

論文の内容の要旨

論文題目 hairy enhancer of split-1 (Hes-1)による造血前駆細胞の不死化と、
未分化性維持による白血病発症への関与の可能性

指導教員 北村俊雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中原 史雄

1. 研究背景と目的

Notch シグナルは個体発生から成体まで、さまざまな細胞の生存、増殖、分化などを決定するシステムとして、ショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存されている。ヒトにおいては、4つのNotch受容体(Notch1, 2, 3, 4)と5つのNotchリガンド(Delta1, 3, 4およびJagged1, 2)がこれまで報告されており、中でもNotch1は成体の骨髄造血を維持する二次造血に必須である。

近年までヒトで検出されたNotch変異はそれほど高い頻度ではなかったが、2004年になりヒトT-ALLにおいて50%以上という非常に高い頻度でNotch1シグナル活性化型変異が検出されたという報告がなされ、白血病などの悪性腫瘍発症の原因としてNotchシグナルの制御異常がにわかに注目されるようになった。

Notchシグナルの転写標的として同定されているhairy enhancer of split-1(Hes-1)はbasic helix-loop-helix (bHLH)型の転写抑制因子であり、他の活性化型転写因子のプロモーターに結合することでその転写を抑制し、種々の系統の細胞で分化抑制的に働く。

2003年には、骨髄由来の造血幹細胞にレトロウイルスでHes-1を導入し強制発現させた細胞をマウスに移植すると、末梢血において半年以上に渡りHes-1陽性細胞が高い割合で認められ、Hes-1は造血幹細胞維持に何らかの寄与をする可能性があることをKunisato等は報告している。

またNotch1の活性化型変異による造血幹細胞の不死化は報告されたものの、造血幹細胞よりも分化した造血前駆細胞でも同様の現象が生じることは示されておらず、Hes-1等

の野生型転写因子の発現制御異常により同様の不死化が起こり得るという報告もこれまでなされていない。

本研究ではまずヒト慢性骨髄性白血病（CML）の骨髄サンプルを用いて Hes-1 の発現を調べ、CML の急性転化に Hes-1 が何らかの関係をしているかを調べた。続けて、Hes-1 を造血前駆細胞に導入し、in vitro において Hes-1 導入細胞が不死化するか、またどのような形態学的変化等が認められるかを調べた。さらに Hes-1 単独や、Hes-1 と CML の原因遺伝子 bcr-abl の組み合わせを造血前駆細胞に導入、移植することにより、白血病化が起こるかをマウス移植実験系で検証した。

2. 結果

1. ヒト慢性骨髄性白血病の急性転化症例ではHes-1の発現量が高い症例を約3割において認める

今回、ヒト慢性骨髄性白血病の骨髄または末梢血サンプルを用いて、方法に記載したように mRNA 抽出後、cDNA を作成し、human Hes-1 の発現量を real-time PCR により測定した。その結果を示す。(Fig.1)

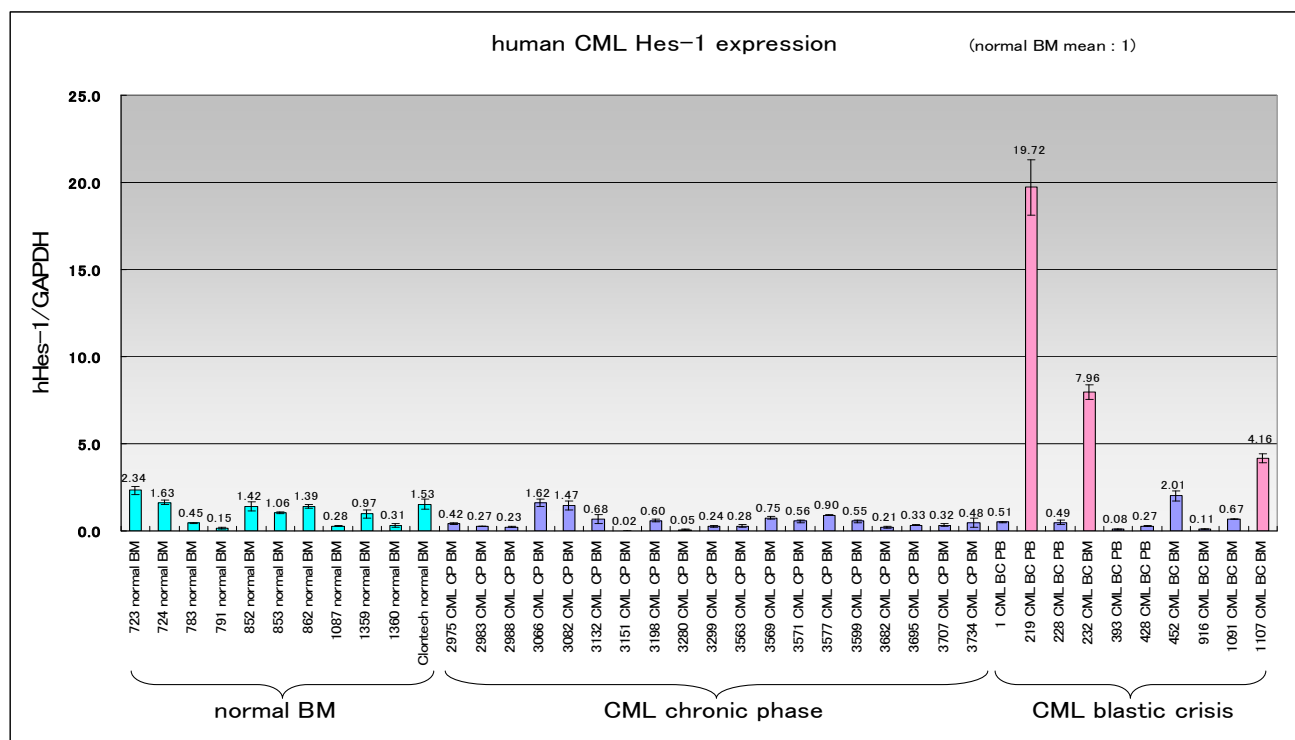


Fig.1 ヒト慢性骨髄性白血病サンプルでのhuman Hes-1発現量

正常骨髄サンプル10症例、Clontech製正常骨髄サンプル1つ、ヒトCMLサンプル19症例、ヒトCML急性転化10症例のhuman Hes-1発現量を real-time PCRにより測定した結果を示している。(CP: chronic phase, BC: blastic crisis)

正常骨髄サンプル10症例のHes-1/GAPDHの平均値が1となるように補正している。

急性転化10症例のうち3症例にて、正常骨髄サンプル平均値の4倍以上のHes-1発現上昇を認めた。

以上のように、ヒト慢性骨髄性白血病サンプル計 29 サンプルのうち、急性転化症例 10 サンプルと、未治療慢性期症例が 19 サンプルの Hes-1 発現量を比較すると、急性転化 10 症例のうち 3 症例にて Hes-1 の上昇（正常骨髄の 4 倍以上の Hes-1 発現）を認めた。Hes-1 が慢性骨髄性白血病の急性転化に何らかの影響を与えており、いわゆる 2nd hit として関与している可能性が示唆された。

2. Hes-1 導入により造血前駆細胞は不死化する

FACS Aria でマウス骨髄からソートしてきた造血幹細胞（KSL）、共通骨髄系前駆細胞（CMP）、顆粒球マクロファージ前駆細胞（GMP）に Hes-1 をレトロウイルスで感染導入し、メチルセルロースにて培養を開始したところ、SCF 50 ng/mL、IL-3 20 ng/mL、TPO 20 ng/mL、IL-6 20 ng/mL を加えた条件下では直ちに継代が可能となり、単一な細胞から成るコロニー形成を認めた。（Fig.2 左）またサイトスピン像では、一部細胞質に空胞や顆粒を認めるものの、核・胞体比（N/C 比）が比較的大きく、芽球様に見える細胞が多数を占めることが分かった。（Fig.2 右）

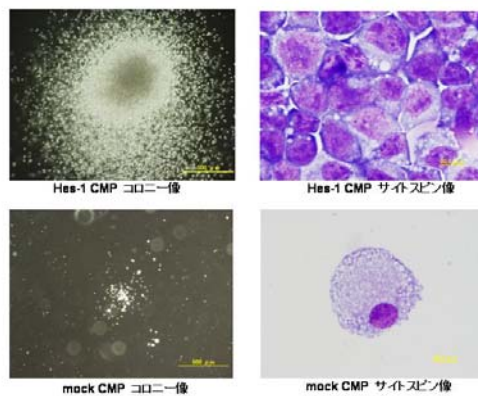


Fig.2 Hes-1 導入細胞のコロニー像とサイトスピン像

CMP への Hes-1 導入により、巨大なコロニー形成と、芽球様の細胞像を認めた。KSL、GMP でもほぼ同様の結果を認めた。それに対して、CMP への mock 導入細胞では 1 週間後にはほとんどの細胞は死んでおり、わずかに生存した細胞はマクロファージ様であった。

メチルセルロースによるコロニーアッセイでは、Hes-1 を導入した細胞は 4 回以上の継代が可能であったが、mock ベクターを導入した細胞では 2 回目の継代時にはコロニーが死滅しており継代が不可能であった。（Fig.3）

また継代は 1 年間以上継続できることを確認し、Hes-1 導入により造血前駆細胞は不死化することが明らかとなった。

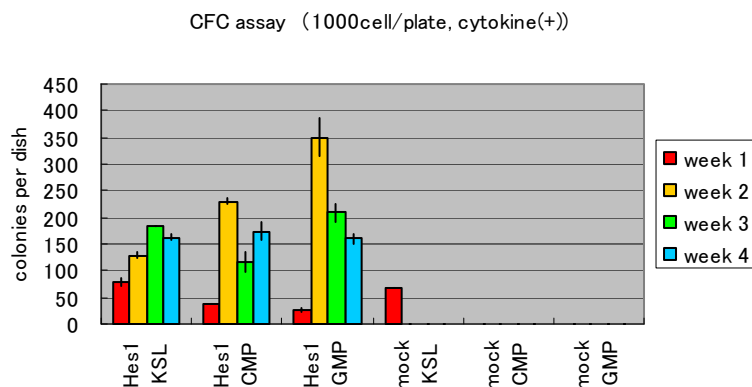


Fig.3 Hes-1 導入細胞のコロニーアッセイ

Hes-1 または mock を KSL、CMP、GMP にそれぞれ感染導入し、メチルセルロースにて継代が可能かどうかをみた。Hes-1 導入細胞は 4 回以上の継代が可能であったが、mock 導入細胞では 2 回目の継代時にはコロニーが死滅しており、継代が不可能であった。

3. Hes-1 導入造血前駆細胞の移植では急性白血病は発症しない

Hes-1 を導入した造血前駆細胞を移植した場合に白血病を発症するか否かについての報告は未だ成されていない。今回、我々は造血前駆細胞が Hes-1 によって不死化することを認めたことから、Hes-1 導入 CMP および Hes-1 導入 GMP を移植することで白血病が発症するかどうかを検証した。

FACSaria にてマウス骨髄からソートしてきた CMP、GMP にそれぞれ pMYs-IRES/GFP Hes-1 もしくは GCDNsam-IRES/NGFR Hes-1 ベクターをレトロウイルスで感染導入し 3 日が経過した後の細胞を、5.25Gy の非致死量放射線照射後のマウスに移植を行い、白血病が発症するかを検証した。

合計 11 回以上の移植実験を行ったが、1-2 ヶ月ごとの定期的採血においても GFP もしくは NGFR 陽性細胞を認めず、移植後 1 年以上が経過しても Hes-1 導入細胞の骨髄や末梢血での増加は認められず、Hes-1 導入細胞の移植による白血病発症は認められなかった。

以上より、Hes-1 を導入した造血前駆細胞の移植では、白血病は発症しないことが分かった。

4. 造血前駆細胞にHes-1 とbcr-ablの両遺伝子を導入後移植するとCMLの急性転化を急速に発症する

先に示したようにヒト CML の急性転化症例では 3/10 の割合で Hes-1 上昇を認めたことから、Hes-1 と bcr-abl を組み合わせて造血前駆細胞に導入しマウスに移植することで、同様の CML 急性転化を認めることが出来るかを確認することとした。

これまで bcr-abl による in vivo 移植モデルとしては、造血幹細胞に bcr-abl を感染導入し

その細胞を移植した場合には CML を発症し移植後 30 日程度で死亡するが、CMP や GMP といった造血前駆細胞に bcr-abl を導入後移植しても CML は発症しないことが報告されている。

マウス骨髄から FACS Aria にて KSL、CMP、GMP をソートし、Hes-1 と bcr-abl 両遺伝子を感染導入し、感染 3 日目に 5.25Gy 放射線照射後マウスに移植する実験を行った。ポジティブコントロールとして KSL も導入対象とした。

Hes-1 および bcr-abl 導入細胞の移植後、30 日以内にどの群でも白血病を発症し死亡するマウスが出現することが判明した。(Fig.4) 発症の早いマウスでは移植後わずか 18 日で致死的な白血病を発症した。

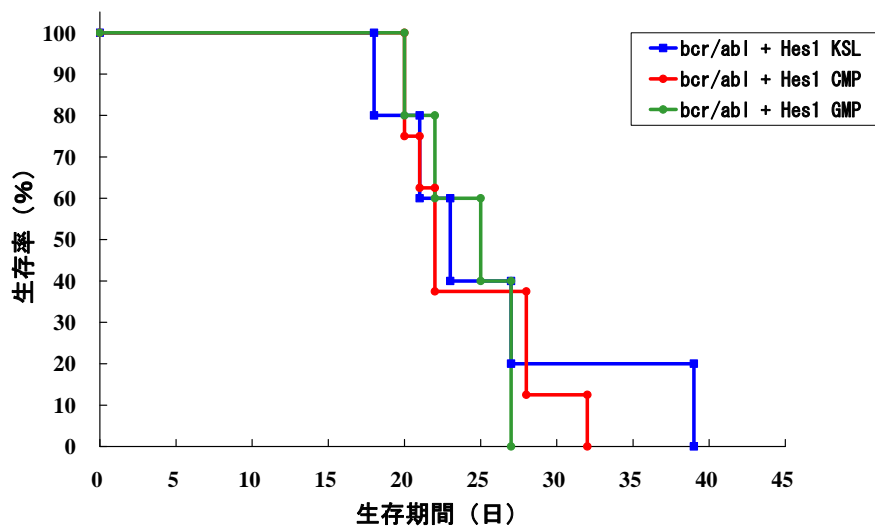


Fig.4 Hes-1+bcr-abl両遺伝子導入細胞の移植における生存曲線

Hes-1 および bcr-abl を C57BL/6-Ly5.1 由来の KSL、CMP、GMP に導入後、5.25Gy 放射線照射後 C57BL/6 マウスに移植した。移植後 30 日以内にどの群でも白血病を発症し死亡するマウスが出現することが判明した。発症の早いマウスでは移植後わずか 18 日で致死的な白血病を発症した。

以上より、Hes-1 と bcr-abl 両遺伝子を導入した造血前駆細胞の移植により、CMP や GMP といった bcr-abl 単独では白血病を起こさない分画においても、非常に早期に CML の急性転化を発症することが判明し、ヒト CML サンプルで得られた結果を動物移植モデルで実証することが出来た。

3. 考察

以上のように今回私は Hes-1 と bcr-abl 遺伝子を組み合わせることで、CML の急性転化発症マウスモデルを作成することが出来た。本研究でのノベルティとしては大きく 4 つの点を挙げる事ができる。1 つ目としては、ヒトの CML における急性転化のメカニズムとしてこれまで報告されていなかった Hes-1 の発現上昇が関与しているという可能性をヒト CML サンプルで示した。2 つ目としては、Hes-1 が造血幹細胞や造血前駆細胞の分化を強く抑制し不死化させることを示した。3 つ目としては、Hes-1 と bcr-abl 両遺伝子を組み合わせると、CMP、GMP といった自己複製能を持たない造血前駆細胞に導入した場合でも CML の急性転化を発症させ、ヒト CML 急性転化病態に極めて近いマウスモデルを作成することができるという知見が得られた。4 つ目としては、これまで bcr-abl による CML 発症マウスモデルではそのほとんどがリンパ系腫瘍細胞であるが、本研究の CML 急性転化発症マウスモデルでは腫瘍細胞は骨髄系細胞であり「Hes-1 にはリンパ系細胞への分化抑制効果がある」可能性が示された点などが挙げられる。

本研究で得られた結果は、CML の急性転化に Hes-1 上昇が関与している可能性を示唆するものとして重要な発見であると考えられる。今後、Hes-1 が CML の急性転化をはじめとした「ヒト疾患の発症や増悪」にどのような機構で関与しているかをさらに詳細に追求していくことで、新たな治療法開発に大きく寄与する可能性があるかと期待される。