

白血病モデルにおける幹細胞イメージングとニッチの同定

所属機関 東海大学医学部

研究者名 安藤 潔

《研究の概要》

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia:AML) は、未熟な骨髄系細胞が増殖する腫瘍性疾患である。白血病細胞の染色体解析や分子生物学的検討から病型特異的な遺伝子異常が同定されてきた。トランスジェニックマウスや遺伝子導入したマウス造血幹細胞の移植モデルを用いた *in vivo* における検討から、これらの遺伝子異常が白血病発症に関与していることが明らかになった。それらは、*FLT3-ITD* 異常、*KIT* 変異などの細胞増殖や細胞生存に関与する class I 異常と、*NPM1* 変異や *CEBPA* 変異などの細胞分化・成熟に関与する class II 異常に大別される。さらに近年、次世代シークセンサーを用いた網羅的遺伝子解析技術の発達から、AML 患者検体においてプロモータ領域を含めた DNA 領域がメチル化されていること、*DNMT3A*、*TET2*、*IDH1*、*IDH2*、*ASXL1* などの DNA メチル化に関与する遺伝子に変異が未だ十分な分類がなされていない正常核型を有する AML

(cytogenetically normal-AML: CN-AML) を中心に検出されることが報告された。これらの知見は、AML 発症には DNA メチル化によるエピジェネティックな変化が AML 発症の第 3 の因子として重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、それらが実際に AML 発症に必要なものであるか、どのような遺伝子変化、エピジェネティックな変化を引き起こすのか、それが生じるのはどの細胞分画なのか、について直接的に証明するためには、ヒト由来細胞を用いた *in vivo* モデルを用いた検証が必要である。

本研究では近年開発された強力な免疫不全マウスである NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) マウスを用いることにより、ヒト由来細胞を用いた *in vivo* モデルの作成を行った。すなわち前 AML 状態である骨髄異形成症候群に由来する CD34 陽性細胞が高率に NOG マウスに生着すること (*Haematologica* 2011;96:543)、AML の一病型である急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia: APL) に特異的な異常キメラ遺伝子 *PML-RARA* を、臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞に遺伝子導入して NOG マウスへ移植するとヒト APL に極めて類似した病態を呈することを明らかにした。また同様の実験系を用いて、CN-AML にしばしば認められる遺伝子異常である *FLT3-ITD* 変異と *NPM1* 変異を同時に臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞へ遺伝子導入し NOG マウスへ移植したが、十分な遺伝子導入が認められたものの、現在までのところ AML の発症は認めていない。一方、DNA Methyltransferases と結合して異常転写機能を有する *PML-RARA* や *MLL-AF9*、*AML1-ETO* を遺伝子導入した場合には AML を発症することから、さらに DNA メチル化に関与する遺伝子変異を同時に組み込むことが AML 発症において重要であると考えられた。

安藤 潔 東海大学医学部 ヒト白血病モデルマウスによる白血病幹細胞維持機構の解明
内科学系血液内科教授

黒川峰夫 東京医学部 難治性白血病に対する新規分子創薬
血液・腫瘍内科教授

研究報告

I 研究目的

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) は、未熟な骨髄系細胞が増殖する腫瘍性疾患である。白血病細胞の染色体解析や分子生物学的検討から病型特異的な遺伝子異常が同定されてきた。トランスジェニックマウスや遺伝子導入したマウス造血幹細胞の移植モデルを用いた *in vivo* における検討から、これらの遺伝子異常が白血病発症に関与していることが明らかになった。それらは、*FLT3-ITD* 異常、*KIT* 変異などの細胞増殖や細胞生存に関与する class I 異常と、*NPM1* 変異や *CEBPA* 変異などの細胞分化・成熟に関与する class II 異常に大別される。さらに近年、次世代シークセンサーを用いた網羅的遺伝子解析技術の発達から、AML 患者検体においてプロモータ領域を含めた DNA 領域がメチル化されていること、*DNMT3A*、*TET2*、*IDH1*、*IDH2*、*ASXL1* などの DNA メチル化に関与する遺伝子に変異が未だ十分な分類がなされていない正常核型を有する AML (cytogenetically normal-AML: CN-AML) を中心に検出されることが報告された。これらの知見は、AML 発症には DNA メチル化によるエピジェネティックな変化が AML 発症の第 3 の因子として重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、それらが実際に AML 発症に必要であるか、どのような遺伝子変化、エピジェネティックな変化を引き起こすのか、それが生じるのはどの細胞分画なのか、について直接的に証明するためには、ヒト由来細胞を用いた *in vivo* モデルを用いた検証が必要である。本研究では近年開発された強力な免疫不全マウスである NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) マウスを用いることにより、ヒト由来細胞を用いた *in vivo* モデルを作出し、生体イメージングによる白血病幹細胞ニッチの同定・白血病幹細胞の動態解明と難治性白血病に対する新規分子創薬を目的とした。

II 研究計画および材料と方法

- (1) 白血病モデルマウスによる白血病幹細胞維持機構の解明と生体イメージングによる白血病幹細胞ニッチの同定 (代表研究者、共同研究者)

造血幹細胞のニッチからの幹細胞維持シグナルとして CXCR4/SDF-1, Tie-2/angiopoietin-1, Wnt/・カテニン経路などが想定されているが、それらの白血病幹細胞での意義は未解明である。白血病モデルマウスで siRNA や抗体、遺伝子ノックアウト法などを用いて幹細胞シグナル関連分子の活性を誘導的にコントロール

し、白血病幹細胞の維持シグナルを解明する。さらに従来の免疫組織染色に加え、経時的な動態を観察できる2光子顕微鏡により、白血病幹細胞をリアルタイムに可視化しながら、その動態の全容を解明する。これらの知見をもとに化合物ライブラリーのスクリーニングや特異的抗体の作製を行い、白血病幹細胞を制御するシグナル阻害剤を同定する。

(2) ヒト白血病化マウスによる白血病幹細胞の動態解明と難治性白血病に対する新規分子創薬（代表研究者、共同研究者）

新規治療法の開発には、マウスモデルのみならずヒト白血病細胞を用いた解析が重要である。われわれは、免疫不全（NOD/SCID）マウスにヒト造血幹細胞・間質幹細胞を移植し、微小環境を含めたヒト造血をマウス骨髄で構築する系を持っている。この系において移植細胞にヒト白血病細胞を用いることで、新たにヒトの白血病を持つマウスを作製する。このヒト白血病化マウスにおいて、免疫染色・2光子顕微鏡によりヒト白血病幹細胞のニッチでの動態を解析し、(1)で得られた白血病幹細胞シグナルの阻害剤も活用して、幹細胞性の維持に必須の鍵分子を同定する。

これらの知見を集約して白血病幹細胞の維持に関わるニッチシグナルや下流分子を制御する低分子化合物・抗体を同定し、白血病幹細胞を根絶する新たな治療法の基盤を確立する。

III 研究成果

従来ヒト由来の細胞をマウス内で増殖、分化させることは技術的に困難であったが、近年開発された強力な免疫不全マウスであるNOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) マウスを用いることにより、ヒト由来細胞を用いた*in vivo*モデルの作成が容易となった。本年度は、前AML状態である骨髄異形成症候群に由来するCD34陽性細胞が高率にNOGマウスに生着することを明らかにした。すなわち7例のMDS患者の骨髄CD34陽性細胞をMSCと同時にマウスに移植し、4例についてヒト造血細胞の生着を確認した。(図1)興味深いことに、CD34陽性細胞のみを移植した群では、生着率が非常に低い、もしくは生着が確認できなかった。さらに細胞表面マーカーの解析により、マウス骨髄内でも移植前と同様の表現型を維持していることが明らかとなった。キメリズムが高い一例において、染色体解析を行ったところ移植前骨髄と同じく17番長腕の同腕染色体が認められた。また、この一例については継代移植（これまでに6代）によりMDS細胞を2年以上にわたって維持し続けている。マウス骨髄の組織学的解析により、分化した細胞を含むCD45陽性細胞は骨髄腔内に点在しているのに対し、CD34陽性細胞は骨内膜近傍に限局して存在していることが明らかとなった。(図2)特筆すべきは、マウス骨髄内で3系統の形態異常も再現されている点である。現在、MDS患者7例について追加移植を行っている。さらに、細胞外マトリックス蛋白質とMDS細胞の相互作用について解析を進めており、これらの成果をもとにMDS幹細胞の骨髄微少環境における維持機構を明らかにすることは有効な治療法を開発する上で重要な知見を提供すると考える。(Hae

matologica 2011:96:543) 、

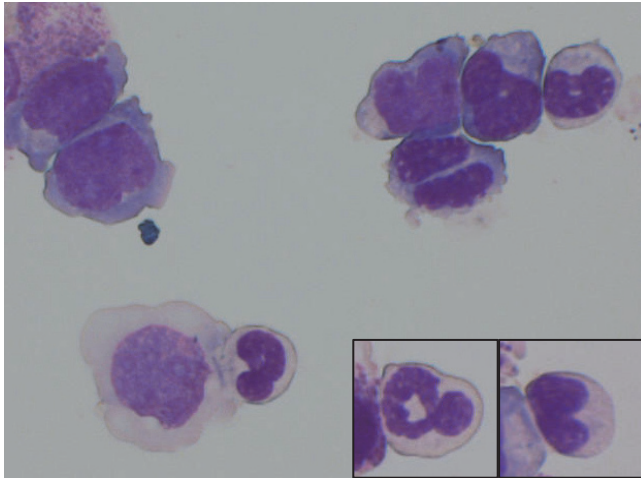


図1 免疫不全マウス骨髄内における MDS 細胞

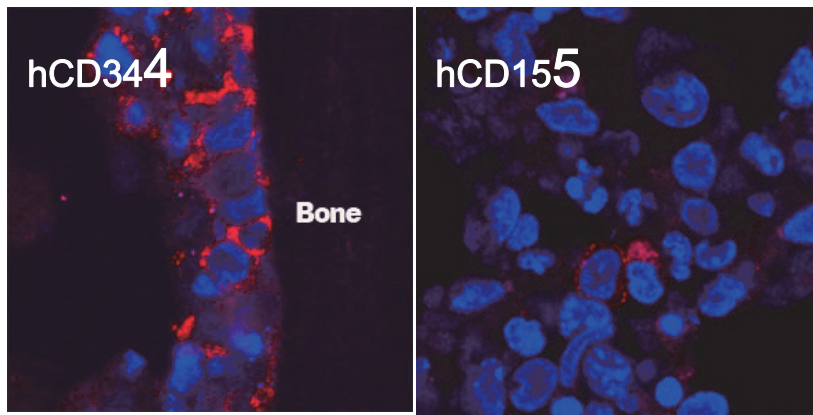
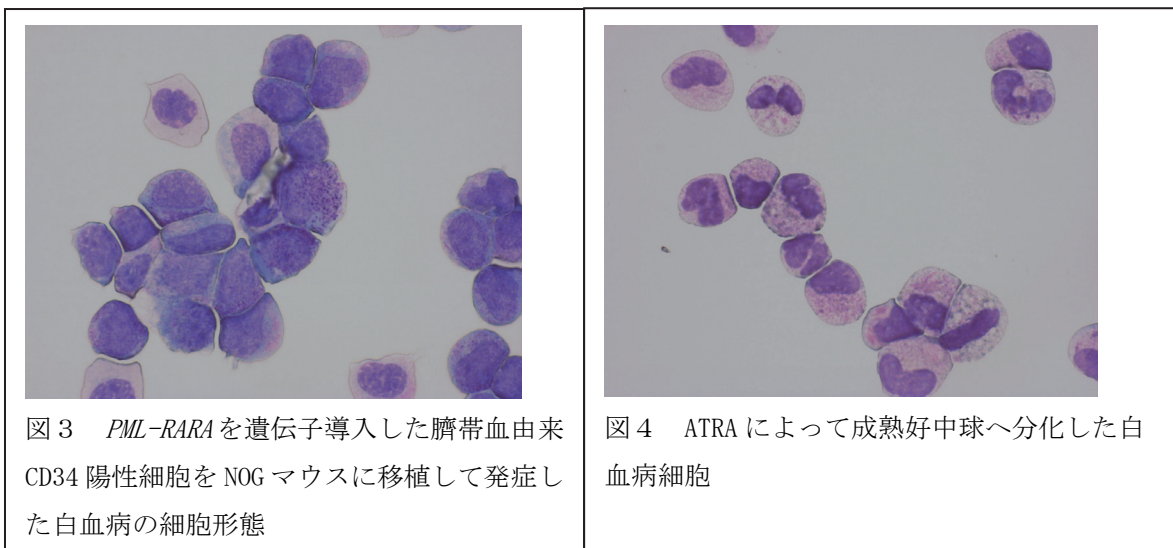


図2 免疫不全マウス骨髄内における CD34 陽性 CD38 陰性 MDS 細胞の局在

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) の一病型である急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia: APL) は明らかな前癌状態を経ずに発症する。APL に特異的とされる異常キメラ遺伝子 *promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha* (*PML-RARA*) の遺伝子導入マウスモデルが作製され、*in vivo*における白血病発症能が示されてきた。しかし、その多くが発症までに長期の潜伏期を要すること、また発症に伴って生じる染色体・遺伝子解析を行ってもマウス由来であることから、これらはヒト疾患モデルとしては不十分であると考えられた。我々はこれまでに、*PML-RARA* をヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞に遺伝子導入して強力な免疫不全マウスである NOG マウスに移植することにより、形態学的、生物学的、さらには遺伝子発現上もヒト APL に極めて類似した白血病を発症する *in vivo* APL モデルを確立した。すなわち移植後 3~4 ヶ月後の時点で、約 40%のマウスに GFP 陽性細胞の生着を確認した。この細胞を sort してサイトスピン標本作製したところ Auer 小体や Faggot 細胞を認めた (図 3)。細胞

表面マーカー解析では CD13+/CD33*/CD34-/HLA-DR- であり、レチノイン酸投与により、*in vitro* および *in vivo* において、成熟好中球への分化を認めた (図4)。またこの細胞は2次移植が可能であった。以上の結果から、臨床で認められる APL に極めて類似した性状を呈しており、有用なヒト APL 発症モデルであると考えられた。microarray 解析からも APL の臨床検体と極めて類似した発現パターンが確認された。



さらにこのモデルを用いて、APL の発症・維持機構を細胞の分化段階という観点から解析した。*PML-RARA* 導入による APL 発症は、CD34⁺細胞のうち CD38⁻細胞のみならず CD38⁺細胞である共通骨髄性前駆細胞 (common myeloid progenitor: CMP) でも可能であった (図5)。また、本モデルから得られる APL 細胞はほぼ CD34⁻で、preliminary な検討では2次移植における生着 (白血病の維持) に CD34 の発現は必ずしも必須ではなかった。今後は遺伝子レベルにおける解析を行う予定である。

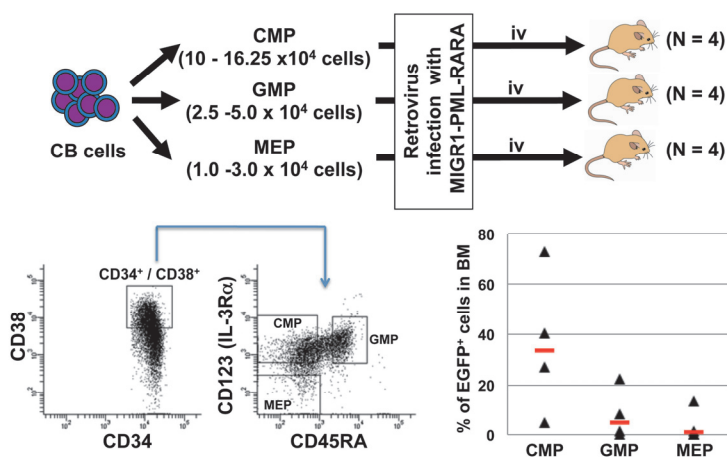


図5 *PML-RARA* 遺伝子導入による共通骨髄性前駆細胞 (CMP) からの APL 発症。

IV 考察

AMLの一病型である急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia:APL) に特異的な異常キメラ遺伝子*PML-RARA*を、臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞に遺伝子導入してNOGマウスへ移植するとヒトAPLに極めて類似した病態を呈することを明らかにした。

同様の実験系を用いて、CN-AMLにしばしば認められる遺伝子異常である*FLT3-ITD*変異と*NPM1*変異を同時に臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞へ遺伝子導入しNOGマウスへ移植したが、十分な遺伝子導入が認められたものの、現在までのところAMLの発症は認めていない。一方、DNA Methyltransferasesと結合して異常転写機能を有する*PML-RARA*や*MLL-AF9*、*AML1-ETO*を遺伝子導入した場合にはAMLを発症することから、さらにDNAメチル化に関与する遺伝子変異を同時に組み込むことが AML発症において重要であると考えられた。

V 研究成果の発表

・雑誌

1. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M and **Ando K**. Establishment of xenograft model of human myelodysplastic syndromes. **Hematologica**, 96, 543-554, 2011
2. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, **Ando K**. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. **Blood** 118,2941-2950, 2011
3. Onizuka M, Kunii N, Toyosaki M, Machida S, Ohgiya D, Ogawa Y, Kawada H, Inoko H, **Ando K**. Cytochrome P450 genetic polymorphisms influence the serum concentration of calcineurin inhibitors in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplant**. 46, 1113-1117, 2011
4. Nakagawa Y, Suzuki K, Hirose T, Chou T, Fujisawa S, Kida M, Usuki K, Ishida Y, Taniguchi S, Kouzai Y, Tomoyasu S, Miyazaki K, Higashihara M, **Ando K**, Aoki S, Arai A, Akiyama N, Hatake K, Okamoto S, Dan K, Ohyashiki K, Urabe A . Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying hematopoietic diseases: a multi-institutional study. **J Infect Chemother**. 17, 58-67, 2011
5. Chou T, Tobinai K, Uike N, Asakawa T, Saito I, Fukuda H, Mizoroki F, **Ando K**, Iida S, Ueda R, Tsukasaki K, Hotta T, and other members of the Lymphoma Study Group (LSG) of Japan Clinical Oncology Group (JCOG), Japan. Melphalan-Prednisone and Vincristine-Doxorubicin-Dexamethasone Chemotherapy Followed by Prednisone/Interferon Maintenance Therapy for Multiple Myeloma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG0112. **JJCO** 47, 586-589, 2011
6. Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, **Ando K**, Ninomiya H, Kawaguchi T,

- Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian CL, Valentine ME, Khursigara G, Ozawa K, Omine M. Safety and Efficacy of the Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Japanese Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The AEGIS Clinical Trial. **Int J Hematol**, 93, 36-46, 2011
7. Suzuki Y, Inokuchi S, Takazawa K, Umezawa K, Saito T, Kidokoro M, Tanaka M, Matsuzawa H, Inoue S, Tuchiya I, **Ando K**. Introduction of human b-defensin-3 into cultured human keratinocytes and fibroblasts by infection of a recombinant adenovirus vector. **Burns** 37, 109-116, 2011
 8. Ogura M, **Ando K**, Taniwaki M, Watanabe T, Uchida T, Ohmachi K, Matsumoto Y, Tobinai K. A Feasibility and Pharmacokinetic Study of Bendamustine Hydrochloride in Combination With Rituximab in Relapsed or Refractory Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. **Cancer Sci**. 102, 1687-1692, 2011
 9. Tsuboi K, Yokozawa T, Sakura T, Watanabe T, Fujisawa S, Yamauchi T, Uike N, **Ando K**, Kihara R, Tobinai K, Asou H, Hotta T, and Miyawaki S. A Phase I study to assess the safety, pharmacokinetics and efficacy of barasertib (AZD1152), an Aurora B kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced acute myeloid leukemia. **Leukemia Res**. 35, 1384-1389, 2011
 10. Kobayashi Y, Sakamaki H, Fujisawa S, **Ando K**, Yamamoto K, Okada M, Ishizawa K, Nagai T, Miyawaki S, Motoji T, Usui N, Iida S, Taniwaki M, Uoshima N, Seriu T, Ohno R. Lack of non-hematological cross intolerance of dasatinib to imatinib in imatinib-intolerant patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia or acute lymphatic leukemia: a retrospective safety analysis. **Int J Hematol** 93,745-749, 2011
 11. Uchida T, Ogawa Y, Kobayashi Y, Ishikawa T, Ohashi H, Hata T, Usui N, Taniwaki M, Ohnishi K, Akiyama H, Ozawa K, Ohyashiki K, Okamoto S, Tomita A, Nakao S, Tobinai K, Ogura M, **Ando K**, and Hotta T. Phase I/II study of azacitidine in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. **Cancer Sci**, 102, 1680-1686, 2011
 12. Shirasugi Y, **Ando K**, Miyazaki K, Tomiyama Y, Okamoto S, **Kurokawa M**, Kirito K, Yonemura Y, Mori S, Usuki K, Iwato K, Hashino S, Wei H, Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized clinical trial. **Int J Hematol**, 94, 71-80, 2011
 13. Watanabe T, Morishima Y, Shibata T, Maseki N, Kinoshita T, Suzuki T, Yamaguchi M, **Ando K**, Ogura M, Taniwaki M, Uike N, Takeuchi K, Nawano S, Terauchi T, Tsukasaki K, Hotta T, and Tobinai K. Phase II/III Study of Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisolone (R-CHOP) Compared to Two-Week R-CHOP in Untreated Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: Japan Clinical Oncology Group (JCOG) 0203 Trial. **J Clin Oncol**. 29, 3990-3998, 2011
 14. Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K,

- Oyaizu N, Nakamura N, **Ando K**, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor. **Blood**, in press, 2012
15. Ogura M, Hatake K, **Ando K**, Tobinai K, Tokushige K, Ono C, Ishibashi T, Vandendries E. Phase I Study of Anti-CD22 Immunoconjugate Inotuzumab Ozogamicin Plus Rituximab in Relapsed/Refractory B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Science*, in press, 2012
 16. Matsushita H, Nakamura N, Tanaka Y, Ohgiya D, Tanaka Y, Damdinsuren A, Ogawa Y, **Ando K**, Miyachi H. Clinical and pathological features of B-cell non-Hodgkin lymphomas lacking surface expression of immunoglobulin light chains. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, in press, 2012
 17. Shirasugi Y, **Ando K**, Miyazaki K, Tomiyama Y, Iwato K, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Hashino S, Ninomiya H, Mori S, Yonemura Y, Usuki K, Wei H, Lizambri R. An Open-Label Extension Study Evaluating the Safety and Efficacy of up to 3.5 years of Romiplostim in Thrombocytopenic Japanese Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) **Int J Hematol**, in press, 2012
 18. Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Yabe T, Nakaoka H, **Ando K**, Gennery AR, Morishima Y. Single Nucleotide Polymorphisms and outcome risk in unrelated Haematopoietic Stem Cell Transplantation: An exploration study. **Blood**, in press, 2012