

Bmi-1 の発現をマーカーにした癌幹細胞の単離と癌幹細胞 特異的な癌治療法の開発

大阪大学 保仙 直毅
派遣期間 2004 年4月1日～2007 年3月 30 日
研究機関 Department of Pathology, Stanford University School of
Medicine, Beckman Center, 279 Campus Drive, Stanford,
CA 94305, USA
研究指導者 Dr. Irving L Weissman

まず、当初、目的として掲げた Bmi-1 遺伝子の発現に基づいた癌幹細胞のプロスペクティブな同定が可能かどうか検討するためのツールとして Bmi-1GFP ノックインマウスの作製を行った。Bmi1 遺伝子は、幹細胞が自己複製するために必須の分子で、いくつかの正常および腫瘍幹細胞で高発現していることがすでに報告されていた。そこで、この遺伝子の発現レベルをマーカーとすることにより、様々なタイプの正常あるいは腫瘍幹細胞を同定できるのではないかと考え、Bmi-1 発現細胞が GFP 陽性細胞として同定できるマウスを作製した。

2種類のノックインマウスを作製した。一つは、GFP を Bmi-1 の翻訳開始部位にノックインしたマウスで、GFP の発現レベルは高かったが、Bmi-1 の片方の allele は失われている。もう一つのストレインは Bmi-1 と GFP の fusion protein をノックインしたもので、GFP の発現は弱かったが、recombined allele からも Bmi-1 蛋白は GFP との融合蛋白の形で発現される。これらの二つのストレインはそれぞれの短所を補い合うような形で今後使用されると考えられる。

これらのマウスにおいて、GFP の発現レベルは細胞の分化レベルと強く相関し、最も未分化な CD150⁺CD34⁻Flk2⁻Sca-1⁺c-kit⁺lin⁻造血幹細胞分画において、最も強い GFP の発現が見られた。さらに、in-vivo reconstitution analysis により、GFP の発現と lineage marker の発現のみをマーカーとして、1/49 の頻度まで造血幹細胞が濃縮可能であることを明らかにした。次に、このマウスの骨髓細胞に BCR/ABL または TEL/PDGFR-ires-AML1/ETO をレトロウイルスを用いて導入し、レシピエントマウスに移植することにより発症させたマウス白血病モデルにおいて、Bmi-1 の発現を検討した。どちらのモデルにおいても未分化な白血病細胞である Flk2⁻c-kit⁺lin⁻Sca-1⁺細胞は Bmi-1 高発現分画に濃縮され、Bmi-1 は白血病幹細胞のマーカーとしても有用である可能性が示唆された。さらに、造血以外の組織においても、Bmi1 遺伝子の発現レベルによって、細胞を subpopulation に分けうることも明らかにした。(Hosen N et al. Stem Cells in press)

現在、これらの組織において、Bmi-1 高発現細胞分画に tissue specific stem cell が濃縮されているかどうかを共同研究者が検討している。さらに、このマウスを種々の腫瘍モデルマウスと交配することにより、腫瘍幹細胞が Bmi-1 高発現分画に濃縮されるかを検討する研究も共同研究により進行中である。これらの研

究は、それぞれの組織幹細胞の研究に従事する研究者との共同研究に委ねることとし、残された派遣期間に関しては、下記の三つの研究テーマに移行することとした。

一つは、白血病幹細胞の発生に関する研究である。白血病幹細胞は正常幹細胞に起源するのか、それとも、自己複製能を持たない前駆細胞が幹細胞性の獲得により白血病幹細胞となりうるのかという問いは腫瘍幹細胞の発生を理解する上で非常に重要である。私は、この研究において、代表的な白血病の原因融合遺伝子である AML1/ETO、PML/RAR α はともに、本来自己複製能を持たない骨髄系前駆細胞を *in-vitro* では不死化することができるが、*in-vivo* ではそれらの細胞は増幅されないことを明らかにした。一方、造血幹細胞への導入により、AML1/ETO は造血幹細胞の蓄積を誘導するのに対して、そのような効果は PML/RAR α では見られなかった。これらの結果は、AML1/ETO は造血幹細胞のレベルで発生していることを支持するのに対し、PML/RAR α 前骨髄性白血病においては、増幅せずに残存している前駆細胞からも白血病幹細胞が発生する可能性を示唆した(論文投稿中)。

さらに、私が日本で作出した WT1-GFP ノックインマウスの解析を行った。WT1 はほとんど全ての白血病に高発現する分子で、白血病細胞の分子マーカーおよび免疫療法における標的分子として非常に重要である。私は以前、正常ヒト CD34 陽性造血前駆細胞分画のうち 1.2%の細胞が WT1を発現していることを明らかにしていた。そこで、正常、あるいは白血病における WT1 発現細胞の性質を明らかにするため、WT1-GFP ノックインマウスを既に日本で作製していた。

このマウスにおいては WT1 発現細胞が GFP を発現するので、WT1 発現細胞を viable な状態で同定単離可能である。まず、このマウスの正常骨髄細胞を解析し、正常造血幹細胞が濃縮されている Flk2⁻c-kit⁺lin⁻Sca-1⁺細胞分画には WT1 発現細胞は存在せず。骨髄球系前駆細胞特に megakaryocyte-erythrocyte progenitor に WT1 発現細胞が存在することを明らかにした。次に、このマウスの骨髄細胞に BCR/ABL あるいは TEL/PDGFR β -ires-GFP 導入することにより誘発した白血病において WT1 発現細胞の分布を解析した。興味深いことにいずれの白血病モデルにおいても未分化な細胞集団と考えられる c-kit⁺lin⁻Sca-1⁺(KLS)分画に多数の WT1 発現細胞が出現した。さらに、この WT1 陽性 KLS 細胞を移植することによりレシピエントマウスに白血病を発症させることが可能であることも明らかにした。すなわち、WT1 は正常造血幹細胞には発現していないが、白血病幹細胞に発現する腫瘍幹細胞特異的分子である可能性を明らかにした。(論文投稿中)

最後に、帰国後の血液内科領域における私の研究の序章として、急性骨髄性白血病幹細胞特異的抗原の同定を目的とした研究を派遣期間の最後の一年に行った。急性骨髄性白血病においては、Dick らのグループによる精力的な研究の結果、CD34⁺CD38⁻分画に白血病幹細胞が存在することが明らかになっている。そこで、ヒト急性骨髄性白血病から CD34⁺CD38⁻分画を FACS-sort し、それらの細胞の細胞表面に発現している分子を signal sequencing trap 法にて数多くクローニングした。それらのうち、多くの急性骨髄性白血病幹細胞に発現しているが、正常造血幹細胞に発現していない分子を選択するため、定量的 RT-PCR によるスクリーニングを行った。その結果、CD96 という分子のみが、多くの白血病において、白血病幹細胞分画 (Lin⁻CD34⁺CD38⁻)に発現しているのに対して、正常骨髄の造血幹細胞分画(Lin⁻

CD34⁺CD38⁻CD90⁺)にはほとんど発現していないことを明らかにした (Fig1)。さらに、免疫不全マウスへの移植実験により、CD96 陽性白血病細胞が白血病幹細胞を濃縮していることが機能的にも示された。すなわち、CD96 は白血病幹細胞と正常造血幹細胞を区別するマーカーであり、自家造血幹細胞移植において白血病幹細胞の除去に役立つ可能性がある。さらに、白血病特異的な抗体療法の標的となりうる可能性を持っている (論文投稿中)。

まとめると、当初、目的として掲げた Bmi-1 の発現に基づいた腫瘍幹細胞の prospective な同定に関しては、そのためのツールは早々に完成させることができた。それを用いた腫瘍幹細胞の同定の試みは現在進行中である。さらに、派遣期間および、研究員採択前の1年の計3年を利用して、マウスを用いた白血病幹細胞の研究課題を2つと、ヒト白血病検体を用いた研究課題を1つ、終了させることができた。非常に有意義な経験で、今後、日本の科学振興に役立つことができると思う。

Can AML-LSC be distinguished from normal HSC?

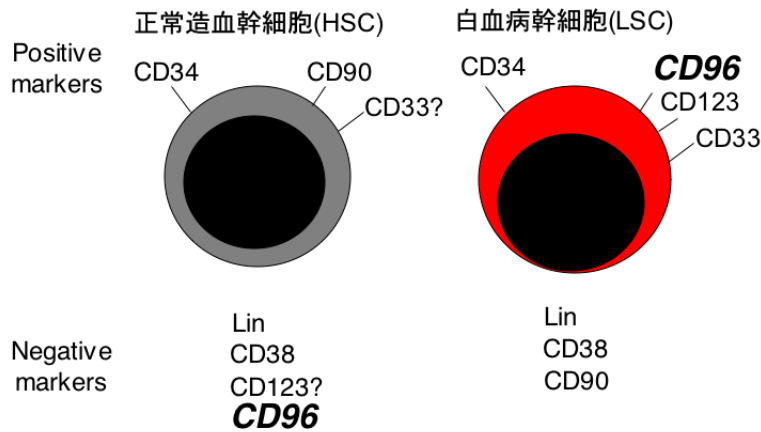


Fig.1 CD96 is expressed on leukemia stem cells but not normal HSCs