

〔別紙 1〕

論文内容の要旨

論文題名 造血幹細胞および白血病幹細胞における転写因子 STAT5 の機能

指導教官 中内 啓光 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 加藤 裕子

【序】

長年にわたり各種サイトカインによる造血幹細胞の体外増幅が試みられてきた。そのような中、依馬らは高度に純化した造血幹細胞1個について検討を行い、stem cell factor (SCF) および thrombopoietin (TPO) の組み合わせが、*ex vivo* で造血幹細胞の自己複製を効率よく誘導することを報告した。実際、TPO および TPO 受容体の欠損マウスでは造血幹細胞の異常が示されている。一方、ヒト造血幹細胞の増幅には interleukin-6 (IL-6) および可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) による gp130 シグナルの活性化が有効であることが示唆されている。サイトカインをはじめとした外的因子によるシグナルは、最終的には一連の転写因子の活性化を誘発し、細胞の生物学的動態を制御する。なかでも、Janus family tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) 経路はサイトカインの生理活性の発現に重要な役割を担っている。TPO の下流では転写因子 STAT1、STAT3、STAT5 が、gp130 の下流では STAT3 が活性化されることが知られている。最近 STAT5A/B ダブルノックアウトマウスが作製され、その造血幹細胞の骨髄再建能に障害があることが証明された。以上の知見は、STAT3 あるいは STAT5 が造血幹細胞

胞の自己複製制御に関与し、造血幹細胞の増幅の鍵を握る分子である可能性を示唆している。

一方で、様々な造血系腫瘍において高頻度に STAT3 および STAT5 の活性化が報告されている。近年、腫瘍細胞の中にごく少数の幹細胞が存在し、自己複製と限られた分化を繰り返しながら腫瘍構成細胞を供給し続けるという「腫瘍幹細胞システム」という概念が提唱されている。マウス白血病モデルを用いた最近の知見から、白血病幹細胞システムの形成・維持には、造血幹細胞における自己複製能の増強あるいは骨髄球系前駆細胞への自己複製能の付与が関与することが示され、この自己複製機構の相違を解明することは今後の重要な課題である。

本研究では活性型 STAT5 変異体の過剰発現により、STAT5 の活性化が造血幹細胞の体外増幅に有効であることを示し、またマウス白血病モデルを作製しその解析を通して骨髄増殖性疾患 (myeloproliferative disorder: MPD) 病態における STAT5 の恒常的活性化の意義を明らかにした。

## 【方法と結果】

### (1) 活性型 STAT5 変異体の転写活性化能の比較

造血幹細胞における STAT の機能を検討するために、恒常的に二量体化する活性型 STAT3 および 3 種類の活性型 STAT5 変異体 (STAT5 1\*6、STAT5 1\*7、STAT5 #2) を解析に用いた。レポーターアッセイにより、これら活性型 STAT5 変異体における転写活性化能の強さを比較したところ、STAT5 1\*6、STAT5 1\*7、STAT5 #2 の順に強いことが明らかとなった。

### (2) コロニーアッセイ

造血幹細胞の体外培養における STAT3 および STAT5 の効果を検討するために、活性型 STAT 変異体を過剰発現させた造血幹細胞 (CD34<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>lineage marker<sup>-</sup>: CD34<sup>+</sup>KSL 細胞) を、未分化性を維持するサイトカイン条件下で 7 日間液体培養を行った。その後、分化を誘導するサイトカイン条件下でコロニーアッセイを行うことにより、液体培養後の細胞における増殖および多分化能を検討した。その結果、活性型 STAT5 発現細胞では、直径 1mm 以上の高い増殖能力を有するコロニーを形成する細胞、High-proliferative-potential colony-forming cell (HPP-CFC) が GFP コントロールと比較して著明に増加しており、多系統の細胞種からなる colony-forming unit-

granulocyte/erythroid/megakaryocyte/macrophage (CFU-nmEM) も高頻度に認められた。この CFU-nmEM 形成細胞数は、液体培養前の造血幹細胞と比較して野生型 STAT5 では約 10 倍に、活性型 STAT5 1\*6 では約 20 倍にも増加していた。以上の所見は、STAT5 が体外培養において多能性前駆細胞を増殖し得ることを示している。一方、活性型 STAT3 については有意な機能は認められなかった。

### (3) STAT3 コンディショナルノックアウトマウスの解析

造血幹細胞における STAT3 の機能をさらに理解するために、Mx-Cre:STAT3 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、造血幹細胞における STAT3 欠損の影響を検討した。STAT3<sup>Δ/Δ</sup>マウスでは、骨髄細胞数および造血幹細胞を含む未分化な前駆細胞分画である KSL 細胞数に、STAT3<sup>flx/flx</sup>コントロールと比較して有意差は認められなかった。また、STAT3<sup>Δ/Δ</sup>マウスより採取した CD34KSL 造血幹細胞のコロニー形成能および多分化能も正常であることを確認した。以上の所見は、STAT3 が造血幹細胞の自己複製能および多分化能に必須ではないことを示唆している。

### (4) 競合的長期骨髄再建アッセイ

STATの活性化により体外培養においても造血幹細胞が維持されるかを検討するために、活性型 STAT3 および 3 種類の活性型 STAT5 変異体をそれぞれ造血幹細胞に遺伝子導入し、7 日間培養後、致死量放射線照射したマウスに骨髄移植を行った。その結果、STAT5 1\*6 および STAT5 1\*7 移植マウスは移植後 4 週前後に、STAT5 #2 移植マウスは 1 2 週前後に全例で致死性の MPD を発症した。一方、野生型 STAT5 および活性型 STAT3C 移植マウスでは MPD を発症しなかった。以上は、MPD の発症およびその時期が STAT5 の転写活性の強さに相関していることを示唆している。移植後 1 2 週まで生存したマウスについて末梢血の解析を行った結果、野生型 STAT5 および活性型 STAT5 #2 移植マウスでは、GFP コントロールと比較して有意に高いキメリズムが認められた。一方、活性型 STAT3 移植マウスではキメリズムの上昇は認められなかった。さらに 10 日間培養した場合、GFP コントロールでは造血幹細胞が完全に失われるのに対し、活性型 STAT5 #2 発現細胞中には造血幹細胞が維持されることが確認された。以上より、STAT5 の活性化は *ex vivo* における造血幹細胞の自己複製を促進すること、一方 STAT3 の活性化は造血幹細胞の体外増幅には寄与しないことを明らかにした。

### (5) 白血病幹細胞における STAT5 の機能解析

MPD 発症における STAT5 の機能を解析するために、自己複製能を持たない多能性前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>KSL 細胞) に活性型 STAT5 1\*6 を遺伝子導入し、コロニーアッセイおよび骨髄移植を行った。多能性前駆細胞に活性型 STAT5 1\*6 を発現させた場合においても、コロニーアッセイでは HPP-CFC、CFU-nmEM の増加を認めたものの、移植マウスにおける骨髄再建には全く寄与せず、MPD を誘発しなかった。以上の所見は、MPD 病態の確立には STAT5 が造血幹細胞レベルで恒常的に活性化することが必須であり、STAT5 の活性化だけでは多能性前駆細胞に自己複製能を付与することはできないことを示している。

#### 【考察】

本研究において、STAT5 の活性化は *ex vivo* において造血幹細胞の自己複製を促進するが、STAT3 の活性化は有意な効果が認められなかった。依馬らは、*ex vivo* における造血幹細胞の自己複製の誘導に TPO は有効であるが、IL-6 は有効ではないことを報告している。TPO は主に STAT5 を活性化し、IL-6 は STAT3 を活性化することが知られており、本研究の結果は依馬らの所見と一致するものである。しかしながら、*in vivo* においても STAT5 が恒常的に活性化され続けると、移植マウスは MPD を発症した。この MPD 病態の確立には、STAT5 が造血幹細胞レベルで恒常的に活性化することが必須であることを示した。これまで MPD は造血幹細胞に起因する病態と考えられてきたが、本研究の知見はこの仮説を裏付けるものである。ヒト MPD 症例の多くで認められる JAK2 の活性型変異やヒト慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) 症例で観察される染色体転座遺伝子 BCR-ABL の下流では、STAT5 の恒常的な活性化が報告されているが、STAT5 の活性化は造血幹細胞の自己複製能を増強するという局面で、白血病幹細胞システムの確立・維持に寄与しているものと考えられる。

STAT5 が正常造血幹細胞および白血病幹細胞において、その自己複製制御分子として機能するという知見は、STAT5 を新しい創薬のターゲットとして提示するものである。STAT5 の活性化化合物は造血幹細胞の体外増幅に、その阻害化合物は MPD・急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) の治療へと応用しうるものと考えられ、STAT5 は正常造血幹細胞のみならず白血病幹細胞操作のより根本的かつ効果的な標的分子としての可能性を秘めている。