

受賞者

千葉 滋

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

## 研究テーマ

分子時計による造血幹細胞制御とその破綻による白血病発症の研究

### 1. 目的

ほ乳動物には、24時間以内に変動を繰り返す短時間周期があり、これを制御する時計分子 (ultradian) システムが存在する。これは胚における体節形成 (マウスでは2時間、ヒトでは8時間周期) に必須の役割を果たす。中でもNotchシグナルエフェクターであるHes群遺伝子およびその産物の活性の周期的変動の重要性およびその機序はよく解析されている。申請者らはこれまで、機能欠損や過剰発現の系を用いて、Notch-Hesシステムが正常造血幹細胞を制御すること、およびこの破綻が白血病発症ないし進展の原因となることを見出してきた。本研究では、Notch-Hesシステムが幹細胞制御においても時計分子として機能しているか、Hes分子の振動の破綻が白血病発症に関わるか、について明らかにする。

### 2. 方法

造血幹細胞と骨髄系造血前駆細胞へのHes1強制発現とその影響の観察: Hes1の強制発現が骨髄系造血前駆細胞に与える影響を観察するため、レトロウイルスでHes1 (導入マーカー:NGFR)をC57BL/6マウス造血幹細胞および骨髄系造血前駆細胞濃縮分画(KSL、CMP、GMP)に導入し、連続的コロニー形成能やin vitro増殖能を観察した。また、Hes1導入細胞を同系マウスに移植し、生着と骨髄増殖性疾患や白血病発症の有無を観察した。さらに、これらの細胞分画に、慢性骨髄性白血病原因遺伝子であるBCR/ABL (導入マーカー:GFP)を単独で、あるいはHes1とともに導入し、同様に連続的コロニー形成能、in vitro増殖能、同系マウスに移植後の骨髄増殖性疾患や白血病発症の有無を観察した。

造血前駆細胞・幹細胞におけるHes1分子振動の観察:半減期の短いリンフェラーゼがHes1プロモーターによって発現するトランスジェニックマウスの胎児肝から、種々の造血前駆細胞および幹細胞を濃縮し、可溶性NotchリガンドDelta1-Fcとpoly-L-lysineを固着した特殊スライドガラス培養皿上に播種した。これを、微小発光を感知し画像化が可能な特殊顕微鏡装置で、12時間後まで各細胞の発光状態を連続的にモニターし記録した。

### 3. 結果 研究成果

Hes1による骨髄系造血前駆細胞の不死化:NGFR陽性細胞を分離しサイトカイン添加条件・メチルセルロース培地でコロニー形成後、コロニー形成細胞を再度メチルセルロース培地で培養する、という操作を繰り返すと、Hes1を導入した場合にはKSL、CMP、GMPのいずれでも際限なくコロニーが形成されたが、コントロールウイルス導入細胞ではKSL由来の場合のみコロニーが形成された。後者の場合コロニー形成細胞は形態的に分化しており、再播種ではコロニーが形成されなかった。コントロールウイルスを導入したCMPやGMP由来細胞からはコロニーが形成されなかった。Hes1導入によるコロニー形成細胞はinterleukin-3 (IL-3)存在下液体培養でも際限なく増殖し、不死化していた。これらの細胞はKSL、CMP、GMPいずれの細胞由来の

場合も、造血前駆細胞のマーカであるc-KitおよびCD34を発現しており、形態的にも未熟造血細胞様であった。

BCR/ABLとHes1協調による、慢性骨髄性白血病急性転化病態の再現:BCR/ABL遺伝子を単独で導入し、GFP陽性細胞を分離してコロニー形成能を観察すると、KSLだけがコロニーを形成したが、CMPとGMPはいずれもコロニーを形成しなかった。BCR/ABLによるコロニー形成細胞は形態的に分化しており、再播種ではコロニーが形成されなかった。BCR/ABLとHes1を同時に導入してNFGR+GFP+細胞をメチルセルロースに播種すると、KSL、CMP、GMPのいずれに導入した場合でもコロニー形成が繰り返された。これらのコロニー形成はIL-3非依存性であり、液体培養でもIL-3非依存性に増殖し不死化していた。Hes1単独導入細胞をIL-3添加で培養した場合と比べると、形態は類似しており細胞表面抗原発現も類似していたが、c-Kit発現レベルはHes1単独導入細胞の方が高かった。Hes1とBCR/ABLが単独あるいは同時に導入された細胞を放射線照射した同系マウスに移植した場合、以下のような結果であった。Hes1単独導入細胞の移植では骨髄増殖性疾患や白血病は発症しなかった。BCR/ABL単独導入細胞の移植では、KSL由来細胞の移植でのみ骨髄増殖性疾患様の病態を発症し、マウスは速やかに死亡したが、CMPやGMP由来細胞の移植では骨髄増殖性疾患や白血病を発症しなかった。Hes1とBCR/ABLの同時導入細胞の移植では、由来がKSL、CMP、GMPのいずれであっても急性骨髄性白血病様の病態を発症しマウスは速やかに死亡した。

造血前駆細胞におけるHes1の分子振動:観察条件と同じ条件において、造血前駆細胞は移動が最小限に抑えられ、長時間の観察でも単一細胞における発光の経過を追えることを確認した。一方ルシフェラーゼレポーターアッセイで評価しDelta1-FcによってNotchシグナルが活性化されていることを確認した。c-Kit陽性細胞を用いた発光モニターでは、Delta1-Fc固着スライドで培養した場合に、少数の細胞で明らかな発光を感知し得た。ルシフェラーゼ発現(発光)は、on/offが観察された。

#### 4. まとめ

骨髄系造血前駆細胞で生理的発現を逸脱してHes1を発現させることにより、比較的分化した前駆細胞も含め容易に不死化した。このことから、骨髄系造血前駆細胞の生理的分化には、Hes1の発現制御が重要である可能性が示唆された。さらに、BCR/ABLとの同時発現細胞の移植実験により、Hes1の非生理的発現が、慢性骨髄性白血病の急性転化にかかわる可能性も示唆された。

Hes1発現の生理的制御が、分子振動によって行われているとの仮説で実験を進めている。その一端が明らかになりつつあるが、現在、さらに詳細な実験を進行中である。なお、この実験は京都大学ウイルス研究所の影山龍一郎博士との共同研究である。

#### 5. 発表論文

Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, in press

#### 参考文献

Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa

M, Chiba S. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(22):7839- 7844, 2008.

Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Saito T, Taniuchi I, Chiba S, Sone S, Yasutomo K. Notch 2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 9(10):1140-1147, 2008.

Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamiyo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch Activation Induces the Generation of Functional NK Cells from Human Cord Blood CD34-Positive Cells Devoid of IL-15. *J Immunol* 182(10):6168-78, 2009.

図1 Hes1導入による造血前駆細胞の不死化と細胞形態

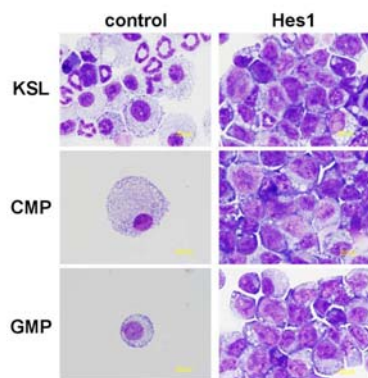
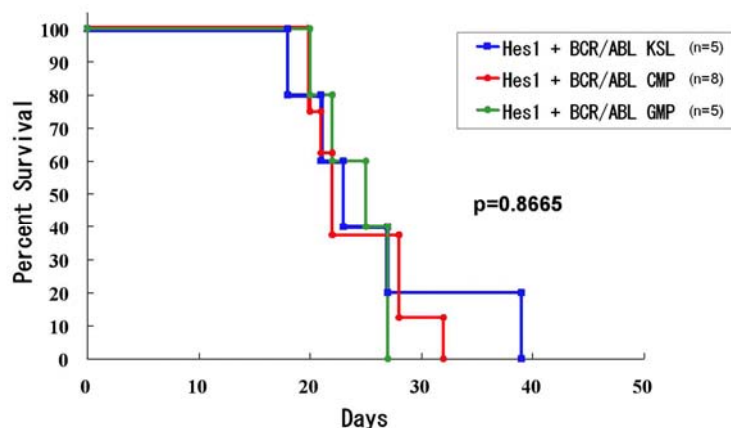


図2 BCR/ABLとHes1同時導入細胞の移植による急性骨髄性白血病様病態の発症



(図はいずれも発表論文より転載)