

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591406

研究課題名(和文) RUNX1失活型白血病モデルマウスにおける骨髄微小環境の解析とニッチ因子の同定

研究課題名(英文) Analysis of leukemic microenvironment in RUNX1/EVI1 mouse model

研究代表者

中村 由香 (Nakamura, Yuka)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：RUNX1/EVI1を遺伝子導入した骨髄細胞を移植したマウスにおいては、血小板数の増多、脾腫、骨髄、脾臓での巨核球の増多、脾臓における有核細胞数の増多を認めた。RUNX1/EVI1を遺伝子導入した造血細胞は増殖能を獲得し、コロニー継代回数の増加が認められ、標的遺伝子であるSkp2の発現低下を認めた。一部のマウスにおいてはc-Kit陽性の幼若細胞の浸潤を骨髄、脾臓、肝臓に認め、白血病を発症した。

研究成果の概要(英文)：Mice transplanted with RUNX1/EVI1-expressed bone marrow cells showed increased number of platelets and splenomegaly. In these mice increased number of megakaryocyte was recognized in bone marrow and spleen. RUNX1/EVI1 enhanced colony replating activity of hematopoietic cells. The expression level of Skp2, which is one of a target genes of RUNX1/EVI1, was decreased in colony forming cells gradually. Some mice developed leukemia after transplantation. c-Kit-positive leukemic cells invaded bone marrow, spleen and liver.

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：白血病モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞と定義されており、成体組織には幹細胞により失われた細胞を補充し、組織構築を維持する幹細胞システムが存在する。一方、がん組織においても幹細胞システムに類似した階層性が存在し、ごく少数の一部の細胞ががん組織の構築能を有しがん組織を維持しているという“がん幹細胞”の概念が提唱されている。造血器腫瘍においては、免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)を用いたヒト白血病細胞の異種移植の実験から、白血病を引き起こす能力を持った細胞が、正常なヒト造血幹細胞と同じ CD34+CD38- 分画に高頻度に含まれていることが報告され (Bonnet et al. Nature, 1997)、白血病を構成する細胞の中にも正常造血システムと同様にがん幹細胞を頂点とする階層性が存在することが証明された。白血病を含めがん幹細胞は治療抵抗性であり、がん幹細胞の残存が再発・転移を引き起こすと考えられることから、がん治療においてはこのがん幹細胞をいかに根絶するかが重要であるといえよう。近年の幹細胞研究から、幹細胞の性質は、幹細胞自律的なものだけでなく、幹細胞と隣接する細胞や組織、すなわちニッチ(微小環境)との相互作用により制御されていることが明らかとなっている。がん幹細胞においても同様に、ニッチの重要性が示唆されているものの、ニッチが何であるのか、またどのような制御機構を有しているかは不明な点が多く、これらを明らかにすることが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

白血病幹細胞の維持機構を、白血病モデルマウスを用いて個体レベルで解析する。特に、白血病幹細胞をとりまく微小環境であるニッチの面から解析し、白血病幹細胞の維持・増殖に關与する重要なニッチ因子を明らかにする。ニッチ因子による白血病幹細胞制御機構を明らかにし、白血病幹細胞とニッチの相互作用を解明することにより、白血病幹細胞を駆逐する治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 白血病モデルマウスの作製

MSCV-IRES-GFP-RUNX1/EVI1 レトロウイルスベクターを Plat-E 細胞に遺伝子導入し、ウイルス液を作製した。150mg/kg の 5-FU を成体の C57BL/6 マウスに腹腔内投与したのちに、大腿骨、脛骨より骨髓細胞を回収し、磁気ビーズを用いて Lineage-negative (Lin-) 分画を回収した。Lin- 骨髓細胞は 24 時間の pre-stimulation (20%FCS/IMDM+100ng/mlISCF+6ng/mlIL-3+10ng/mlIL-6 での培養)ののち、レトロネクチンを用いた方法で MSCV-IRES-GFP-RUNX1/EVI1 レトロウイルス感染を行った。48 時間後、感染細胞を回収し、 2×10^5 個の competitor

骨髓細胞とともに、9.5Gy の致死量放射線照射を施した同系マウスに尾静脈より注射し骨髓移植を行った。

(2) 白血病モデルマウスの解析

移植後は 1 ヶ月毎に末梢血を採取し、血算測定、末梢血塗抹標本(May-Giemsa 染色)作製、観察をした。

骨髓、脾臓、肝臓の組織をホルマリン固定し、組織切片の作製、H-E 染色を行った。

骨髓、脾臓、肝臓のスタンプ標本を作製し、特殊染色(コリンエステラーゼ染色、ベンジン染色)を行った。

脾臓、肝臓の電子顕微鏡観察を行った。

骨髓細胞、脾臓細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。

移植後の GFP 陽性細胞をソートし、コロニープレイティングアッセイを行った。また、コロニー細胞を回収しリアルタイム PCR を行った。

大腿骨、脛骨の骨髓をフラッシュアウトしたあとの骨をコラゲナーゼ処理し、内骨膜細胞を回収した後、抗体の染色を行い、フローサイトメーターで解析した。

4. 研究成果

レトロウイルスを用いて RUNX1/EVI1 を遺伝子導入したマウス骨髓細胞を同系マウスに骨髓移植し、白血病モデルマウスを作製した。既知の報告では、移植後 8~13 ヶ月で白血病を発症するとのことであったため、移植後 8~12 ヶ月のマウス 6 個体を解析した。これらのマウスにおいては、既知の報告のような白血病の発症は認めず、代わりに、血小板数の増多、脾腫を認めた。造血組織の解析においては、骨髓、脾臓ともに巨核球の増多を認め(Fig.1)、血小板増多の原因であるとともに、脾臓での髓外造血と考えられた。RUNX1/EVI1 ノックインヘテロマウスにおいては、急性巨核芽球性白血病を発症することが既に報告されており、興味深い知見であると考えられた。

次に、移植後のマウスの骨髓、脾臓から GFP 陽性細胞をソートし、コロニープレイティングアッセイを行った。RUNX1/EVI1 を遺伝子導入した造血細胞では、コントロールに比し、コロニー継代回数が増加しており、RUNX1/EVI1 によるコロニー形成能の亢進が認められた。以前に我々は、RUNX1/EVI1 によるコロニー形成能の亢進は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によって特異的に抑制されることを見出しており、その際に、RUNX1/EVI1 の下流にある標的遺伝子として *Fadd*, *Skp2* を同定している。そこで、継代されたコロニー細胞における *Fadd*, *Skp2* の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR により定量して検討したところ、コロニーの継代回数が進むにつれ、*Skp2* の発現低下が認められた。

一部のマウスにおいては、貧血、血小板減少を呈する個体が認められた。解析の結果では、体重減少、脾腫を認め、骨髓、脾臓、肝

臓において、c-kit 陽性の幼若芽球様血球の浸潤を認めた(Fig2)。既知の報告と同様の白血病の発症と考えられた。白血病発症個体の骨髄において、ニッチの変化の有無を検討するため、大腿骨、脛骨の内骨膜細胞をコラゲナーゼ処理で回収し、ALCM 陽性骨芽細胞分画、Sca-1 陽性間葉系幹細胞分画につきフローサイトメーターで解析したが、コントロールと比し差を認めなかった。さらなる解析を継続中である。

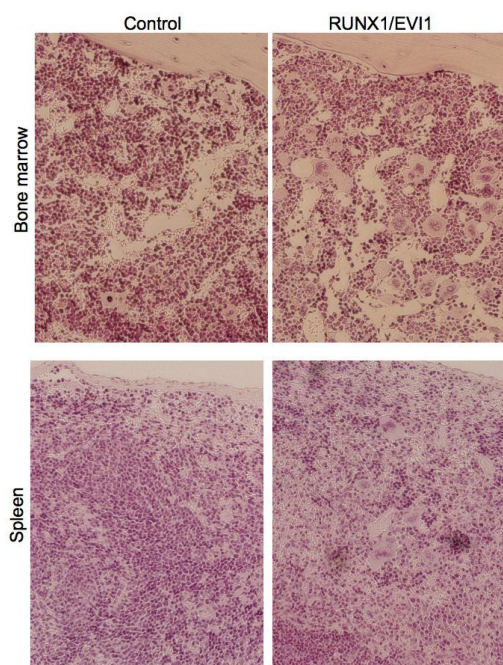


Fig1

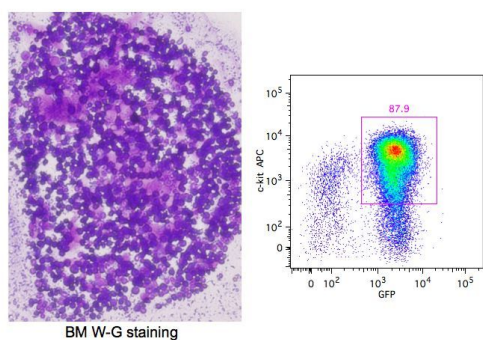


Fig2

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 5 件)

1. Sugita F, Maki K, Nakamura Y, Sasaki K, Mitani K. Overexpression of MIR9 indicates poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 May 15. 査読有

2. Maki K, Sugita F, Nakamura Y, Sasaki K, Mitani K. Fadd and Skp2 are possible downstream targets of RUNX1-EV11. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):83-91. 査読有

3. Ikushima YM, Arai F, Nakamura Y, Hosokawa K, Kubota Y, Hirashima M, Toyama H, Suda T. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 4;430(1):20-5. 査読有

4. Maki K, Sasaki K, Sugita F, Nakamura Y, Mitani K. Acute myeloid leukemia with t(7;21)(q11.2;q22) expresses a novel, reversed-sequence RUNX1-DTX2 chimera. *Int J Hematol*. 2012 Aug;96(2):268-73. 査読有

5. Maki K, Yamagata T, Sugita F, Nakamura Y, Sasaki K, Mitani K. Aberrant expression of MIR9 indicates poor prognosis in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(2):283-5. 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 由香 (NAKAMURA, Yuka)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364595

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：