

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791074

研究課題名（和文）慢性骨髄性白血病の急性転化および白血病幹細胞の出現・維持におけるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of blast crisis transition and maintenance of leukemic stem cells in chronic myelogenous leukemia

研究代表者

中原 史雄 (NAKAHARA FUMIO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80581181

研究成果の概要（和文）：

慢性骨髄性白血病（CML）は BCR-ABL 融合遺伝子によって引き起こされ、最終的に急性転化（BC）に至るが、BC 発症の分子メカニズムの大部分は未だ不明のままである。我々は、CML-BC 症例の約 4 割において、Notch の下流で働く転写因子である Hes1 の発現が上昇しており、BCR-ABL と Hes1 を同時に感染導入するマウス移植実験では KSL 分画だけではなく前駆細胞（CMP、GMP）の移植においても移植後非常に早期に CML-BC 様の病態を発症し死に至らしめ、CML-BC の発症に Hes1 発現上昇が強く関わっていることを以前に報告した。

今回我々は、発現アレイ等の解析により、Hes1 によって MMP-9 が強く発現誘導されることを見いだした。また MMP-9 プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイを行い、Hes1 が NF- κ B を介して MMP-9 を誘導することを見いだした。さらに、ヒト由来サンプルの解析では、CML-BC 20 サンプルのうち 3 サンプルにおいて MMP-9 の発現上昇を認め、そのうち 2 症例において Hes1 も高値であった。

興味深いことに、MMP-9 WT もしくは KO マウス由来 CMP に BCR-ABL と Hes1 を導入し行った移植実験において、MMP-9 の欠損が CML-BC の発症を有意に遅らせた。さらに、MMP-9 は sKitL の shedding を誘導することが知られているが、本 CML-BC マウスモデルにおいても、MMP-9 欠損によりレシピエントマウス血漿中の sKitL が有意に減少し、腫瘍細胞の増殖が低下することを確認した。

これらの結果は、Hes1 による MMP-9 発現誘導が一部の CML-BC の発症・増悪に関与していることを示唆しており、今後の有用な治療標的になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

High levels of Hes1 expression are frequently found in BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia in blast crisis (CML-BC). In mouse bone marrow transplantation (BMT) models, co-expression of BCR-ABL and Hes1 induces CML-BC-like disease; however the underlying mechanism remained elusive. Here, based on gene expression analysis, we show that MMP-9 is upregulated by Hes1 in common myeloid progenitors (CMPs). Analysis of promoter activity demonstrated that Hes1 upregulated MMP-9 by activating NF- κ B. Analysis of 20 samples from CML-BC patients showed that MMP-9 was highly expressed in three, with two exhibiting high levels of Hes1 expression. Interestingly, MMP-9 deficiency impaired the cobblestone area-forming ability of CMPs expressing BCR-ABL and Hes1 that were in conjunction with a stromal cell layer. In addition, these CMPs secreted MMP-9, promoting the release of soluble Kit-ligand (sKitL) from stromal cells, thereby enhancing proliferation of the leukemic cells. In accordance, mice transplanted with CMPs expressing BCR-ABL and Hes1 exhibited high levels of sKitL as well as MMP-9 in the serum. Importantly, MMP-9 deficiency impaired the development of CML-BC-like disease induced by BCR-ABL and Hes1 in mouse BMT models. Thus, Hes1 promotes the development of CML-BC, partly through MMP-9 upregulation in leukemic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：白血病、白血病幹細胞、慢性骨髄性白血病、急性転化

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは個体発生から成体まで、さまざまな細胞の生存、増殖、分化などを決定するシステムとして、ショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存されている。成人および小児のヒト T 細胞性急性リンパ性白血病において 50%以上という非常に高い頻度で Notch1 活性化型変異が検出されたという報告が 2004 年になされ(Science 2004)、白血病などの悪性腫瘍発症の原因として Notch シグナルの制御異常がにわかに注目されるようになった。

一方、Notch シグナルの下流遺伝子として同定されている Hes1 は basic helix-loop-helix 型の転写抑制因子であり、種々の系統の細胞において主として分化抑制的に働く。Hes1 欠損マウスは胎生致死もしくはは出生直後に死亡し、大脳欠損、無眼球症、腭臓低形成などを認める。T 細胞性前駆細胞 (early T cell precursor) ではその発生や分化に Hes1 が必須であるという報告があるものの、それ以外の血球での異常はこれまで報告されてこなかった。

その後 2003 年には、骨髄由来の CD34low/- 造血幹細胞 (cKit+Sca1+Lin⁻:KSL) 分画にレトロウイルスで Hes1 を導入し強制発現させた細胞をマウスに移植すると、末梢血において半年以上にわたり Hes1 陽性細胞が高い割合で認められることから、Hes1 は造血幹細胞維持に何らかの寄与をする可能性があることが報告された(Blood 2003)。また 2008 年には、分裂期に戻ることでできる可逆的な静止期を長期に渡って維持するためには Hes1 が必須であることが示され(Science 2008)、Hes1 が造血幹細胞をはじめとする各種幹細胞の維持や分化に与える作用が注目されるようになった。

慢性骨髄性白血病 (CML) は BCR-ABL 融合遺伝子によって引き起こされ、最終的に急性転化 (BC) に至るが、BC 発症の分子メカニズムの大部分は未だ不明のままである。マウスモデルを利用して、BCR-ABL 融合遺伝子は造血幹細胞に導入された場合には骨髄増殖性疾患 (MPN) を引き起こすが、骨髄系共通前駆細胞 (CMP) や顆粒球・マクロファ

ージ前駆細胞 (GMP) といった造血前駆細胞に導入された場合には MPN を発症させないことがこれまで報告されている。

2010 年、申請者は、Hes1 が本来継代不可能な造血前駆細胞である CMP や GMP に導入された場合、これらの細胞を未分化な形態に保ち、不死化させる作用があることを見いだした。またマウス移植モデルを用いて、KSL 分画や造血前駆細胞 (CMP、GMP) に Hes1 を単独で導入し移植した場合には白血病を発症させないが、Hes1 と BCR-ABL 融合遺伝子を同時に導入する実験では、KSL 分画だけではなく前駆細胞 (CMP、GMP) の移植においても移植後非常に早期に慢性骨髄性白血病急性転化 (CML-BC) 様の病態を発症し死に至らしめることを見いだし報告した。興味深いことに、ヒト CML-BC 20 サンプルのうち 8 サンプルにおいて Hes1 の発現上昇を認めた。さらにヒト CML-BC 細胞株ではその約半数において Hes1 の発現が高値であり、Hes1 高値の 3 細胞株中 2 細胞株において dominant negative Hes1 の導入により増殖が抑制され、Hes1 発現上昇がヒトの CML-BC 発症機序に深く関わっていると考えられた。

2. 研究の目的

上記のように、Hes1 が造血前駆細胞段階で分化をブロックすることで CML-BC を発症させ、白血病幹細胞の出現や維持に関与している可能性が強く示唆されたが、Hes1 発現上昇による CML-BC 発症のメカニズムは未だ不明である。本研究の目的は Hes1 発現上昇による CML-BC 発症・病期進展のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

本研究ではマウス造血前駆細胞 (CMP) を FACS Aria cell sorter を用いて単離後、mock もしくは Hes1 を導入しマイクロアレイ発現解析を行い、Hes1 によって発現が上昇する遺伝子群を特定した。次に、ルシフェラーゼアッセイにより、Hes1 が下流の遺伝子を誘導する機構を解析した。

さらに、マウス造血前駆細胞 (CMP) を MMP-9 WT もしくは KO マウスより単離し、パ

パッケージング細胞 PLAT-E で作成したレトロウイルスにより Hes1 および bcr-abl 遺伝子を感染導入する。感染 48 時間後に 5.25Gy の放射線照射をした 8 週齢レシピエントマウス (C57BL/6 Ly5.2) の尾静脈から細胞を注入移植することで、CML-BC 発症までの期間を検討した。また血漿中の sKitL も測定した。

4. 研究成果

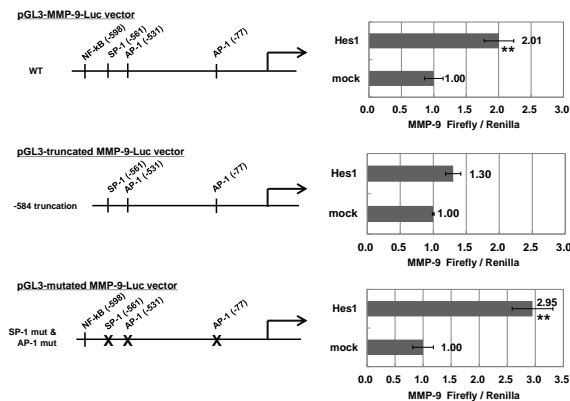
発現アレイ解析により、Hes1 によって MMP-9 が強く発現誘導されることを見いだした。(表 1)

表 1

Gene Symbol	Fold change (Hes1 vs mock)	Gene Title
Tgm2	50.95	transglutaminase 2, C polypeptide
Cxcl3	47.69	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
Ccl2	36.98	chemokine (C-C motif) ligand 2
Gem	32.98	GTP binding protein
St6gal1	25.87	beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1
Gimap4	22.54	GTPase, IMAP family member 4
Frm4d4b	17.67	FERM domain containing 4B
St3gal6	16.94	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
Abca1	15.05	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
Egr3	14.88	early growth response 3
Msrb3	14.82	methionine sulfoxide reductase B3
Ltb	14.60	lymphotoxin B
Mmp9	14.37	matrix metalloproteinase 9
Gimap8	14.13	GTPase, IMAP family member 8
Ccl4	13.70	chemokine (C-C motif) ligand 4

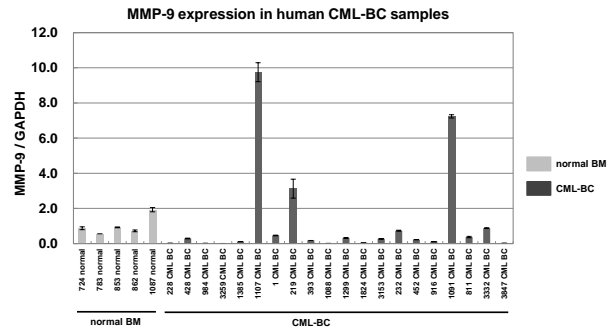
MMP-9 プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイを行い、Hes1 が NF- κ B を介して MMP-9 を誘導することを見いだした。(図 1)

図 1



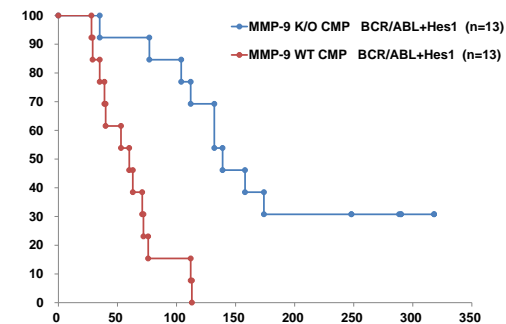
ヒト由来サンプルの解析では、CML-BC 20 サンプルのうち 3 サンプルにおいて MMP-9 の発現上昇を認め、そのうち 2 症例において Hes1 も高値であった。(図 2)

図 2



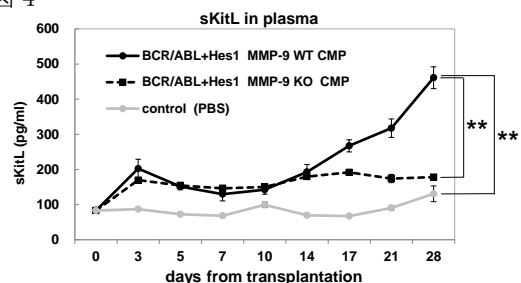
MMP-9 WT もしくは KO マウス由来 CMP に BCR-ABL と Hes1 を導入し行った移植実験において、MMP-9 の欠損が CML-BC の発症を有意に遅らせた。(図 3)

図 3



MMP-9 は sKitL の shedding を誘導することが知られているが、本 CML-BC マウスモデルにおいても、MMP-9 欠損によりレシピエントマウス血漿中の sKitL が有意に減少し、腫瘍細胞の増殖が低下することを確認した。(図 4)

図 4



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 9 件)

1. Takahashi M, Izawa K, Kashiwakura J, Yamanishi Y, Enomoto Y, Kaitani A, Maehara A, Isobe M, Ito S, Matsukawa T, Nakahara F, Oki T, Kajikawa M, Ra C, Okayama Y, Kitamura T and Kitaura J (2013) Human CD300C Delivers an Fc Receptor-gamma-dependent Activating Signal in Mast Cells and Monocytes and Differs from CD300A in Ligand Recognition. **J Biol Chem** 288:7662-75.
2. Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T and Kitaura J (2012) The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. **Immunity** 37:827-39.
3. Kagiya Y, Kitaura J, Togami K, Uchida T, Inoue D, Matsukawa T, Izawa K, Kawabata KC, Komeno Y, Oki T, Nakahara F, Sato K, Aburatani H and Kitamura T (2012) Upregulation of CD200R1 in lineage-negative leukemic cells is characteristic of AML1-ETO-positive leukemia in mice. **Int J Hematol** 96:638-48.
4. Kitamura T, Watanabe-Okochi N, Inoue D, Togami K, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata K, Chiba S, Harada Y, Harada H, Kitaura J and Nakahara F (2012) [Molecular mechanisms underlying leukemic transformation of myelodysplastic syndromes (MDS) and chronic myelogenous leukemia (CML)]. **Rinsho Ketsueki** 53:734-9.
5. Yamanishi Y, Takahashi M, Izawa K, Isobe M, Ito S, Tsuchiya A, Maehara A, Kaitani A, Uchida T, Togami K, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Kajikawa M, Kurihara H, Kitamura T and Kitaura J (2012) A soluble form of LMIR5/CD300b amplifies lipopolysaccharide-induced lethal inflammation in sepsis. **J Immunol** 189:1773-9.
6. Doki N, Kitaura J, Uchida T, Inoue D, Kagiya Y, Togami K, Isobe M, Ito S, Maehara A, Izawa K, Kato N, Oki T, Harada Y, Nakahara F, Harada H and Kitamura T (2012) Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. **Int J**

Hematol 95:167-75.

7. Oki T, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Nishimura K, Maehara A, Uchida T, Komeno Y, Nakahara F, Harada Y, Sonoki T, Harada H and Kitamura T (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. **Leukemia** 26:1038-45.
8. Nakamura M, Kitaura J, Enomoto Y, Lu Y, Nishimura K, Isobe M, Ozaki K, Komeno Y, Nakahara F, Oki T, Kume H, Homma Y and Kitamura T (2012) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a negative-feedback regulator of Ras / Raf signaling: Implications for tumorigenesis. **Cancer Sci** 103:26-33.
9. Shibata-Minoshima F, Oki T, Doki N, Nakahara F, Kageyama S, Kitaura J, Fukuoka J and Kitamura T (2012) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. **Int J Oncol** 40:93-8.

[学会発表] (計 1 件)

1. Fumio Nakahara, Toshio Kitamura, 他. Molecular mechanisms of blast crisis in chronic myelogenous leukemia caused by upregulation of Hes1. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 20 日. 国立京都国際会館

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 史雄 (NAKAHARA FUMIO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 8 0 5 8 1 1 8 1

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし