血病細胞、骨髄異形成細胞、骨髄腫細胞などを移植する。



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 20 件）

1. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M and Ando K. Establishment of xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Hematologica*, 2011, in press
2. Chou T, Tobinai K, Uike N, Asakawa T, Saito I, Fukuda H, Mizoroki F, Ando K, Iida S, Ueda R, Tsukasaki K, Hotta T, and other members of the Lymphoma Study Group (LSG) of Japan Clinical Oncology Group (JCOG), Japan. Melphalan-Prednisone and Vincristine-Doxorubicin-Dexamethasone Chemotherapy Followed by Prednisone/Interferon Maintenance Therapy for Multiple Myeloma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG0112. *Jpn J Clin Oncol*, 2011, in press
3. Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakamura H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian CL, Valentine ME, Khursigara G, Ozawa K, Omine M. Safety and Efficacy of the Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Japanese Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The AEGIS Clinical Trial. *Int J Hematol*, in press, 2011
4. Nakagawa Y, Suzuki K, Hirose T, Chou T, Fujisawa S, Kida M, Usuki K, Ishida Y, Taniguchi S, Kouzai Y, Tomoyasu S, Miyazaki K, Higashihara M, Ando K, Aoki S, Arai A, Akiyama N, Hatake K, Okamoto S, Dan K, Ohyashiki K, Urabe A. Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying hematopoietic diseases: a multi-institutional study. *J Infect Chemother.*, in press, 2011
5. Onizuka M, Kunii N, Toyosaki M, Machida S, Ohgiya D, Ogawa Y, Kawada H, Inoko H, Ando K. Cytochrome P450 genetic polymorphisms influence the serum concentration of calcineurin inhibitors in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* in press, 2011
6. Ohmachi K, Ando K, Ogura M, Uchida T, Itoh K, Kubota N, Ishizawa K, Yamamoto J, Watanabe T, Uike N, Choi I, Terui Y, Usuki K, Nagai H, Uoshima N, and Tobinai K. Bendamustine Is Highly Effective for Relapsed or Refractory Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) and Mantle Cell Lymphoma (MCL): Final Results of a Japanese Multicenter Phase II Study. *Cancer Science* 101, 2059-2064, 2010

7. Ogura M, Uchida T, Taniwaki M, Ando K, Watanabe T, Kasai M, Matsumoto Y, Ogawa Y, Ohmachi K, Yokoyama H, and Tobinai K. A phase I and pharmacokinetic study of bendamustine hydrochloride in relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *Cancer Science* 101, 2054-2058, 2010
8. Tobinai K, Ogura M, Maruyama D, Uchida T, Uike N, Choi I, Ishizawa K, Itoh K, Ando K, Taniwaki M, Shimada N, Kobayashi K. Phase I and pharmacokinetic study of everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol* 92, 563-570, 2010.
9. Kojima M, Nakamura N, Ohiya D, Tokunaka M, Kikuchi Y, Sato E, Oshimi K, Fujiwara S, Mano H, Murase T, Koike T, Tsunoda S, Matsumoto T, Marutsuka K, Hashimoto Y, Ane M, Ando K. Characteristics of CD5-positive splenic marginal zone B-cell lymphoma with leukemic manifestation; Clinical, flow cytometry, and histopathological findings of 11 cases. *J Clin Exp Hematol.* 50, 107-112, 2010
10. Matsushita H, Yamamoto M, Tsuboi K, Masukawa A, Arakawa S, Asai S, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. A novel aberrant form of e13a2 BCR-ABL1 transcript in chronic myelogenous leukemia undetectable with the standardized real-time quantitative polymerase chain reaction from the Europe Against Cancer Program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47, 885-887, 2009
11. Shirasugi Y, Ando K, Hashino S, Nagasawa T, Kurata Y, Kishimoto Y, Iwato K, Sonehara T, Ohtsu T, Berger D. A phase II, open-label, sequential-cohort, dose-escalation study of romiplostim in Japanese patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 90, 157-165, 2009
12. Tobinai K, Ishizawa K, Ogura M, Morishima Y, Ando K, Taniwaki M, Watanabe T, Yamamoto J, Uchida T, Nakata M, Terauchi T, Nawano S, Matsusako M, Hayashi M, Hotta T. Phase II study of oral fludarabine in combination with rituximab for relapsed indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci.* 100, 1951-1956, 2009
13. Matsushita H, Masukawa A, Arakawa S, Ogawa Y, Asai S, Yabe M, Ando K, Miyachi H. Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myelogenous leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene. *Int J Hematol.* 90,623-625,2009
14. Hatanaka K, Nakamura N, Kojima M, Ando K, Irie S, Bunno M, Nakamine H, Uekusa T. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders mimicking angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Pathology Research and Practice.* 206,9-13,2009
15. Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto N, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R. Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 89, 332-341, 2009
16. Hayashi A, Kayama M, Ando K, Ono M, Suzukamo Y, Michimata A, Onishi Akiyama M, Fukuhara S, Izumi S. Analysis of subjective evaluations on functions of Tele-Coaching Intervention in patients with spinocerebellar degeneration. *NeuroRehabilitation* 23, 159-169, 2008.
17. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Hollander G, Shima D, Habu S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med.* 205, 2507-2513, 2008 IF14.5 85. Matsushita H, Nakajima H, Nakamura Y, Tsukamoto H, Tanaka Y, Asai S, Ono R, Nosaka T, Hotta T, Ando K, Miyachi H. C/EBPa and C/EBPe induce monocytic differentiation of myelomonocytic cells with MLL-chimeric fusion gene. *Oncogene* 27, 6749-6760, 2008
18. Yahata T, Muguruma Y, Yumino Y, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, and Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26, 3228-3236, 2008
19. Sheng Y, Yahata T, Negishi N, Abe N, Habu S, Hozumi K, and Ando K. Notch ligand Delta-like 1 expression in stromal cells, but not hematopoietic cells, is essential for marginal zone B cell development. *Immunol Lett*, 121, 33-37, 2008
20. Kanda Y, Okamoto S, Tauchi T, Kizaki M, Inokuchi K, Yabe M, Yokoyama K, Ito Y, Kimura Y, Higashihara M, Bessho M, Ando K, Chiba S, Kurokawa M, Oshimi K, Dan K, Ohyashiki K, and Ikeda Y. Multicenter prospective trial evaluating the tolerability of imatinib for Japanese patients with chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: Does body weight matter? *Am J Hematol.* 83, 835-839, 2008

[学会発表] (計 9 件)

1. 八幡 崇他、DNA 損傷の蓄積はヒト造血幹細胞の自己複製能を制限する、日本血液学会、2010 年 9 月、横浜
2. 六車 ゆかり他、骨芽細胞における Delta-like ligand 1 の発現が骨代謝維持に重要である、日本骨代謝学会、2010 年 7 月、東京
3. 八幡 崇他、DNA 損傷の蓄積がヒト造血幹細胞の再生能力を低下させる、日本サイトメトリー学会、2010 年 6 月、東京
4. 八幡 崇他、DNA 損傷によるヒト造血幹細胞の自己複製能の低下、日本血液学会、2009 年 10 月、京都
5. 六車 ゆかり他、Importance of Notch signals in hematopoietic homeostasis, The 26th Natio Conference on Osteobiology, 2009. 11, 兵庫県
6. 八幡 崇他、ヒト造血幹細胞の造血再生の動態と老化、日本再生医療学会、2009 年 3 月、東京
7. 六車 ゆかり他、骨髄異形成症候群の in vivo モデルの確立、日本血液学会、2008 年 10 月、京都
8. 八幡 崇他、骨髄造血微小環境の恒常性維持における JaggedI 分子の重要性、日本血液学会、2008 年 10 月、京都
9. 八幡 崇他、FACS を用いたヒト造血幹細胞の生体内における性状解析。日本サイトメトリー学会、2008 年 6 月、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 潔 (ANDO KIYOSI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014