

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591392

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群幹細胞の同定による新規分子標的の探索

研究課題名(英文) Targeting cancer stem cells in myelodysplastic syndrome

研究代表者

竹中 克斗 (Takenaka, Katsuto)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30301295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は高齢者に多く、同種造血幹細胞移植の適応となる一部の若年者を除き、根治的治療法がないのが現状である。近年、がん幹細胞モデルが提唱され、がん幹細胞を標的とした治療法の研究開発が盛んであるが、MDSでは、腫瘍性幹細胞も未だ同定されていない。幹細胞アッセイに用いられる現存の異種移植モデルでは、MDS細胞の生着が非常に低く、MDS幹細胞研究の障壁となっている。本課題では、MDS幹細胞の分離・同定と、疾患モデルマウスを確立を行うための、Rag2欠損、IL2R α 欠損とヒトSIRPAノックインによる完全マクロファージ寛容の導入、ヒトIL-3導入次世代免疫不全マウスラインを樹立した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are therapeutic targets and must be eliminated to cure the patients. However, those cells have not been found yet in myelodysplastic syndrome (MDS). Immunodeficient mice are widely used to reconstitute human hematopoiesis by xenotransplantation of hematopoietic stem cells (HSCs), and this model provides a powerful tool to evaluate biological properties of human cancer stem cells. We found that in xenograft rejection, the innate phagocytic reaction of mouse macrophages could occur because murine SIRPA (mSIRPA) on macrophages cannot bind to human CD47 (hCD47). Thus, introduction of human SIRPA allows mouse macrophage to bind hCD47 on the graft, resulting in inhibition of phagocytic reaction against human cells. Here, we have established a new immunodeficient mouse line, B6-Rag2(null)Il2rg(null) mice with human SIRPA to induce complete macrophage tolerance. This strain should be very useful in xenotransplant experiments to assay MDS stem cells.

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：骨髄異形成症候群 がん幹細胞 免疫不全マウス 異種移植アッセイ SIRPA

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織には、正常な組織幹細胞と同様な性質を持ったごく少数のがん幹細胞が存在しており、この異常な幹細胞が自己複製を行いながら腫瘍を形成すると考えられている。この概念は、造血系腫瘍において初めて、マウスへの異種移植によってヒト急性骨髄性白血病(AML)を再構築可能な“AML 幹細胞”として同定された。AML 幹細胞は化学療法抵抗性で、AML 治療の最終目標は、AML 幹細胞の根絶にあるといえる。このように、がん治療成績の向上には、がん幹細胞自身を標的とした新規治療法の開発が求められる。我々は、AML 幹細胞に特異的に発現する表面抗原を複数同定し、その中から、正常 HSC に発現がみられない TIM3 に注目し、TIM3 を標的とした抗 TIM3 ポリクローナル抗体を作製した。ヒト AML 骨髄で再構築した異種移植後の免疫不全マウスに抗 TIM3 抗体を投与すると、劇的な治療効果が得られており、AML 幹細胞を標的とした新規治療への応用が期待される。このように、AML では、その実用化が目前であるが、高齢者造血器悪性疾患の多くを占める骨髄異形成症候群(MDS)では、その腫瘍性幹細胞も未だ同定されていない。MDS は、多彩な疾患群を含み、臨床経過は症例ごとにきわめて多様で、治療方針も症例によって大きく異なる。MDS は高齢者に多く、同種造血幹細胞移植の適応となる一部の若年者をのぞいて、輸血などの支持療法のみで経過観察される症例がほとんどであった。つい最近、脱メチル化薬などの分子標的薬剤が臨床応用されるようになったが、高齢者ではいまだ標準療法が確立していないのが現状である。これは、MDS では 5q-症候群をのぞいて病型特異的な染色体異常・遺伝子異常が同定されておらず、MDS を対象とした分子標的治療の開発が遅れていることに起因する。

2. 研究の目的

AML では、AML 幹細胞は正常 HSC と同じく CD34+CD38- 分画に存在することが示され、高度に純化可能である。一方で、同じ骨髄系腫瘍である MDS においては、これまで MDS 幹細胞の同定・純化は進んでいない。MDS は、無効造血と血球の形態異常を伴い、AML への進展を伴う非常にヘテロな疾患である。HSC レベルでの腫瘍化が想定されているが、正常 HSC や AML にて確立された免疫不全マウスの実験系を用いても、MDS では、生着率が極端に低く、マウス内で疾患の再構築が得られないことがその障壁となっている。その原因として、免疫不全マウスの骨髄微小環境が MDS 幹細胞を維持できない、あるいは排除している可能性が考えられる。このように、現存する異種移植モデルでは、MDS 幹細胞の生着効率が非常に低く、本研究課題では、これらの障壁を克服し、現在開発中のマクロファージ寛容を導入した次世

代免疫不全マウスをさらに改良し、MDS 幹細胞の純化・同定と、同疾患の in vivo モデルを構築する。さらに、MDS 幹細胞の特性を明らかにし、幹細胞を直接標的とした、あるいは白血病への移行を遮断する分子標的療法の基盤を確立する。

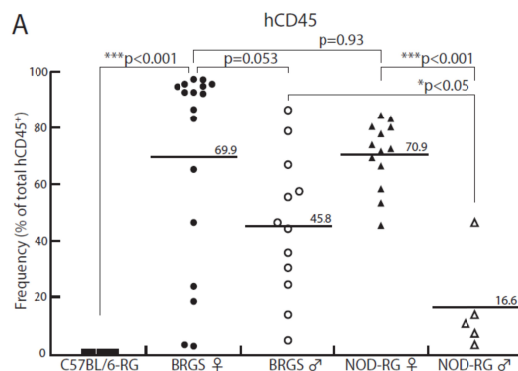
3. 研究の方法

(1)MDS 幹細胞アッセイのための次世代異種移植モデルを確立する。我々は、繁殖能力の高い CB57/BL6 ストレインに、Rag2 欠損、IL2Rg 欠損によってマウス T 細胞分化を完全遮断し、ヒト SIRPA ノックインによる完全マクロファージ寛容の導入と、ヒト IL-3 導入による骨髄系細胞増殖の促進、さらにヒト MSC の骨髄内移植による骨髄微小環境の改善など、MDS 幹細胞の生着効率を高め、MDS 幹細胞の分離・同定と、疾患モデルマウスを確立する。(2)MDS 幹細胞候補分画は、8 カラー FACS Aria SORP を用いて高純度の亜分画を分離し、樹立したラインで検証する。幹細胞分画同定後、マイクロアレイを用いた mRNA/microRNA プロファイリングの解析、デジタル PCR によるスモールスケールでの遺伝子発現解析、プロテアソーム解析などにより、正常 HSC と比較し、MDS 幹細胞の維持・制御に必須な転写因子や特異的表面抗原のスクリーニング、治療標的分子の探索を行う。

4. 研究成果

(1)MDS 幹細胞アッセイのための次世代異種移植モデルの確立

ヒト造血幹細胞のアッセイ系として種々の重症免疫不全マウスを用いた異種移植の系が開発されてきた。いずれも T、B 細胞を欠損した NOD-scid マウスを基本として、さらに免疫不全のための修飾を加えたものである。Il2rg をノックアウトした NOD-scid.Il2rg(null) (NOG) ストレインでは、ヒト造血細胞の生着効率や多系統への分化能が著しく改善されたが、欠点のひとつは、繁殖能力が弱くラインの維持が難しいことであった。そこで、まず我々は、C57/BL6 バックグラウンドで、なおかつ NOG ラインを越える異種免疫寛容の導入を目指した。マクロファージ上に発現する SIRPA とそのリガンドである CD47 との結合は自己認識に用いられて



いるが、我々は、NOD ライン特有の異種移植片寛容の原因が SIRPA 遺伝子多型にあり、ヒト CD47 とレシピエントマウス SIRPA の結合強化により NOD バックグラウンドを超える異種移植寛容の導入が可能であることを見出した (Nat Immunol 2007)。そこで、C57/BL6 バックグラウンドで Rag2 および Il2rg を欠損したマウスに、NOD 型 SIRPA 変異を導入した免疫不全マウス B6.Rag2(null)Il2rg(null)NOD-Sirpa (BRGS) ラインを樹立した。この BRGS マウスにおいては、図に示すように NOG/NSG マウスと同等の良好なヒト造血細胞生着がみられ、C57/BL6 ラインであることから、高い生存・繁殖能力もみられている (Blood2013)。図はヒト臍帯血 CD34+CD38-細胞を各マウスに移植し、移植後 8 週間のマウス骨髄におけるヒト細胞の生着率を示す。この結果は、CD47-SIRPA の結合強化により、さらにヒト細胞の生着効率の改善が期待できることを示している。

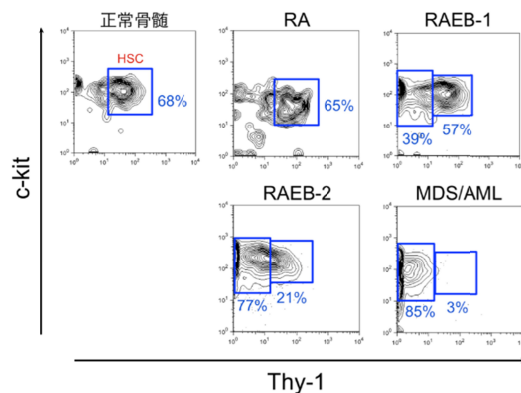
(2)BRGS マウスの改良

この BRGS マウスをベースとして、MDS 幹細胞生着の最適化を試みた。まず、マウスマクロファージによるヒト移植片寛容を完全にするために、ヒト型 SIRPA 遺伝子ノックインラインを作製した。図に示すように、NOD 型 SIRPA よりも、さらにヒト型 SIRPA の方がヒト CD47 への結合が強く、ヒト型 SIRPA 導入により、さらにマクロファージ寛容を今日か可能であった。BRG-ヒト型 SIRPA マウスもすでに樹立しており、MDS 細胞の移植実験を開始している。

また、ヒト正常 HSC の免疫不全マウスへの移植によりマウス内でヒト造血の再構築は可能であるが、造血が B 細胞系に偏る傾向がある。これは、マウス IL-3 はヒト IL-3 と交差活性がないために、ヒト HSC の生着後、骨髄球系細胞の増殖が促進されないためと考えられる。正常 HSC、AML 幹細胞には IL-3 受容体が高発現しており、IL-3 は重要な増殖因子であることから、同時にヒト IL-3 ノックインマウスも作製した。こちらのラインもすでに Rag2(null)、Il2rg(null)の導入は完了し、現在、MDS 幹細胞のアッセイ中である。

(3)MDS 幹細胞の分離・同定

これまで正常 HSC、AML 幹細胞を純化してきた手法を用いて、MDS 骨髄より MDS 幹細胞分画の同定を試みた。MDS は、HSC レベルの未熟細胞のゲノム異常によって生じると考えられ、AML 幹細胞と同様に正常 HSC 分画である CD34+CD38-分画に MDS 幹細胞が存在することが予想される。我々は、MDS の病期進行に伴って骨髄 CD34+CD38-細胞の Thy-1 発現レベルが連続的に低下し、AML と同様に進行期には顆粒球・単球系前駆細胞類似の表面形質を持つ細胞が増加することを見出している (未発表データ)。CD34+CD38-分画から Thy-1、rhodamine-123、TIM-3 を組み合わせて、CD34+CD38-細胞の亜分画を 8 カラー-FACS



Aria SORP を用いて高純度に分離し、上述の新規異種移植アッセイ系にて MDS 再構築能を検証中である。

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 8 件)

Iwamoto C, Takenaka K, 以下 14 名. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. Exp Hematol 2014;42(3):163-71

Yamauchi T, Takenaka K, 以下 12 名. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood 2013;121(8):1316-25.

Fukata M, 以下 14 名、5 番目. Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo. PLoS One 2013;8(5):e62506.

Shima T, 以下 16 名、9 番目. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2013;121(5):840-8.

Kuriyama T, Takenaka K, 以下 12 名. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood 2012;120(19):4058-67.

Kikushige Y, 以下 13 名、12 番目. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell 2011;20(2):246-59.

Takenaka K, 以下 13 名. Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell

transplant recipients. Int J Hematol 2012;96(1):94-100.

Eppert K, Takenaka K, 以下 17 名. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat Med 2011;17(9):1086-93.

〔学会発表〕(計 7 件)

Kuriyama T, Takenaka K, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is caused by engulfment of hematopoietic stem cells by macrophages through stem cell-specific suppression of CD47 under influence of cytokine deregulation. 第 53 回米国血液学会、2011 年 12 月 12 日、サンディエゴ、米国。

Iwamoto C, Takenaka K, et al. The efficient engraftment of human hematopoiesis in the Balb/c strain is mounted by Balb/c-specific SIRPA polymorphism that enhances binding affinity to human CD47. 第 53 回米国血液学会、2011 年 12 月 12 日、サンディエゴ、米国。

竹中克斗. 急性骨髄性白血病幹細胞遺伝子発現プロファイルの臨床的意義. 第 22 回日本サイトメトリー学会(招待講演). 2012 年 6 月 30 日、大阪。

竹中克斗. ヒト造血アッセイのための異種移植システムの進歩. 第 74 回日本血液学会(招待講演). 2012 年 10 月 20 日、京都。

Katsuto Takenaka. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia. 第 55 回米国血液学会、2013 年 12 月 10 日、ニューオリンズ、米国。

Iwamoto C, Takenaka K, et al. BALB/c-specific L29V polymorphism in SIRPA determines the efficient engraftment of human hematopoiesis in xenogeneic model. 第 55 回米国血液学会、2013 年 12 月 9 日、ニューオリンズ、米国。

amauchi T, Shima T, Takenaka K, et al. Fibrotic tissues in human primary myelofibrosis with JAK2 V617F are developed clonally from malignant hematopoietic stem cells. 第 55 回米国血液学会、2013 年 12 月 8 日、ニューオリンズ、米国。

〔図書〕(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹中 克斗 (TAKENAKA KATSUTO)

九州大学病院・遺伝子細胞療法部・講師

研究者番号：30301295

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：