

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22249039

研究課題名（和文） 新たな治療戦略確立のためのヒト慢性骨髄性疾患腫瘍幹細胞の同定

研究課題名（英文） Characterization of tumorigenic stem cells in myeloid neoplasms

研究代表者

赤司 浩一（AKASHI KOICHI）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80380385

研究成果の概要（和文）：

多様な骨髄腫瘍性幹細胞の特性を理解するには、マウス異種移植による機能解析が不可欠である。我々は、マクロファージ寛容の導入によりヒト造血再構築能を高め、B6 バックグラウンドとすることで繁殖性を担保した次世代免疫不全マウスを新規に開発した。この系を用いることで、原発性骨髄線維症幹細胞が線維芽細胞や血管内皮細胞などの非血球系多分化能を有することを明らかにした。また、慢性骨髄性白血病幹細胞および骨髄異形成症候群幹細胞を純化し、治療標的となり得る分子の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：

To understand the property of tumorigenic stem cells in diverse myeloid neoplasms, it is necessary to develop an efficient xenotransplant model. We established a novel immunodeficient mouse strain that possessed a high capability to reconstitute human hematopoiesis. This strain was named C57BL/6.Rag2-null-Il2rg-null mice harboring NOD-Sirpa (BRGS). Using the BRGS xenotransplant system, we characterized primary myelofibrosis (PMF) stem cells, and found that PMF stem cells actively differentiated into fibroblastic cells and endothelium in vivo. We also purified chronic myeloid leukemia stem cells and myelodysplastic syndrome stem cells, and identified several tumor specific molecules that might be candidates for therapeutic targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2012年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

研究分野：造血幹細胞学

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：腫瘍性幹細胞、骨髄増殖性腫瘍、骨髄異形成症候群、異種移植、マクロファージ寛容

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、自己再生能力を持つ一部の腫瘍性幹細胞を起源とすることが、主として動物モデルにおいて提唱されてきた(吉田富三: JNCI 12, 1952)。重症免疫不全マウスを用いた異種移植の開発と細胞純化技術の進歩により、ヒト急性骨髄性白血病(AML)を再構築できる AML 幹細胞分画が同定された(Nat Med, 1997)。この AML の源とも言える AML 幹細胞

を有効に死滅させることが出来れば、理論的には根治が得られる。我々は、平成 17-21 年度基盤研究 S「造血システムにおける腫瘍性幹細胞およびその悪性化に関する遺伝子の同定」において、AML 幹細胞に特異的に発現する表面抗原を複数同定した。その中から、特に正常幹細胞に発現が認められない AML 幹細胞特異的抗原として TIM3 を抽出した。この TIM3 を標的とした in vivo 治療法を開発

し、ヒト AML 骨髄を再構築したマウス内で劇的な治療効果を確認した (Cell Stem Cell, 2010)。AML 幹細胞が同定された一方で、その前白血病状態とも言える骨髄増殖性腫瘍 (Myeloproliferative neoplasms: MPN) や慢性骨髄性白血病 (CML)、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) の幹細胞は、多くの研究者の精力的研究にも関わらず未だ同定されていない。慢性骨髄性疾患は造血幹細胞レベルでの腫瘍化が強く示唆されているにも関わらず、ヒト正常造血幹細胞の生着が容易に得られる最新の免疫不全マウスを用いても、疾患の再構築が得られないという不可解な現象がある。この理由として、腫瘍性幹細胞が十分量移植されていない可能性 (細胞側) と免疫不全マウスの骨髄微小環境がこれらの疾患の腫瘍性幹細胞を維持できない、もしくは排除している可能性 (ホスト側) が考えられる。本研究において、この細胞側およびホスト側に起因する問題点について両面から改良を加え、MPN や MDS を生体内で再構築可能な腫瘍性幹細胞の同定を目指す。さらに、この腫瘍性幹細胞の特異的抗原やその維持機構を明らかにすることで、有効な治療標的を決定することが可能となる。

2. 研究の目的

原発性骨髄線維症 (PMF)、真性多血症 (PV)、本態性血小板増多症 (ET) などの JAK2 変異関連 MPN、CML、さらに MDS の腫瘍性幹細胞分画を同定する。そのための基盤技術として、次世代ヒト腫瘍性幹細胞アッセイシステムを新たに構築する。NOD 変異は異種移植効率を上げるが、我々はその原因が SIRPA 遺伝子における NOD 特有の多型にあり、マウスマクロファージ上の NOD 型 SIRPA がヒト幹細胞上の CD47 と効率よく結合することにより、貪食による拒絶が抑制されていることを報告した (Nat Immunol 8, 2007)。しかし、NOD マウスは繁殖性に乏しく、腫瘍の自然発症が問題となるため、NOD 型 SIRPA を組み込んだ B6 バックグラウンドの次世代免疫不全マウスを作製する。また、骨髄性白血病幹細胞の重要な増殖因子である IL-3 は、マウスとヒトで交差しないため、マウス内で有効に働いていない。制御されたヒト IL-3 分泌が可能なヒト IL-3 ノックインマウスを作製し、上述の免疫不全マウスと交配することで、高効率異種移植システムの確立を目指す。このように、ヒト慢性骨髄性腫瘍幹細胞の生着・増殖に最適化した次世代免疫不全マウスを作製して、MPN、CML および MDS の幹細胞を同定し、腫瘍幹細胞の表現型・機能解析を行うための新たな実験基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 次世代免疫不全マウスの開発

IL2Rg-null-NOD/SCID (NOG) strain の短所は、繁殖能力が弱いためラインの維持が極めて難しいことであった。common healthy strain である C57/BL6 バックグラウンドで、なおかつ NOG を越える異種免疫寛容の導入を図るために、B6. Rag2-null-IL2Rg-null マウスに、NOD 型 SIRPA 変異を導入した免疫不全マウスを新規に作製した。また、ヒト型 IL-3 をノックインし、上述の免疫不全マウスとクロスすることで、骨髄系腫瘍を効率よく再構築する異種移植系を確立した。

(2) 原発性骨髄線維症 (PMF) 幹細胞の同定

MPN のうち、PMF、PV、ET 症例の約半数において、共通の異常増殖性シグナルの原因として JAK2 変異が見つかることから、これらは近縁疾患と言えるが、何故それぞれ異なる病型を取るのかは明らかでない。まず、PMF に焦点を当てて、異種移植による幹細胞の同定と細胞特性の解析を行った。

(3) 慢性骨髄性白血病 (CML) 幹細胞の同定

休眠期 CML 幹細胞を純化し、その生存に関与する治療標的分子の抽出を行った。

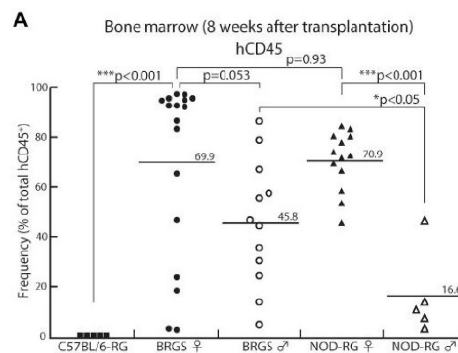
(4) 骨髄異形成症候群 (MDS) 幹細胞の同定

MDS の病期進行に伴い、その幹細胞特性がどのように変化するかについて、各病期の MDS 患者骨髄より幹細胞分画を純化し、細胞特性解析と治療標的分子の抽出を試みた。

4. 研究成果

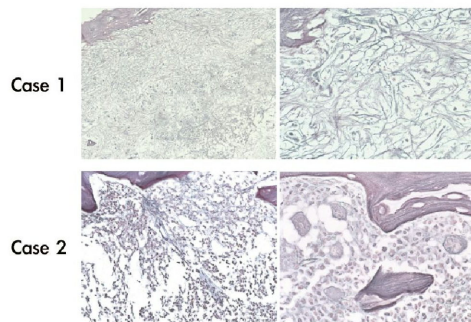
(1) 次世代免疫不全マウスの開発

C57/BL6 バックグラウンドであるため繁殖性に優れ、かつ NOD 型 SIRPA を持つためマクロファージ寛容も担保された C57BL/6. Rag2-null-Il2rg-null-NOD-Sirpa strain (BRGS) を作製した。下図に示すように、NOG strain と同等以上のヒト造血生着効率を確認した (Blood 121, 1316-1325, 2013)。また、ヒト IL-3 ノックインマウスも予定通り作製し、BRGS との交配も順調に進んでいる。本研究期間内に、骨髄性腫瘍の再構築実験に着手可能な段階まで到達することができた。

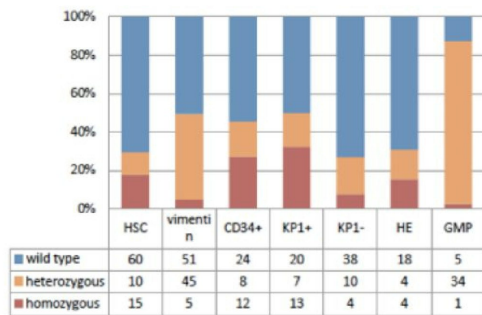


(2) PMF 幹細胞の非血球系多分化能
 PMF 患者末梢血中に CD45⁺CD34⁺CD38⁻ phenotype を有する未分化造血細胞が存在することを見いだした。この細胞を純化し NOG 新生仔に移植したところ、ヒト PMF 類似の骨髓系優勢の造血再構築が長期に得られ、さらに徐々に進行する骨髓繊維化が再現された。さらに驚くべきことにマウス中の骨髓線維芽細胞はヒト由来であった。以上から、PMF の病態は、腫瘍幹細胞の線維芽細胞系列への系統決定および増殖の異常を基礎としていると考えられた (論文投稿準備中)。

NOGマウスにおけるヒトPMFの再現

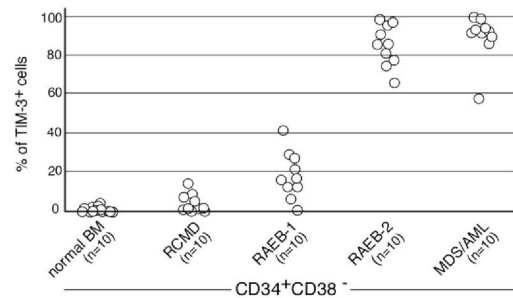


JAK2 変異陽性 PMF 患者骨髓中の線維芽細胞および血管内皮細胞を single cell で解析したところ、下図に示すように共通の JAK2 変異を有しており、PMF 幹細胞の非血球系多分化能を確認することができた。

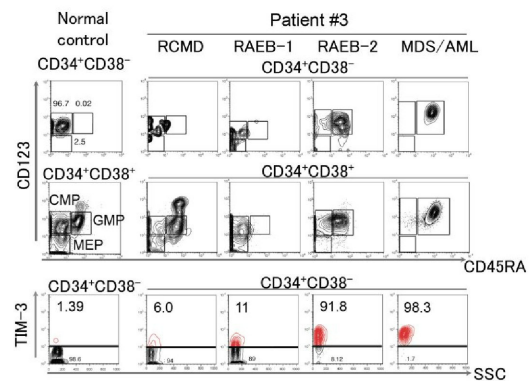


(3) CML 幹細胞の治療標的分子
 CD34⁺CD38⁻ phenotype の CML 幹細胞を純化し、特異的に発現する遺伝子を複数同定した。この内 GAS2 は、正常造血幹細胞には全く発現しておらず、CML 幹細胞特異的な治療標的分子の候補である。GAS2 は calpain を抑制することで β catenin の分解を抑制することが知られており、CML 幹細胞の β catenin 依存性生存・増殖に関与している可能性が高い。今後は、ノックダウン実験と異種移植を組み合わせることによって、CML 幹細胞における機能と治療標的としての妥当性を評価する。

(4) MDS 幹細胞の治療標的分子
 我々は、AML 幹細胞に特異的に高発現する分子 TIM-3 を同定し、TIM-3 を標的とした抗体治療により、in vivo でヒト AML 幹細胞の根絶に成功した (Cell Stem Cell 7, 2010)。本研究で、前白血病状態である MDS においても、TIM-3 が異常造血幹細胞を識別する有効なマーカーである事を見出した。下図に MDS 患者 40 例における TIM-3⁺腫瘍幹細胞分画の変化を示す。TIM-3⁺腫瘍性細胞は、芽球増加を認めない多血球系異形成を伴う不応性血球減少 (RCMD) では、CD34⁺CD38⁻分画の一部のみであったが、病期進行に伴いその割合が増加し、AML に移行すると TIM-3⁺白血病幹細胞で完全に占められていた。



下図に、同一症例で CD34⁺CD38⁻ 幹細胞分画における TIM-3 発現レベルの変化を経時的に評価した結果を提示する。病期進行とともに CD34⁺CD38⁻ 幹細胞分画内が TIM-3⁺腫瘍性幹細胞により占拠されていく事が明らかである。



これらの解析結果で注目すべき点は、RAEB-1 や RAEB-2 といった骨髓中の芽球の割合がそれぞれ 10%以下、20%以下の比較的少ない病期においても、CD34⁺CD38⁻ 幹細胞分画の多くの細胞が、TIM-3⁺腫瘍性幹細胞である点である。則ち、骨髓全体での芽球の増加に先行して、TIM-3⁺腫瘍性幹細胞プールの増大が生じていると考えられる。病期進行と幹細胞分画内の TIM-3⁺細胞の増加が相関していることから、TIM-3 をマーカーとして用いることにより、これまで純化が困難であった MDS の腫瘍性幹細胞が純化できると考えられる。以上の知見を基に純化した MDS 幹細胞分画を次世代免疫

不全マウスへ異種移植することで、MDS 幹細胞の特性を評価すると同時に、遺伝子発現プロファイリングによる腫瘍化機序の解明、治療標的分子の同定を今後進めていく。

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 7 件)

①Kikushige Y, Akashi K.

TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia.

Ann NY Acad Sci 1266, 118-123, 2013.

doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06550.x. Review.

査読あり

②Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K.

Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment.

Blood 121(8), 1316-1325, 2013.

doi: 10.1182/blood-2012-06-440354.

査読あり

③Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K.

Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Blood 121(5), 840-848, 2013.

doi: 10.1182/blood-2012-02-409607.

査読あり

④ Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K.

Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis.

Blood 120(19), 4058-4067, 2012.

doi: 10.1182/blood-2012-02-408864.

査読あり

⑤Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K.

Self-renewing hematopoietic stem cell is the

primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Cell 20(2) 246-259, 2011.

doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.029.

査読あり

⑥Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K.

JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation.

Br J Haematol 150(3), 334-344, 2011.

doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08249.x.

査読あり

⑦Kikushige Y, Shima T, Takayanagi SI, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K.

TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells.

Cell Stem Cell 7(6), 708-717, 2010.

doi: 10.1016/j.stem.2010.11.014.

査読あり

[学会発表] (計 8 件)

①Akashi K.

Transcription factor regulation of normal and malignant hematopoiesis.

2013 USA-Japan Science Conference

2013年3月26日 (Hawaii, USA)

②赤司浩一

悪性造血器腫瘍における癌幹細胞の病理

第71回日本癌学会

2012年9月21日 (札幌)

③赤司浩一

慢性リンパ性白血病幹細胞の特性と治療応用

第10回日本臨床腫瘍学会

2012年7月28日 (大阪)

④赤司浩一

造血器悪性幹細胞の成立機序

第101回日本病理学会

2012年4月26日 (東京)

⑤Akashi K.

Transcription factor regulation in normal and malignant hematopoiesis.

第53回米国血液学会

2011年12月 (San Diego, USA)

⑥Akashi K.

Origin of leukemic stem cells.

ドイツ造血幹細胞学会
2011年9月 (Tubingen, Germany)

⑦Akashi K.

Leukemic stem cells.
第16回ヨーロッパ血液学会
2011年7月 (London, UK)

⑧赤司浩一

白血病幹細胞を考える
第72回日本血液学会総会
2010年9月24日 (横浜)

[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

九州大学第一内科

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>

新学術領域研究

「癌幹細胞を標的とする腫瘍根絶技術の新構築」

<http://www.cancer-stem-cell.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80380385

(2) 研究分担者

宮本 敏浩 (MIYAMOTO TOSHIHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70343324

竹中 克斗 (TAKENAKA KATSUTO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：30301295

岩崎 浩己 (IWASAKI HIROMI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：20403925