

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009年～2010年

課題番号：21790983

研究課題名 (和文) NOG マウスを用いた小児白血病幹細胞の同定と

その特性・体内動態に関する研究

研究課題名 (英文) Study on isolation, characteristic and distribution of
pediatric leukemic stem cell using NOG mouse model

研究代表者

藤野 寿典 (FUJINO HISANORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70532604

研究成果の概要 (和文) :NOG マウスを用い、マウス内にヒト白血病細胞を非常に良く生着させ、髄外病変を含めたヒト白血病環境を極めて忠実に再現する系を確立した。この系の詳細な解析により、骨髄に加え肝臓、特に門脈周囲領域が重要なヒト白血病幹細胞ニッチであることを示した。門脈周囲領域に存在する白血病細胞が骨髄に存在する白血病細胞と異なった特性を持っていること、更には胆管上皮細胞と白血病細胞が SDF-1/CXCR4 axis を介して微小環境を構成していることを示した。これらの結果は、白血病髄外病変をターゲットとする新規治療法の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要 (英文) :Primary samples from patients with leukemia were successfully engrafted into mice, and those engrafted leukemic cells were able to be serially transplanted into secondary, tertiary recipients. Morphological and FACS analyses revealed as high as >80% blood chimerism and conserved blast phenotypes through serial transplantations. Moreover, extramedullary organs including liver, spleen and kidney showed the leukemic invasion consistent with donor disease. Immunohistological analysis of liver revealed that SDF-1 was detectable only in bile duct epithelial cells. In addition, we demonstrated directly the effect of SDF-1/CXCR4 axis in our model by using the CXCR4 inhibitor both in vivo and in vitro. Our study on the involvement of SDF-1/CXCR4 axis in liver could link to the novel therapies which target the extramedullary sites in order to perfectly overcome leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡は 1981 年に主要死因の 1 位となった後も増え続け、いまや全主要死因の 30% を占める。小児においてがんの発症頻度は 1 万分の 1 と決して多くはないものの、小児がんによる死亡は全小児主要死因の 7 分の 1 を占め、その病態解明、治療開発の必要性はますます高まっている。小児がんの最も多く (35%) を占める小児白血病は、検査・診断法の進歩、化学療法や支持療法の発達、分子標的薬剤の開発や移植療法の発展により治癒率が画期的に改善されており、無病長期生存が期待される疾患の一つである。とはいえ、化学療法抵抗例、再発例も確実に存在し決して克服された疾患とは言えない。

小児白血病は言うまでもなく正常血球ががん化した病気であり、その本質に迫るためには、正常造血幹細胞システムの理解が必須である。造血幹細胞は「多分化能」と「自己複製能」を併せ持った増殖能力の高い細胞である。また一旦分化の方向を選択すると本来の多分化能と自己複製能は次第に失われ、多能性前駆細胞、前駆細胞を経て最終的に成熟血球細胞となるという「階層性」を有する。

以上のような正常造血幹細胞システムを基礎に、白血病細胞の中にも幹細胞システムに類似した「階層性」が存在し、白血病細胞を供給しながらがん状態を構成している可能性、いわゆる「白血病幹細胞」なる概念が近年提唱されている。すなわち、無限に自己複製を行う白血病幹細胞が存在する一方、不均等分裂により一部が自己複製のサイクルから逸脱して分化し、白血病細胞となるという考えである。この白血病幹細胞が化学療法に対する抵抗性、再発に重要な役割を果たしているという概念は、臨床の白血病治療における「微小残存腫瘍量 (MRD) の根絶」「total kill theory」という理念とも相容れやすい。

歴史的に上記のヒト造血幹細胞及びヒト白血病幹細胞の「階層性」を明らかにする *in vivo* モデルに、NOD/SCID をはじめとした免疫不全マウスが用いられることが多い。我々は、NOD/SCID としての背景を有しかつ細胞性免疫が重度に障害された NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス (以下 NOG マウス) へヒト造血幹細胞を異種移植することで、ヒト T リンパ球、B リンパ球、NK 細胞、好中球、血小板、肥満細胞等様々な血球細胞を *in vivo* で分化誘導する系を確立している (参考文献: Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, 他 4 名: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammanull mice model. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):873-80.)。更にこの系を用い、ヒト造血幹細胞が胚葉のバリアを超え、恒常的に肝細胞と融合を起こし、肝特異的蛋

白を発現する能力を持つことを見出している (参考文献: Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, 他 8 名: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/gamma(c) null mice through cell fusion. *FASEB J*. 2007 Nov;21(13):3499-510.)。

2. 研究の目的

ヒト正常造血系の評価に極めて有用な NOG マウスモデルを、更にヒト小児白血病幹細胞解析のモデルとしても使えるのではないかとこの観点より、今回の研究を着想した。白血病に罹患した患児に末梢血や骨髄以外の臓器浸潤・臓器腫大 (いわゆる髄外浸潤) を認めることは決して少なくない。このマウスモデルが白血病患者の体内の白血病細胞の動態を極めて忠実に再現可能であろうことが予想され、本研究にて小児白血病幹細胞の同定とその特性・体内動態を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 患児の骨髄・末梢血から得たヒト白血病細胞を、NOG マウスに経静脈的に移植する。移植後経時的にマウスより骨髄・末梢血・他実質臓器 (リンパ節・肝臓・脾臓・腎臓・生殖器・脳等) を採取する。

a. 血球成分をサイトスピン後、メイギムザ染色による形態観察、BrdU 染色による分裂状態の評価を行う。末梢血については自動血球計によるカウントを行う。

b. 骨髄・他実質臓器についてはパラフィン切片を作成し、HE 染色や免疫染色を行う。以上を組み合わせ、ヒト白血病細胞のマウス各臓器への生着、分裂増殖、末梢血への出現といった経時的動態を評価し記録する。

(2) FCM を用い、マウス末梢血中のヒト白血病細胞及びマウス骨髄・各臓器に生着したヒト白血病細胞との細胞表面抗原、細胞周期に相違があるかを評価する。

(3) マウス末梢血・骨髄・各臓器に生着したヒト白血病細胞を細胞数を振って二次移植し、どの組織由来の白血病細胞がよりキメリズム上昇に寄与するかを検討する。

以上の方法により小児白血病幹細胞を示唆する指標 (表面マーカー等) の候補、及び骨髄以外に小児白血病幹細胞の受け皿として働きうる臓器の候補を絞り込む。

(4) 白血病幹細胞の受け皿として鍵となる

臓器の候補につき、骨髄に対応した支持細胞が存在するかを組織学的に評価する。その臓器において骨髄における SDF-1/CXCR4, Tie2/Ang1 の如く両者の細胞間接着に重要な因子が同定されれば、薬剤・抗体などで解除することを試みる。

以上の方法により白血病幹細胞とそのニッチとしての支持細胞を明らかにする。

(5) 小児白血病に対する既知の治療(放射線療法・化学療法)を、あらかじめ移植を行いヒト白血病細胞が高いキメリズムをもって生着したマウスに対して行い、上記によって明らかにされた白血病幹細胞がいかに排除されるのか、細胞周期解析や組織学的検討によって明らかにする。

4. 研究成果

(1) 小児急性リンパ性白血病患児の骨髄・末梢血から得たヒト白血病細胞を、放射線照射等の前処置なしで NOG マウスに経静脈的に移植した結果、効率的にかつ 80%以上の高いキメリズムをもってマウス骨髄・末梢血・リンパ節にヒト白血病細胞の生着を確認した。二次・三次移植を行っても同じ表現型の白血病を再現でき、この系が自己複製能をもつ白血病幹細胞を継代できる系であることを確認した。また組織学的な評価にて、肝臓・脾臓・腎臓・脳をはじめとした様々な髄外臓器に、ヒト白血病細胞の浸潤像を確認した。

(2) 小児急性リンパ性白血病患児の初診時にしばしば肝腫大を合併する背景もあり、今回はこれら髄外臓器の中で肝臓に注目し、肝臓内の白血病細胞の分布・特性の評価を行った。その結果、

a. 移植後月日の経過、ヒト細胞キメリズムの増加に伴いマウス肝臓が腫大し、肝臓内のヒト白血病細胞の数が増加すること、

b. ヒト白血病細胞がマウス肝臓構造内の特に門脈周囲にクラスターを作ること、

c. BrdU 染色、細胞周期解析によりマウス肝臓内に分裂増殖を繰り返すヒト白血病細胞が存在すること、

d. ヒト白血病細胞の生着したマウスに Ara-C を投与することにより、肝臓内門脈周囲のクラスターが一旦縮小するものの、根絶はされず再増殖に転ずること、

を見いだした。

以上の結果より、ヒト細胞を非常に良く生着させる NOG マウスを用いた系により、骨髄に加え肝臓、特に門脈周囲領域が重要なヒト白血病幹細胞ニッチであることを確認した。

(3) 肝臓内門脈周囲領域における白血病幹細胞ニッチ構成に関わる重要な因子を同定すべく NOG マウス肝臓内のヒト白血病細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、肝臓内の白血病細胞が、他臓器内の白血病細胞に比べより高頻度で CXCR4 を発現していることを見いだした。更に胆管上皮細胞が CXCR4 のリガンドである SDF-1 を発現しており、組織学的に両者が密着し存在していることを確認した。

(4) NOG マウス肝臓内のヒト白血病細胞の遊走能、コロニー形成能、二次移植による生着効率が他臓器内の白血病細胞に比べ増加していることを確認した。更にヒト白血病細胞の生着したマウスに、SDF-1/CXCR4 Axis をブロックする AMD3100 と AraC を同時投与することにより、AraC 単独群に比べ肝臓内の白血病細胞の再増殖を抑制できた。

以上の結果より、肝臓に存在する白血病細胞が骨髄その他の臓器に存在する白血病細胞と異なった特性をもっていること、肝臓において胆管上皮細胞と白血病細胞が SDF-1/CXCR4 Axis を介して微小環境を構成していることが明らかとなった。

急性リンパ性白血病のみならず他の白血病についても、これまで骨髄以外の髄外臓器における白血病幹細胞の動態につきその詳細は明らかでない。移植前処置を必要とせず、ヒト環境を極めて忠実に再現していると思われる今回の NOG マウスを用いた系により、肝臓の微小環境の詳細と SDF-1/CXCR4 axis の重要性が明らかとなった。これらの知見は、白血病髄外病変をターゲットとする新規治療法の開発に役立つと考えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

Itaru Kato, Hisanori Fujino 他: Blockage of SDF-1-CXCR4 Axis by AMD 3100 Can Be a Novel Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia by Targeting the Extramedullary Sites of Leukemic Cells. ASH (American society of hematology) annual meeting 2009. 12. 5. New Orleans

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 寿典 (FUJINO HISANORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70532604