

造血システムにおける腫瘍性幹細胞およびその悪性化に関する遺伝子の同定

Cancer stem cells and genes responsible for their development

赤司 浩一 (Koichi Akashi)

九州大学・大学病院・教授



研究の概要

造血器腫瘍における腫瘍性幹細胞を直接同定し、その生物学的特性の解析を通して、悪性転換の原因となる遺伝子異常を網羅的に検索する。腫瘍の源である腫瘍性幹細胞を標的とした新しい治療法の開発、さらに腫瘍性幹細胞の理解を通じて正常造血幹細胞の増殖、分化をコントロールする新しい技術の開発につながることを目的とする。

研究分野：医歯薬学分野

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：造血器腫瘍，腫瘍性幹細胞，急性骨髄性白血病，慢性リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常造血の各分化系統・分化段階の前駆細胞の純化法を開発した。
- (2) 高効率にヒト造血免疫系を再現可能な高度免疫不全 NOG マウスを作製した。
- (3) マイクロアレイや sRNAi ライブラリーセットを用いて網羅的遺伝子検索が可能となった。
- (4) 以上の手法で、造血器腫瘍性幹細胞を純化し、免疫不全マウスに移植して腫瘍性幹細胞アッセイを行い、腫瘍性幹細胞化に重要な遺伝子異常を同定する。

2. 研究の目的

- (1) 急性白血病やリンパ系腫瘍など造血器腫瘍における腫瘍性幹細胞を同定する。
- (2) 腫瘍性幹細胞の生物学的特性を明らかにする。
- (3) 腫瘍性幹細胞化に重要な遺伝子異常を検索する。
- (4) 腫瘍性幹細胞を直接標的とした新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) ベクトン・デッキンソン社製波形処理システム一式
- (2) ベクトン・デッキンソン社製 FACS station システム一式
- (3) 超純水製造装置
- (4) モノクローナル抗体，生化学試薬
- (5) 遺伝子操作試薬，培養試薬など

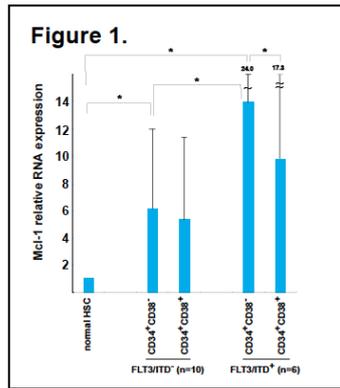
4. これまでの成果

A) 急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞の純化

AML の白血病幹細胞は最初に同定された癌幹細胞であり、正常の造血幹細胞の表面抗原と同一である CD34⁺CD38⁻細胞分画内に存在することが知られている。我々はマルチカラー・フローサイトメトリーを用いることにより、白血病幹細胞のフェノタイプを詳細に解析している。AML においては、CD34⁺CD38⁻細胞内では、正常の造血幹細胞フェノタイプとは異なる Flt3^{hi}Thy-1^c-Kit^{lo}IL-3R^{hi} 分画が増加し、Flt3^{hi}Thy-1^c-Kit^{lo}IL-3R^{lo} は著減していた。現在この2つの分画を分離純化し、NOG マウスへ移植して白血病発症効率を比較検討し、さらに Illumina マイクロアレイにより遺伝子プロファイリング中である。

また白血病幹細胞化を獲得するのに重要な遺伝子群を検討している。我々は、抗アポトーシス蛋白 bcl-2 ファミリーの中で Mcl-1 が、正常の造血幹細胞分画で、下流の前駆細胞群と比較してその発現レベルが極めて亢進していることを見出し、Mcl-1 が造血幹細胞の生存強化に重要であることに注目している。そこで、AML 検体において Mcl-1 の発現を検証したところ、白血病芽球分画と比較して、白血病幹細胞分画において有意に高値を示した。また Mcl-1 の発現を制御している FLT3 シグナルの代表的遺伝子異常である FLT3/internal tandem duplication (ITD) 異常を有する AML におい

て、Mcl-1 の発現が FLT3/ITD 陰性 AML と比較して有意に高発現していることを見いだした (Fig1). さらに FLT3/ITD 変異 AML における CD34⁺CD38⁻ AML 幹細胞では CD34⁺CD38⁺ AML 芽球と比較して、



Mcl-1 の発現量は有意に上昇していた (Fig1). 正常造血と同様に AML 発症, 特に FLT3/ITD 変異 AML において, Mcl-1 が重要な役割を果たしている可能性が極めて高い. 引き続き Mcl-1 の AML 発症に及ぼす役割について詳細に検討している.

B) リンパ性白血病幹細胞の純化

慢性リンパ性白血病 (CLL) は成熟 B リンパ球が末梢にて腫瘍性に増殖する疾患で, その芽球は CD34⁺CD10⁺CD19⁺CD20⁺ のフェノタイプを示す. フローサイトメトリーによる解析では, 末梢血中の CLL 細胞内に CD34⁺CD10⁺CD19⁺IL-7R⁺ の未分化なフェノタイプを有する細胞集団を確認した. この細胞は, 正常造血では骨髄にのみ存在する pro-B に相当する未分化な B 前駆細胞で, 正常末梢血中には存在しない. 次に IgH の再構成パターンを調べたところ, CLL 患者由来の造血幹細胞は germ line パターンを呈するが, CD34⁺CD10⁺CD19⁺IL-7R⁺ 細胞は CD10⁺CD19⁺CD20⁺ の CLL クローンと同一の再構成パターンを示し, CLL 腫瘍クローンに属していることが証明された. 以上より, 末梢血中の CD34⁺CD10⁺CD19⁺IL-7R⁺ 細胞を CLL 幹細胞候補として, NOG 新生児マウスへ移植したが, ヒト細胞の生着を認めないまま, マウスは 6 ヶ月以上生存した. 一方, CLL 患者骨髄幹細胞分画を NOG マウスへ移植したところ, すべてのマウスでヒト骨髄系とリンパ系の生着を認めるも, リンパ増殖性疾患を呈し死亡した. このことは, CLL 幹細胞候補は CD34⁺CD10⁺CD19⁺IL-7R⁺ 分画ではなく, さらに上流の造血幹細胞レベルに存在する可能性が考えられる. 現在, 幹細胞分画内に CLL 幹細胞候補を探索している.

5. これまでの進捗状況と今後の計画

最新鋭のフローサイトメトリー技術を駆使して微小な細胞集団を純化し, NOG 新生児マウスへ移植し, 高い腫瘍再構築能を有する腫瘍性幹細胞分画を特定している. さらに腫瘍性幹細胞化に必要な分子機構を中心に検討する予定である.

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字, 研究分担者には下線)

1. Cantor AB, **Akashi K**, et al. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. *J Exp Med* 205, 611, 2008.
2. Ishikawa F, **Akashi K**, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* 25, 1315, 2007.
3. Alcaide P, **Akashi K**, et al. Dendritic cell expression of the transcription factor T-bet regulates mast cell progenitor homing to mucosal tissue. *J Exp Med* 204, 431, 2007.
4. Rosenbauer F, **Akashi K**, et al. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nat Genet* 38,27,2006
5. Hirai H, **Akashi K**, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* 7, 732, 2006
6. Chan IT, **Akashi K**, et al. Oncogenic K-ras cooperates with PML-RARalpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood* 108, 1708, 2006
7. Iwasaki H, et al, **Akashi K**. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Gene and Dev* 20, 3010, 2006
8. Wang J, **Akashi K**, et al. MLL-CBP targets granulocyte/macrophage progenitors and initiates leukemogenesis in a murine model of human t(11;16). *EMBO J* 26,368,2005
9. Opferman JT, **Akashi K**, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307,1101,2005.
10. Okuno Y, **Akashi K**, et al. Autoregulation of the transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* 25,2832,2005.
11. Iwasaki H, et al, **Akashi K**. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* 201,1891,2005.
12. Iwasaki H, et al, **Akashi K**. Distinct and indispensable roles of PU.1 in maintenance of stem cells and their differentiation. *Blood* 106,1590,2005.
13. Okuno Y, **Akashi K**, et al. Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* 25, 2832,2005
14. Ishikawa F, Miyamoto T, **Akashi K**, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor (gamma) chain (null) mice. *Blood* 106,1565,2005.

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/idenshi/>

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/index.html>