

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461424

研究課題名(和文)新規治療戦略の確立をめざした慢性骨髄系腫瘍幹細胞の同定

研究課題名(英文)Targeting cancer stem cells in chronic myeloid neoplasms

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)、骨髄増殖性腫瘍(MPN)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症例を除いて根治的治療法がない。このため、がん幹細胞を標的とした新規治療の開発が期待されているが、これらの疾患ではがん幹細胞も未だに同定されていない。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/MPN細胞の生着が非常に低く、幹細胞研究の障壁となっている。本課題ではMDS/MPN幹細胞の疾患再構築可能なマウスモデルを確立するために、ヒトSIRPAノックインによる完全マクロファージ寛容を導入、Kit^{W/V}変異を導入した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 MDS/MPN. Immunodeficient mice are widely used to reconstitute human normal hematopoiesis and acute leukemia. However, in these models, significant reconstitution of human erythroid and megakaryocyte lineages has been difficult to achieve. Here, we show that introduction of homozygous Kit^{Wv} mutation (K) into the C57BL/6.Rag2 (null)Il2rg(null) mice with NOD-Sirpa (BRGS) strongly promoted human multilineage reconstitution. The new BRGSK mice showed significantly higher levels of human cell chimerism and myeloid reconstitution for a long-term, as compared to BRGS mice. Strikingly, BRGSK mice displayed robust reconstitution of human erythropoiesis and thrombopoiesis with terminal maturation in the bone marrow. This new xenograft model should be a strong tool to study human hematopoiesis including erythropoiesis and thrombopoiesis.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 骨髄異形成症候群 がん幹細胞 免疫不全マウス SIRPA Kit変異

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。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、その抗原特異的な抗体を作成し、AML幹細胞を標的とした新規治療への応用が期待される結果を得ている。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。特に、高度に純化したがん幹細胞から、がん幹細胞特異的な表面抗原やシグナル経路を明らかにできれば、特異抗体や阻害剤などによる、これまでの化学療法とは異なる視点の新規治療の開発が可能となる。しかし、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慢性骨髄系腫瘍であるMPN(慢性骨髄性白血病(CML)を含む)、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。MDS/MPN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。これらの疾患は高齢者に多く、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、いまだ標準療法が確立していないのが現状である。この問題解決への障壁は、これらの疾患においては、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、腫瘍細胞の生着や疾患の再構築が得られないという不可解な現象にある。がん幹細胞研究を進めるためには、幹細胞同定のためのアッセイ系の確立が必須である。これまで、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。しかし、既存のNODバックグラウンドのマウスで行っても、AMLと異なり、MDS/MPNではマウス内で疾患構築がみられない。この例からも明らかであるように、異種移植効率がヒト疾患再構築実験の成否を決定していると考えられる。

2. 研究の目的

既存の免疫不全マウスにおいてMDS/MPNの疾患構築が得られない理由として、これらの疾患において(1)腫瘍性幹細胞が十分量移植されていない可能性(細胞側)および(2)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。申請者は、平成23-25年基盤研究C「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」(研究代表者)にて、既存の免疫不全マウスを改良した次世代免疫不全マウスを開発した(Blood 2013)。本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、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を同定する。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。

3. 研究の方法

(1)MDS/MPN幹細胞アッセイのための次世代異種移植モデルの確立

NODラインは異種移植効率が良好であるが、その原因がSIRPA遺伝子におけるNOD特有の多型にあること、すなわち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 2007)。そこで結合能をさらに高めるためヒト型SIRPAをノックインしたマウスラインを樹立した。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Kit(W/V)変異を導入し、骨髄微小環境の改善(骨髄ニッチの開放)など、MDS/MPN幹細胞の生着効率を高め、MDS/MPN幹細胞の分離・同定と、疾患モデルマウスを確立する。

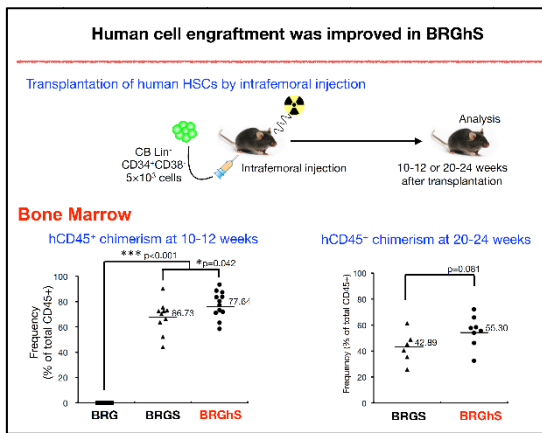
(2)MDS/MPN幹細胞候補分画の同定

これらの幹細胞分画の同定には、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、プロテオ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/MPN幹細胞アッセイのための次世代異種移植モデルの確立

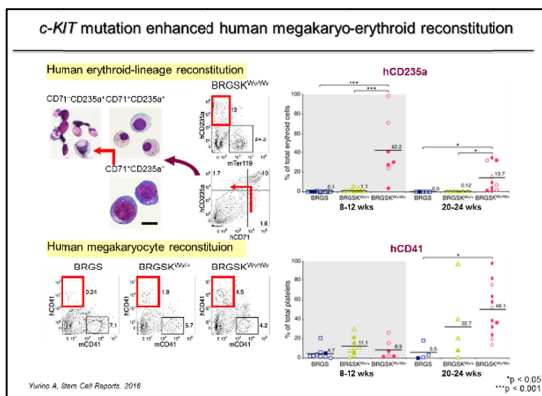
我々は、NODライン特有の異種移植片寛容の原因がSIRPA遺伝子多型にあり、ヒトCD47とレシピエントマウスSIRPAの結合強化によりNODバックグラウンドを超える異種移植寛容の導入が可能であることを見出し(Nat Immunol 2007)、C57/BL6バックグラウンドでRag2およびIL2rgを欠損したマウスに、NOD型SIRPA変異を導入した免疫不全マウスB6.Rag2(null)IL2rg(null)NOD-Sirpa(BRGS)ラインを樹立した。このBRGSマウスをベースとして、さらに、マウスマクロファージによるヒト移植片寛容を完全にするために、ヒ



ト型 SIRPA 遺伝子ノックインラインを導入した BRGhS マウスラインを樹立した。図に示すように、NOD 型 SIRPA をもつ BRGS よりも、さらにヒト型 SIRPA をもつ BRGhS の方が、ヒト造血幹細胞の生着率が高い。現在 MDS/MPN 細胞の移植実験を開始している。

(2)BRGS マウスの改良

BRGS マウスをベースとして、MDS/MPN 幹細胞生着の至適化を試みた。既存の免疫不全マウスでは、マウス内のヒト造血が B 細胞に偏ること、ヒト赤血球や血小板の産生が殆どみられないことが課題として残っている。本研究では、KitWv ホモ変異を免疫不全マウスに導入することにより、ヒト造血細胞の多系統への再構築能が飛躍的に向上することを示した。我々は、C57BL/6.Rag2(nu11)Il2rg(nu11)NOD-Sirpa(BRGS)マウスに KitWv ホモ変異を導入した C57BL/6.Rag2nu11Il2rgnu11NOD-Sirpa KitWv/Wv(BRGSKWv/Wv)マウスを新規樹立した。ヒト臍帯血由来 CD34+CD38-細胞を異種移植後、BRGSKWv/Wv マウスでは、BRGS マウス



と比較して有意に高いヒト細胞の生着効率および長期にわたる多系統の造血細胞の再構築を認めた。

最も特筆すべき点はマウスの骨髄において最終分化を伴うヒト赤血球・血小板造血が顕著に認められた点である。さらに、クロドロン酸投与によりマウスマクロファージを除去すると、骨髄から末梢血へヒト赤血球・血小板の動員が認められた。この結果は、KitWv

変異によるマウス KIT シグナルの減弱により、ヒト造血幹・前駆細胞(HSPC)がマウス HSPC をマウス骨髄至適微小環境から競合排除することによって、多系統への分化能が得られたことを示している。BRGSKWv/Wv マウスモデルは、赤血球・血小板を含む多系統にわたるヒト造血の研究に極めて有用なレシピエントマウスとして応用可能である。

(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/MPN 骨髄より MDS 幹細胞分画の同定を試みた。MDS/MPN 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/MPN 幹細胞が存在することが予想される。我々は、MDS/MPN 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/MPN 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 15 件)

Takenaka K, 以下 17 名. Clinical features and outcomes of patients with primary myelofibrosis in Japan: a report of a 17-year nationwide survey by the Idiopathic Disorders of Hematopoietic Organs Research Committee of Japan. Int J Hematol 105:59-69, 2017.

Espinoza JL, 以下 10 名, 9 番目. The simultaneous inhibition of the mTOR and MAPK pathways with Gnetin-C induces apoptosis in acute myeloid leukemia. Cancer Letters 400:127-136, 2017.

Kawamura S, 以下 10 名, 8 番目. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential: A counterpart of mouse cMoPs. Immunity 46:835-848, 2017.

Kitanaka A, Takenaka K, 以下 7 名. Splenic irradiation provides transient palliation for symptomatic splenomegaly associated with primary myelofibrosis: a report on 14 patients. Int J Hematol 103:423-428, 2016.

Arai Y, 以下 16 名, 3 番目. Allogeneic unrelated bone marrow transplantation

from older donors results in worse prognosis in recipients with aplastic anemia. *Haematologica* 101:644-652, 2016.

Daitoku S, Takenaka K, 以下 12 名 . Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. *Exp Hematol* 44:817-825, 2016.

Yukino A, Takenaka K, 以下 11 名 . Enhanced regeneration of human erythropoiesis and thrombopoiesis in an immunodeficient mouse model with KitWv mutation. *Stem Cell Reports* 7:425-438, 2016.

Takenaka K, 以下 16 名 . Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation

Transplantation-related complication working group. *Biol Blood Marrow Transplant* 21:2008-2016, 2015.

Jung CW, 以下 27 名、21 番目 . Efficacy and safety of ruxolitinib in Asian patients with myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 56:2067-2074, 2015.

Miyawaki K, 以下 10 名、8 番目 . CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: redefinition of murine common myeloid progenitor. *Stem Cells* 33:976-987, 2015.

Oritani K, 以下 10 名、6 番目 . A multinational, open-label, phase 2 study of ruxolitinib in Asian patients with myelofibrosis: Japanese subset analysis. *Int J Hematol* 101:295-304, 2015.

Shima T, 以下 9 名、6 番目 . Preserved in vivo reconstitution ability of PBSCs cryopreserved for a decade at -80 °C. *Bone Marrow Transplant* 50:1195-1200, 2015.

Kikushige Y, 以下 12 名、10 番目 . A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression. *Cell Stem Cell* 17:341-352, 2015.

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* 42:163-171, 2014.

Shima T, 以下 12 名、7 番目 . The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp Hematol* 42:955-965, 2014.

[学会発表](計 10 件)

Takenaka K: Asian MPN session: Clinical features and outcomes of patients with primary myelofibrosis in Japan (oral session). The 2nd annual international symposium on myeloproliferative neoplasms (April 1, 2017, Tokyo, Japan).

Takenaka K: Enhanced reconstitution of human erythropoiesis and thrombopoiesis in a new immunodeficient mouse model (oral session). The John Dick Lab 30th Anniversary Alumni Symposium (December 1, 2016, Toronto, Ontario, Canada).

竹中克斗:教育講演 4 血球貪食症候群の診断と治療. 第 17 回日本検査血液学会 (2016 年 8 月 7 日、福岡).

竹中克斗:教育講演 EL-11 MPN の分子病態・診断・治療の進歩. 第 78 回日本血液学会学術集会 (2016 年 10 月 13 日、横浜).

Takenaka K: JSH/EHA Joint Session MPN: Fibrotic tissues in human primary myelofibrosis with JAK2V617F are developed clonally from malignant hematopoietic stem cells (oral session). The 6th JSH International Symposium 2015 (May 23, 2015, Karuizawa, Japan).

Takenaka K: Symposium 6 Development of a new immunodeficient mouse model introduced with mutated Sirpa for cancer stem cell assay. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 27 日、横浜).

Takenaka K: Symposium 1. Anti-CMV immunity elicit GVL against AML. 第 76 回日本血液学会学術集会 (2014 年 10 月 31 日、大阪).

Takenaka K: Hematopoiesis and Programmed Cell Removal - Self-recognition system mediated through CD47-SIRPA interaction - (oral session). The 22nd International Symposium of Molecular Cell Biology of Macrophages (June 3, 2014, Kobe, Japan).

Takenaka K: Development of a new immunodeficient mouse model for

targeting cancer stem cells (oral session). The 33rd Sapporo International Cancer Symposium 2014 (June 27, 2014, Sapporo, Japan).
Takenaka K. Clinical Outcomes of Patients with Primary Myelofibrosis in Japan: A Nationwide Survey over a 17-Year Study Period by the Idiopathic Disorders of Hematopoietic Organs Research Committee of Japan. The 58th annual meeting of the American Society of Hematology (December 4, 2013, San Diego, CA).

()

〔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：
出願年月日：
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

竹中 克斗 (TAKENAKA KATSUTO)

九州大学病院・血液・腫瘍・心血管内科・
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：

(4) 研究協力者