

## 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24年5月15日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790910

研究課題名（和文）骨髄微小環境ニッチによる白血病幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）Control of leukemic stem cells by the bone marrow microenvironments

研究代表者

杉山 立樹（SUGIYAMA TATSUKI）

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：10456791

研究成果の概要（和文）：白血病は分化段階や増殖能力が異なる様々な細胞で構成されているが、移植してもその一部の細胞のみが再び腫瘍を形成できることから、白血病はその一部の細胞すなわち白血病幹細胞に由来し、これが自己複製しつつより分化した増殖能の限られた白血病細胞を生み出し、白血病の病態を形成すると考えられるようになった。白血病幹細胞は、癌治療において最も重要な標的であるが、抗がん剤へ抵抗性が高く白血病の難治性や再発の原因となると考えられている。この白血病治療において最も重要な標的である白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と同様に特殊な骨髄微小環境（ニッチ）による制御を受けて自己複製、生存をしていると考えられるが、その実体は十分明らかではなかった。本研究は、慢性骨髄性白血病モデルマウスを用いて、(1)慢性骨髄性白血病モデルマウスでは、病気の進行に伴い骨髄のケモカイン CXCL12 の発現低下など骨髄微小環境に異常をきたすことを明らかにした。(2)この異常な骨髄中で、白血病幹細胞が増加することを明らかにした。(3)さらに骨髄におけるBリンパ球造血が障害され、このとき IL-6 などの炎症性サイトカインの蛋白濃度が上昇していることを明らかにした。(4)白血病幹細胞を含む未分化白血病細胞の骨髄微小環境における局在およびそのニッチ構造を明らかにした。これらの結果は、骨髄微小環境が白血病治療法の標的となりうることを示唆し、新たな白血病治療法開発のための基礎をなすものである。

研究成果の概要（英文）：In the bone marrow, leukemic stem cells (LSCs), the most important target for leukemic therapy, are maintained by special microenvironments, termed niches. The nature and function of these niches, however, remains unclear. Here we showed that using mouse chronic myeloid leukemia model, (1) the microenvironments in bone marrow were altered with progression of leukemia, (2) LSCs grew up in altered microenvironments, (3) B lymphopoiesis in the bone marrow was impaired along with elevated inflammatory cytokines (e.g. IL6), and (4) identified candidates of cell components of LSC niches. These studies offer innovative strategies for leukemia therapy targeting the LSCs niches.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血液腫瘍学、白血病幹細胞ニッチ、白血病、ケモカイン、CXCR4

## 1. 研究開始当初の背景

白血病は分化段階や増殖能力が異なる様々な細胞で構成されているが、移植してもその一部の細胞のみが再び腫瘍を形成できることから、白血病はその一部の細胞すなわち白血病幹細胞に由来し、これが自己複製しつつより分化した増殖能の限られた白血病細胞を生み出し、白血病の病態を形成すると考えられるようになった。白血病幹細胞は、癌治療において最も重要な標的であるが、抗がん剤へ抵抗性が高く白血病の難治性や再発の原因となると考えられている。

近年の遺伝子改変マウスを用いた研究により、白血病幹細胞はその維持に造血幹細胞と共通の分子メカニズムを利用しつつも、発生や維持に異なる分子を必要とすることが明らかとなりつつあり、この相違が白血病幹細胞を標的とした効果的な新しい治療方法の開発につながると期待されている。

一方、正常造血幹細胞は成体において骨髄内のニッチと呼ばれる特殊な微小環境で、ニッチが産生する分子により一定数維持されると考えられている。白血病幹細胞も正常造血幹細胞と同様に主として骨髄中に存在することは、正常造血幹細胞と同様に白血病幹細胞の維持に骨髄内の特殊な微小環境が必要であることを示唆する。近年、骨髄微小環境で Rb 遺伝子や RAR $\alpha$  遺伝子を欠損させたマウスでは骨髄増殖性疾患を発症することが報告され、骨髄微小環境の異常が白血病の発症や維持に重要な役割を果たしている可能性が示された(Walkley ら Cell 2007, Walkley ら Cell 2007)。さらに、造血細胞で Wnt シグナルの下流とされる  $\beta$ -catenin 遺伝子を欠損させると、連続移植による骨髄再構築能に障害を生じるとともに、遺伝子欠損造血細胞を用いて慢性骨髄性白血病(CML)発症モデルを作成しても CML をほとんど発症しなかったことから、白血病幹細胞が造血幹細胞と同じニッチシグナルを利用していることが示唆された(Zhao ら Cancer Cell 2007)。さらに、ヒト由来白血病細胞株やヒト白血病細胞を高度免疫不全マウスに移植すると、マウス正常造血幹細胞を致死量放射線照射マウスに移植した場合と同様に、骨髄のなかでも骨辺縁に生着し、抗がん剤投与後の残存腫瘍が骨辺縁および血管周囲に存在することが報告され、白血病幹細胞が正常造血幹細胞と共通のニッチを占めている可能性が示された(Ishikawa ら Nature Biotech. 2007, Ninomiya ら Leukemia 2007)。また、

一方で CD44 遺伝子欠損マウス由来の CML 細胞は、CD44 欠損造血幹細胞と違い、血流を介した骨髄へのホーミングおよび生着に障害が見られ、骨髄内への移植で骨髄に生着できたことは、ある種の白血病幹細胞は正常造血幹細胞とは違う分子メカニズムで血流から骨髄内ニッチに到達することを示している(Krause ら Nature Med. 2006)。これらの研究結果は、正常造血幹細胞と同様に、骨髄内微小環境による白血病幹細胞の制御システムが重要性であることを示唆しているが、白血病幹細胞ニッチの実体や制御の分子機構は十分明らかでない。白血病治療において最も重要な標的である白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と表現形および機能的に極めて類似しつつも微妙に異なる性質を持つことが明らかとなってきた。一方、白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と同様に特殊な骨髄微小環境(ニッチ)による制御を受けて自己複製、生存をしていると考えられるが、その実体は十分明らかではない。

ケモカインは、保存された構造で定義された一群のサイトカインの総称で、白血球に対し強い細胞遊走誘導活性を有する炎症性メディエーターとして知られていた。申請者の所属する研究グループは、ケモカイン CXCL12 (SDF-1/PBSF) を B リンパ球の増殖促進因子として培養ストローマ細胞株より同定し(PNAS 1994)、CXCL12 およびその受容体 CXCR4 の遺伝子欠損マウスの解析から、このケモカインシグナルが、胎児肝における B リンパ球の産生、造血幹細胞の胎児骨髄への生着、心形成、臓器特異的な血管形成に必須であることを見出した(Nature 1998, Nature 2001, Immunity 2003)。さらに、主として時間特異的 CXCR4 欠損マウスを用いた研究で、CXCL12-CXCR4 ケモカインシグナルが成体骨髄における造血幹細胞集団の維持に必須であることを明らかにした。造血幹細胞の大部分は骨辺縁および血管内皮細胞周囲のいずれにおいても骨髄間質細胞のうち CXCL12 高発現細胞(CAR 細胞)に接着していることを見出し、CAR 細胞が造血幹細胞ニッチの主要な構成成分のひとつであることを示唆した(Immunity 2006)。

CXCR4 は多くの腫瘍細胞で発現しており、様々な癌で CXCR4 の発現量が予後因子であることが報告されており、腫瘍の病態生理に重要であることが示唆されている。最近、ヒトの腫瘍細胞を免疫不全マウスへ移植する系を用いて、乳癌の骨髄への転移、急性リ

ンパ性白血病の骨髄への生着に重要であることが報告された(Muller ら *Nature* 2001, Spiegel ら *Blood* 2004)。さらに、ごく最近、乳癌内の間質細胞から分泌される CXCL12 が乳癌細胞の増殖や血管浸潤を促進することが報告され、癌細胞と間質細胞の相互作用が癌を促進し、そこにこのケモカインシグナルが重要であることが示された(Orimo ら *Cell* 2005)。しかしながら、従来の癌における CXCL12-CXCR4 ケモカインシグナルの役割に関する研究は、ヒトとマウス間の異種移植の系や試験管内の実験系に対し CXCR4 に対する中和抗体や阻害剤を用いたものであり、生体内の生理的条件における腫瘍あるいは癌幹細胞の発生、維持や増殖、微小環境との相互作用における CXCL12-CXCR4 ケモカインシグナルの役割はほとんど明らかではない。

## 2. 研究の目的

正常造血幹細胞に必須の CXCL12-CXCR4 ケモカインシグナルに注目し、癌幹細胞の存在が確立しているマウス白血病モデルを用いて、CXCR4 遺伝子を欠損させ、生体内の生理的条件下の骨髄微小環境においてこのケモカインシグナルが白血病幹細胞の発生、維持あるいは生着を制御しているかを明らかにすることを目的とする。

さらに、白血病幹細胞の骨髄微小環境における細胞動態を組織学的に解析して白血病幹細胞ニッチの構成細胞を同定し、その機能を解析することで、骨髄微小環境による白血病幹細胞制御システムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

白血病のモデルとしてプロトコールが既に確立し、造血幹細胞が癌化の標的とされる慢性骨髄性白血病のマウスモデルを用いて、成体造血幹細胞の維持に必須であるケモカインレセプター CXCR4 遺伝子を欠損させ、生体内での白血病幹細胞の病態生理における CXCR4 の役割を検討した。CML モデルマウスの作成は、マウス骨髄細胞に CML の要因となる BCR-ABL 融合遺伝子をレトロウイルス(他機関にて作成)で強制発現させ、放射線照射したマウスへ移植する方法を用いた。

白血病幹細胞を含む未分化白血病細胞を可視化し、生体骨髄内における白血病幹細胞と骨髄微小環境構成細胞との相互作用を解析し、骨髄微小環境による白血病幹細胞制御システムを解析した。

## 4. 研究成果

(1)慢性骨髄性白血病モデルマウスでは、病気の進行に伴い骨髄のケモカイン CXCL12 の発現低下など骨髄微小環境に異常をきたすことを明らかにした。(2)この異常な骨髄中で、白血病幹細胞が増加することを明らかにした。(3)さらに骨髄における B リンパ球造血が障害され、このとき IL-6 などの炎症性サイトカインの蛋白濃度が上昇していることを明らかにした。(4)白血病幹細胞を含む未分化白血病細胞の骨髄微小環境における局在およびそのニッチ構造を明らかにした。

これらの結果から、造血微小環境の異常が慢性骨髄性白血病の病態形成に重要であることが明らかにするとともに、白血病幹細胞を維持するニッチ細胞の候補を同定した。しかしながら、この造血微小環境の異常が生じる分子メカニズムは不明である。そこで、今後は骨髄微小環境の異常が生じる分子メカニズムに明らかにできれば、これを標的とした新たな白血病治療の開発が期待され、本研究はその基礎をなすものである。

## 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 6件)

- ① Takashi Nagasawa, Yoshiki Omatsu, and Tatsuki Sugiyama. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 32(7):315-320, 2011  
査読なし  
DOI: 10.1016/j.it.2011.03.009
- ② Tatsuki Sugiyama and Takashi Nagasawa. Emergency evacuation! Hematopoietic niches induce cell exit in infection. *Immunity* 34(4):463-465, 2011  
査読なし  
DOI: 10.1016/j.immuni.2011.04.009
- ③ Sachie Hiratsuka, Dan G. Duda, Yuhui Huang, Shom Goel, Tatsuki Sugiyama, Takashi Nagasawa, Dai Fukumura, and Rakesh K. Jain. C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

108(1),302-307, 2011

査読あり

DOI: 10.1073/pnas.1016917108

- ④ Mamiko Noda, Yoshiki Omatsu, Tatsuki Sugiyama, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii N, and Nagasawa T. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood* 117(2);451-458, 2011 査読あり  
DOI: 10.1182/blood-2010-04-277897
- ⑤ Yoshiki Omatsu, Tatsuki Sugiyama, Hiroshi Kohara, Gen Kondoh, Nobutaka Fujii N, Kenji Kohno, and Takashi Nagasawa. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33(3):387-399, 2010 査読あり  
DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.017
- ⑥ 長澤丘司、尾松芳樹、杉山立樹、幹細胞の維持と血管性ニッチ 細胞工学、Vol.29、No.11、2010、pp.1082-1086 査読なし

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 長澤丘司、尾松芳樹、杉山立樹、造血幹細胞のニッチェと造血調節 Annual Review 血液 2012、2012、1

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/se03/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 立樹 (SUGIYAMA TATSUKI)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：10456791

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし