HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立
Author(s)	伊藤, 沙和
Description	配架番号：2195
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12091号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12091
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61558
Type	doctoral thesis
File Information	Sawa_Ito.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立

（Development of an in vitro long-term maintenance system of myeloid leukemia stem cells using human mesenchymal stromal cells）

２０１６年３月

北海道大学

伊藤　沙和

学位論文

ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立

（Development of an in vitro long-term maintenance system of myeloid leukemia stem cells using human mesenchymal stromal cells）

２０１６年３月

北海道大学

伊藤　沙和

目次

1. 発表論文および学会発表目録 1

2. 緒言 2

3. 略語表 8

4. 実験方法 9

5. 実験結果 13

6. 考察 28

7. 総括および結論 31

8. 謝辞 32

9. 引用文献 33

1. 発表論文および学会発表目録

本研究は以下の論文に掲載された。

Sawa Ito, John Barrett, Amalia Dutra, Evgenia, Pak, Samantha Miner, Keyvan Keyvanfar, Nancy Hensel, Katayoun Rezvani, Pawel Muranski, Paul Liu, J Joseph Melenhorst, Andre Larochelle

Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells.

Stem Cell Res. **14**, 95-104, (2014).

本研究の一部は以下の学会にてポスター発表された。

Sawa Ito, A. John Barrett, Andre Larochelle, Nancy F. Hensel, Keyvan Keyvanfar, and J. Joseph Melenhorst

Long Term Maintenance of Myeloid Leukemia Stem Cell-Like Populations Cultured with Mesenchymal Stromal Cells (MSC).

Abstract#3546,

American Society of Hematology Annual Meeting 2012, December 10, 2012, Atlanta

2 緒言

1．白血病幹細胞の概念

癌幹細胞は広義の悪性新生物細胞の中でも特定の細胞群を指し、特性として癌細胞クローンを永久的に創造し、癌の母細胞となる細胞と定義されている[1]。急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia;　AML) は、癌幹細胞研究の中でも最も研究が進んでいる疾患であり、癌幹細胞モデルの解明に大きく寄与してきた[2-4]。いまや、白血病幹細胞（leukemia stem cells; LSC）の概念は、白血病細胞の多様性、再発、化学療法への耐性などの現象を説明する上で必要不可欠である[2]。 さらに、白血病幹細胞に特徴的な遺伝子発現パターンは白血病患者の予後に関連し[5,6]、白血病幹細胞を標的とした治療法が急性骨髄性白血病の完治につながることが期待されている[7-9]。この領域で先駆的な研究者である Dick らは白血病幹細胞は、通常の造血幹細胞が形成する階層的な構造に属すると仮説を立て、確率論的モデルよりも階層的モデルに沿って白血病細胞が発生することを証明した[3]。 彼らの初期の論文では、マウス移植モデルにおいて、白血病幹細胞は、$CD34^+CD38^-$分画（通常の造血細胞において分裂頻度の少ない、より幹細胞に近い分画）により多くの頻度で存在し、$CD34^+CD38^+$分画（通常の造血細胞においてより分裂頻度の高く、細胞分化した分画）にはより少ない頻度の白血病幹細胞が含まれていると考察した[3]。しかし、さらなる研究の成果により、白血病幹細胞は $CD34^+CD38^-$、$CD34^+CD38^+$分画どちらにもあらゆる頻度で存在していることがわかっている[10]。さらに、近年の白血病における全ゲノム解析により *DNMT3A* や *TET2*[11,12] といった遺伝子の変異が急性白血病に頻繁に見られることが発見され、白血病発生におけるエピジェネティック Epigenetics の重要性が唱えられるようになった。最新の知見では、白血病前駆幹細胞（“pre-leukemic” stem cells）と呼称される *DNMT3A* や *TET2* といった始祖的な遺伝子異常を内在する細胞群が存在し、それらの細胞は T 細胞といった免疫細胞も含めたあらゆる細胞に分化する能力と、化学療法への耐性をあわせ持っていることが報告されている[13,14]。 癌幹細胞のモデルはそれ自体が絶えず進化を続けている概念であり、正常幹細胞、悪性新生物幹細胞のどちらもを対象とした最新の研究と治療法の解明が今後も重要である(Figure 1)[1]。

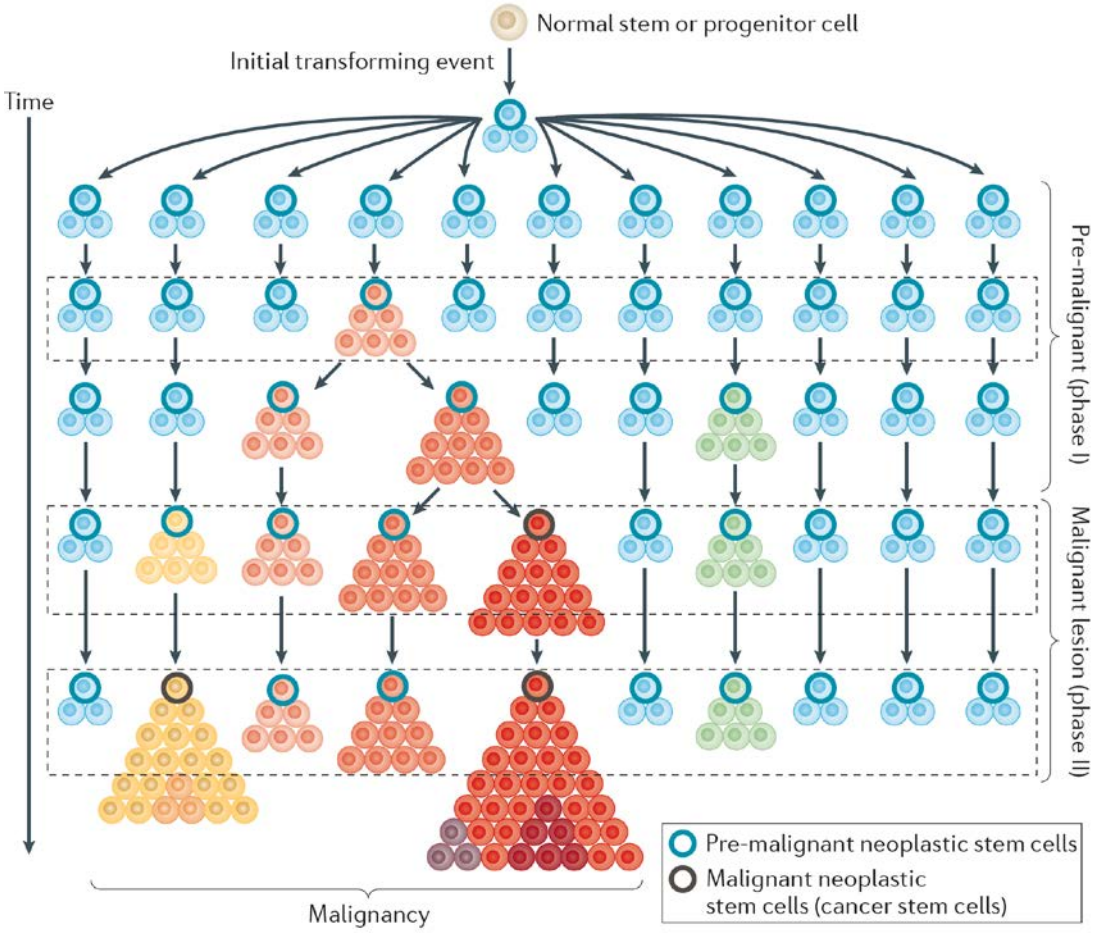


Figure 1 癌幹細胞の階層モデル（Valent P et al. Nat Rev Cancer 2012; 12: 767[1] より引用した）。癌幹細胞の概念を図表化した例である。癌前駆幹細胞は始祖的な変異を有し、同じ変異を有したサブクローンを創造し増殖させていく。おそらく第二の変異がサブクローンの一部に起こり、そのサブクローンが優勢となり癌病変を作り出すと考えられている。

今日の白血病幹細胞の研究では、severe combined immunodeficient (SCID)マウスを使った移植モデル（Xenotransplantation）がもっとも標準的な実験方法とされてお[15]、 SCID leukemia-initiating cells (SL-ICs) が白血病幹細胞の特徴と機能を合わせもっていると考えられてきた[3,4]。 しかし、ヒトの白血病細胞において SL-ICs は頻度が稀少で非常に多様であり[5,6,10]、急性骨髄性白血病患者から直接採取した白血病細胞がマウス移植モデルにおいて必ずしも生着するとは限らない。また、ヒトの癌幹細胞を対象としたマウスを用いた移植モデルにおいてはいくつかの限界が指摘されている。１）マウスの短い寿命、２）マウスの体内におけるヒト癌幹細胞の生着部位の違い、３）ヒトとマウスのサイ

トカインの違いによる癌幹細胞の増殖の違い、４）癌周辺環境の違い、５）通常の免疫反応の欠如、６）免疫学的監視の欠如。マウス移植モデルに比較して、生体外での癌幹細胞の実験は安価で迅速かもしれないが、試験管内で癌幹細胞を長期培養継続するのは難しく、多くの場合、生理学的な濃度を超えた量の増殖因子やサイトカインを添加する必要があり、本来の癌幹細胞の特性を失わせてしまう可能性がある。癌幹細胞研究のさらなる発展のためにも、簡単で、実行可能な、信頼のおける、生体外での癌幹細胞の培養法が必要である[16]。

２．白血病幹細胞における骨髄間質細胞の役割

正常造血幹細胞と白血病幹細胞は骨髄内にて共存しており、骨髄間質細胞により構成された微小環境により保護され､幹細胞の増殖と維持が保たれている[17,18]。骨髄は細胞性、非細胞性の複雑な要素から成り立っている。間葉細胞は骨髄において、血管内皮細胞や巨核芽球とともに細胞成分を構成するもっとも重要な細胞である[19]。 ほかの副細胞と称される細胞、たとえば骨芽細胞、マクロファージ、神経細胞、免疫細胞も骨髄内微小環境の恒常性を維持するために、それぞれに役割を果たしている。最近の知見によると、骨髄間質細胞間質細胞の異変が、白血病幹細胞の自己増殖や維持、さらには骨髄への生着を促し、骨髄内での白血病幹細胞の優位性を支持することで、正常の造血幹細胞を抑制する働きがあることがわかっている[17,20]。 たとえば、白血病細胞は血管内皮細胞に存在する、SDF-1 および E-selectin を発現する特別な部位を入り口として、骨髄内に浸潤する過程が報告されている[21]。 また、骨髄間質細胞が分泌する TGF-beta が白血病細胞内の癌遺伝子 Oncogene を活性化させる働きがあることがマウス白血病モデルで証明されている[22]。 さらには、骨髄間質細胞の内在的な異変そのものが白血病幹細胞を創造する現象がマウスモデルで報告されている。Walkley たちの先駆的な研究によると、間葉細胞の retinoic acid receptor の欠如あるいは *Rb* 遺伝子の変異が骨髄増殖性疾患を生み出すことが証明された[23,24]。また、骨髄芽細胞内で β-catenin を過剰発現させることで骨髄増殖性疾患や急性骨髄性白血病が発症することがマウスで確認されている[25]。さらには、急性骨髄性白血病により交感神経の障害が誘発され、白血病細胞にとって優位な骨髄微小環境が形成されることが最近報告されている[26] (Figure 2[17])。

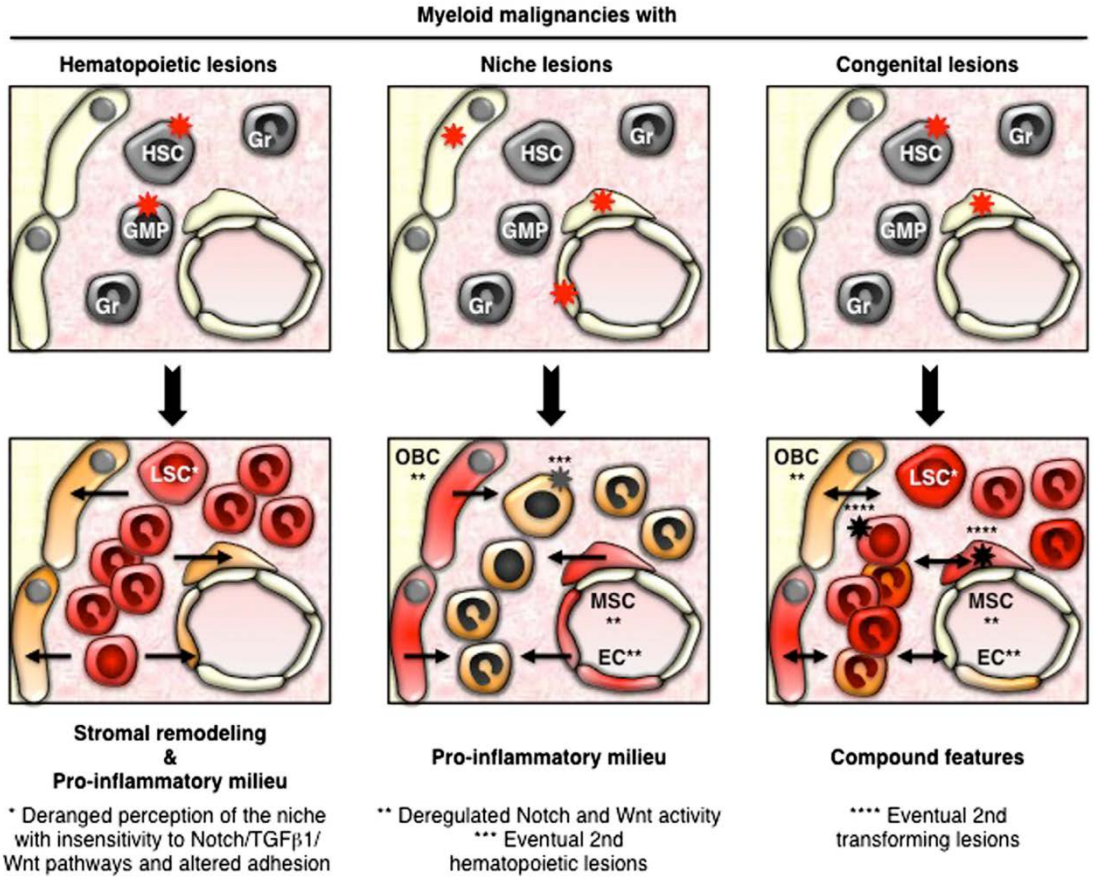


Figure 2 骨髄間質細胞に関連した白血病細胞発生モデル （Schepers K et al. Cell Stem Cells 2015; 16: 254[17] より引用した）。左図、造血幹細胞内の遺伝子変異が、骨髄内における炎症性環境を生み出し、骨髄間質細胞の異常な再生と変異をもたらした結果、白血病細胞にとって優位な骨髄微小環境を形成するモデル。中央図、骨髄間質細胞内の遺伝子変異が、二次的に造血幹細胞の変異を誘発し、白血病幹細胞が発生するモデル。右図、造血幹細胞、骨髄間質細胞のどちらにも変異が生じて相乗的に白血病幹細胞の増殖を促す環境を作り出すモデル。

骨髄微小環境における、白血病幹細胞と骨髄間質細胞との間の相互コミュニケーションは、白血病幹細胞の増殖にとってとても重要であることが解明されるにつれ、白血病治療の標的として非常に有望な研究対象であることは明らかである。しかし、マウスの骨髄間質細胞が必ずしもヒトの骨髄間質細胞と、同様な分子細胞的な機能を共有しているとは限らないため、マウス移植モデルがヒト白血病幹細胞とヒト骨髄間質細胞との相互コミュニケーションを研究するモデルとして十分でない可能性が指摘されている(Figure 3[15])。 特に、ヒト白血病

幹細胞とヒト免疫細胞との相互作用を研究することは非常に難しいと言わざるを得ない。なぜなら、SCID マウスは完全にヒト免疫細胞を欠如しているからである。以上の点からもヒト白血病幹細胞とヒト骨髄間質細胞の培養モデルの構築は非常に重要である。

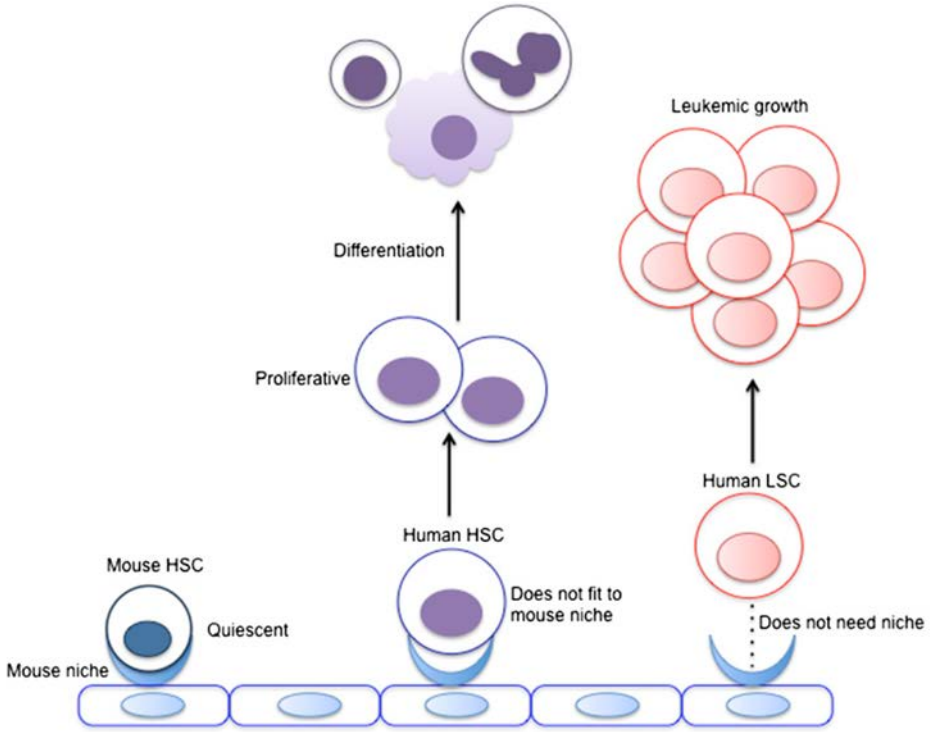


Figure 3 マウス移植モデルにおけるマウス骨髄間質細胞とヒト造血幹細胞およびヒト白血病幹細胞の関係（Goyama S et al. Blood 2015; 125: 2630[15] より引用した)。マウス骨髄間質細胞はマウスの造血幹細胞を支持するが、必ずしもヒト造血幹細胞を支持するとは限らない。またヒト白血病幹細胞がマウスの骨髄間質細胞と同様に、ヒト骨髄間質細胞と相互作用を持つかはわからない。

ヒト骨髄間葉細胞（BM-MSCs）は様々な生理学的機能を持っている。 1）幹細胞として骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞に分化する能力。2） 免疫細胞を抑制する働き。3）組織を再生する能力。骨髄間葉細胞は、CXCL12- CXCR4 や Wnt-β-catenin シグナル系など様々な分子的機構を通じて、正常な造血幹細胞の増殖と分化を支持している[19,27,28]。 生体外にて、マウスの骨髄間葉細胞と増殖因子を用いてヒトの白血病細胞を増殖させる方法が報告されているが、白血病細胞の多くは元来の表現型である $CD34^{+}CD38^{-}$ は長期培養中に失われている[29,30]。ヒト骨髄間葉細胞は白血病幹細胞にとって理想的な微小環境を提供する可能性

がある。それは細胞間の接着因子によるものかもしれないし、エクソソームによる細胞増殖シグナルやマイクロ RNA の供給、あるいは増殖因子やサイトカインのパラクリン様の作用によるものかもしれない。本研究はヒト骨髄間葉細胞と白血病幹細胞の共培養により、白血病幹細胞の生体外培養モデルを確立しようと試みた。

論文目的

ヒト骨髄間葉細胞を用いたヒト白血病幹細胞の体外培養システムを構築すること。

仮説

ヒト骨髄間葉細胞は、ヒト正常造血幹細胞と同様な分子的な特徴を有するヒト白血病幹細胞の生存に有利な環境条件をもたらすと仮説を立て、ヒト骨髄間葉細胞を用いた培養法が、たとえ増殖因子を添加しなくても、ヒト白血病幹細胞の長期培養を可能にすることを検証した。

3 略語表

AML	Acute myeloid leukemia
ANOVA	Analysis of variance
BM	Bone marrow
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMP	Common myeloid progenitor
Cyto	Cytokine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FLT-ITD	Internal tandem duplications of Fms-like tyrosine kinase 3
GMP	granulocyte monocyte progenitor
GVL	Graft versus leukemia
HSCs	Hematopoietic stem cells
LIC	Leukemia initiating cells
Lin-	Lineage negative
LSCs	Leukemia stem cells
M5	Acute monoblastic and monocytic leukemia based on World Health Organization (WHO) and French-American-British (FAB) classification.
MDS	Myelodysplastic syndrome
MPD	Myeloproliferative disease
μM	Micro molar
MSCs	Mesenchymal stromal cells
NSG	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency IL-2Rγnull
PI	Propidium iodide
PV	Polycythemia vera
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe combined immunodeficient
SL-ICS	SCID leukemia-initiating cells
UPN	Un-personalized patient number

4 実験方法

検体

８人の急性骨髄性白血病（平均年齢５３歳、２３～７４歳、Table1）の患者より末梢血検体を採取した。検体の採取に際しては、患者および健常者よりヘルシンキ宣言に遵守した米国国立衛生研究所、血液内科部門および MD Anderson Cancer Center の倫理委員会の承認を受けたインフォームドコンセントを得ている。末梢血細胞は Ficoll 遠心分離により単核球を分離し、Dimethyl sulfoxide（DMSO）を添加し、実験開始まで液体窒素内にて凍結保存した。実験時には、凍結保存された検体を、１０％のヒトアルブミン製剤(Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA)と２ｍM の L-グルタミン、１００U/ml のペニシリン、１００μg/ml のストレプトマイシン(Life Technologies, Carlsbad, CA)を添加した RPMI１６４０培養液(Life Technologies, Carlsbad, CA)に溶解して使用した。

Table1. 急性骨髄性白血病検体を提供した患者の特徴

UPN	Age	Sex	AML Subtype	Karyotype	Status	Leukemia Phenotype
UPN1	71	F	AML/MDS	5q-, 7q-, 8+	Relapse	$CD34^{+}CD38^{-}$ predominant
UPN2	74	M	AML/MDS	Normal	Refractory to chemotherapy	$CD34^{+}CD38^{-}$ predominant
UPN3	43	F	AML/MDS	7q-	Evolved from MDS	$CD34^{+}CD38^{-}$ predominant
UPN4	77	F	AML/MPD-PV	t(2;6),del(3), -4	De novo	$CD34^{+}CD38^{-}$ predominant
UPN5	42	M	AML-FLT3ITD	Normal	Relapse	$CD34^{+}CD38^{+}$ predominant
UPN6	23	M	AML/MDS	Complex	Relapse	$CD34^{+}CD38^{+}$ predominant
UPN7	39	M	M5	7q-	Refractory to chemotherapy	$CD34^{+}CD38^{+}$ predominant
UPN8	57	M	AML/MDS	7q-	De novo	$CD34^{+}CD38^{+}$ predominant

骨髄間葉細胞の作製と培養

米国国立衛生研究所、輸血部および血液内科部門にて承認されたプロトコール(プロトコール番号 10-CC-0053 および 07-H-0113）に基づいたインフォームドコンセントを取得した後、健常者ボランティアより骨髄液を採取した。75cm^2の培養容器と、２０％のウシ胎仔血清（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1% L-グルタミン（Life Technologies, Carlsbad, CA）を添加した MEMα (Life Technologies, Carlsbad, CA）の骨髄間葉細胞培養液を用いて骨髄液の培養を開始した。２４時間後に非接着細胞を除去し、週２回培養液を交換して、接着細胞の培養を約２週間継続した。

骨髄間葉細胞が７０％Confluence の状態になった際に、０．０５％のトリプシン－EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA）を用いて細胞を分離し、骨髄間葉細胞培養液中に 4 x 10^3/cm^2の濃度に調節して、４層からなるファクトリー培養容器（Thermo Scientific Nunc™ Cell Factory™ Systems, Waltham, MA）に移し、培養を継続した。７０％Confluence の状態を確認後、さらなる継代を続け、そのたびに一部を分離し、凍結保存した。実験の際には、白血病細胞との共培養を開始する前夜に、第 4 継代の骨髄間葉細胞を冷凍状態から解凍し、５０Gy の放射線を照射（培養中のさらなる分裂を予防するため）後、平坦な底のプレートに一定の濃度で播種し、網目状構造を構成するように準備した。

白血病細胞と骨髄間葉細胞の共培養

造血細胞分化マーカー（Lineage）陰性かつ CD34 陽性細胞（Lin^-CD34^+ cells）は FACSAria II 細胞分離機（BD, Franklin Lakes, NJ）によって分離し、2.5 x 10^5の白血病細胞を、同数の放射線照射した骨髄間葉細胞とともに平坦な底の２４ウェルプレートに共培養した。サイトカインを使用した条件では、150 ng/ml FLT3-ligand, 150 ng/ml Stem cell factor (SCF), 50 ng/ml Interleukin-3 (IL-3）を混合した培養液を用いた。コントロールの条件では、Lin^-CD34^+ cells は骨髄間葉細胞を用いずに、サイトカインの存在下、あるいは非存在下にて培養した。すべての条件において、培養液は週に２度交換した。トランスウェルによる実験では、Lin^-CD34^+cells はトランスウェルシステムの（Costar Transwell Permeable Supports: 0.4 μm pore size）の上部ウェルに、骨髄間葉細胞は下部ウェルに分離して培養した。

白血病細胞表現型のフローサイトメトリーによる評価

培養した細胞の表現型は、週一度、CD38, CD34, CD11b, CD123,CD45 抗体にて染色し、さらに Annexin V-APC (BD Biosciences, San Jose, CA) と Propidium iodide （PI）にて染色して、アポトーシスを引き起こしてない、生存する細胞の割合を一緒に評価した。

細胞周期の評価

細胞周期の評価は少なくとも $1x10^6$ の生存細胞を用い、はじめに CD34, CD45 にて染色し、さらに Hoechst 33342 と Pyronin Y をプロトコール[31]に沿って染色した。細胞内の DNA と RNA 量に応じて、細胞周期における G0, G1, S-G2-M 相を判別した。

白血病細胞の異種移植モデル

Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency IL-2Rγnull (NSG) マウスは Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) より購入し、滅菌された環境で成育させた。６～８週齢のマウス（グループあたり２～５マウス）は非致死線量（300 cGy）を照射後、１８～２４時間後に白血病細胞の移植が行われた。限界希釈実験では、$5 x 10^3$ から $5 x 10^5$ 細胞数の患者由来の CD34 陽性白血病細胞を、少なくとも５匹のマウスに尾静脈注射した。骨髄間葉細胞との共培養後の細胞の生着を評価する実験では、CD45 陽性細胞をフローサイトメトリーにより分離し、放射線照射後のマウスの尾静脈に投与した。また同時に、同じ患者検体から新たに分離された同数の CD34 陽性白血病細胞を投与しコントロール群とした。移植から８週後、マウスを安楽死させ、大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取した。ヒト白血病細胞の生着は、総骨髄細胞中のヒト CD45 および CD34 陽性細胞が０．１％確認されることを基準とした。

化学療法感受性試験

Lin^-CD34^+白血病細胞をまず CFSE (Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit, Life Technologies, NY) によりプロトコールに沿って標識した。CFSE により標識された CD34 陽性白血病細胞（$2 x 10^4$ cells）を同数の放射線照射後の骨髄間葉細胞（$2 x 10^4$ cells）とともに９６ウェルの平坦な底のプレートにて培養した。

Cytarabine (Bedford Laboratories, OH) を 10 μM から 0.5 μM までの様々な濃度でウェルに添加し、細胞は 37°C, 5% CO_2 の条件で４８時間培養された。４８時間後、白血病細胞を各ウェルから採取し、Annexin V と PI にて染色後、FACS Fortessa を使用して解析した。Annexin V、PI 両陰性の細胞を CFSE 陽性細胞の中から生存白血病細胞と定義し、相対的生存率を次の定式で計算した。% 相対的生存率（% relative viability）$= a/b\ x100$、a は cytarabine を添加した条件の生存白血病細胞の率、b は cytarabine を添加しない条件の生存白血病細胞の率。

統計学的分析

すべてのデータは Prism Version 5.04 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) を用いて解析した。結果は one-way ANOVA analysis あるいは paired t-test を使用して p value が０．０５以下の場合に有意であると定義した。LSCs 頻度の計算には L-Calc software (StemSoft Software Inc., Vancouver, CA) を用いた。

5 実験結果

白血病細胞の表現型は多様である

まずはじめに、白血病細胞の細胞表面マーカーを、細胞分化マーカー (CD2/CD3/CD14/CD19) 陰性の分画で CD34 と CD38 マーカーの表現型により評価したところ、以前に報告されたように多様であった。[5,10] CD34 と CD38 の表現型をもとに、白血病検体を二つのグループ、$CD34^{+}CD38^{-}$ 優位白血病 (n = 4)、$CD34^{+}CD38^{+}$ 優位白血病 (n = 4) に分類した **(Figure 1)**。 後者のグループはより分化したマーカーである CD123 を有する common myeloid progenitor (CMP)-like cells、CD123 と CD45RA を有する granulocyte monocyte progenitor (GMP)-like cells を含んでいた **(Figure 2)**。

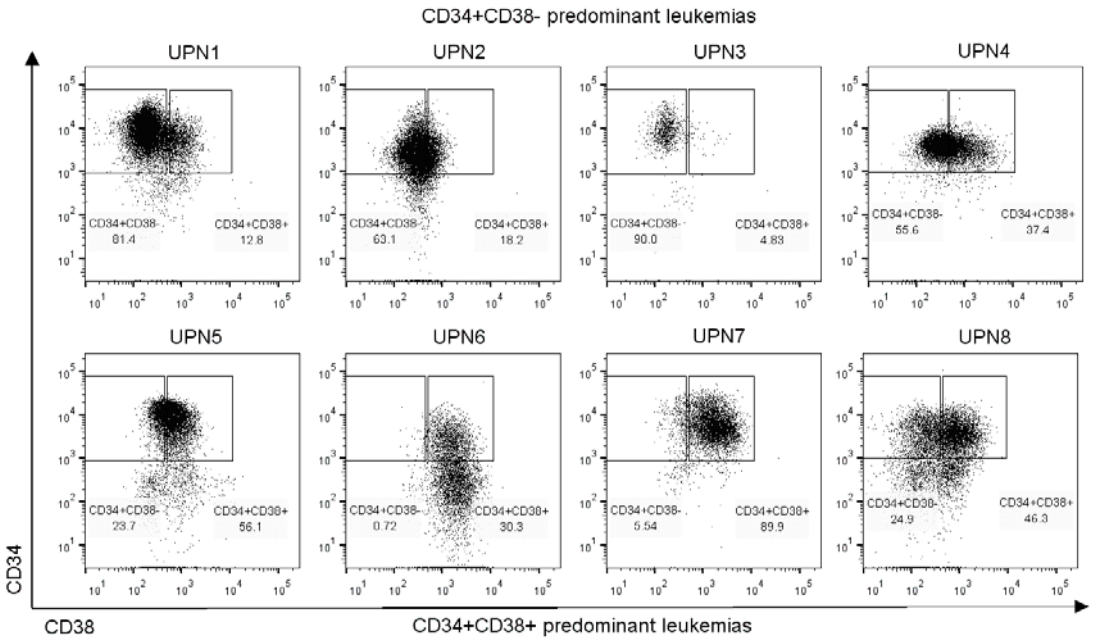


Figure 1 白血病細胞の細胞表面マーカー。フローサイトメトリーより CD34 と CD38 の表現型を８つの白血病検体で評価した。$CD34^{+}CD38^{-}$優位の白血病細胞 (UPN1～UPN4) と $CD34^{+}CD38^{+}$優位の白血病細胞 (UPN5～UPN8) のグループに分類した。

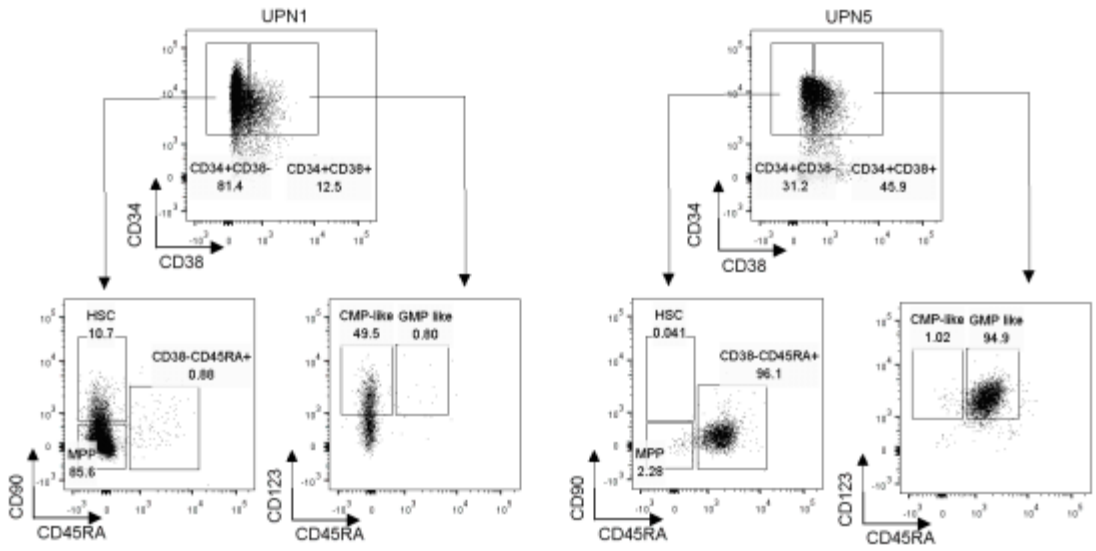


Figure 2　白血病細胞の詳しい表現型の解析。$CD34^+CD38^+$ 優位の白血病細胞は、さらに CMP-like (CD123+) と GMP-like 白血病細胞（CD45RA+, CD123+）のどちらかを含んでいる。

骨髄間葉細胞と白血病細胞の共培養

フローサイトメトリーにて分離した CD34 陽性細胞を以下の条件で培養した。１）骨髄間葉細胞との共培養、２）Flt3L, SCF, IL-3 を含んだサイトカインを添加した上での骨髄間葉細胞との共培養、３）サイトカイン添加のみでの培養、４）培養液のみでの培養。準備実験の段階で、異なるドナー由来の骨髄間葉細胞は同様に白血病細胞を維持することがわかった。また、白血病細胞と共培養した骨髄間葉細胞自体は１４日程度しか維持できないことがわかったため、骨髄間葉細胞は１４日ごとに新しい細胞に入れ替えた。

培養液のみの培養条件（$5 \pm 3 \times 10^3$ cells）に比較して、骨髄間葉細胞のみ培養条件(MSC only、 $38 \pm 17 \times 10^3$ cells: $p = 0.01$)、サイトカインと骨髄間葉細胞培養条件（MSCs + cytokines、$193 \pm 108 \times 10^3$ cells: $p = 0.04$)、サイトカインのみの培養条件（cytokines、$163 \pm 83 \times 10^3$ cells: $p = 0.01$）が優位に生存細胞の絶対数を維持することに成功した。この現象はただひとつの例外（UPN1）を除いてすべての白血病細胞において確認された（**Figure 3**)。　骨髄間葉細胞はすべての $CD34^+CD38^-$優位の白血病細胞を 6 週間維持した（**Figure 4A and Figure 4C**)。それに比較して、$CD34^+$ $CD38^+$ 優位の白血病細胞の維持は 4 週間が最長だった（**Figure 4B**)。

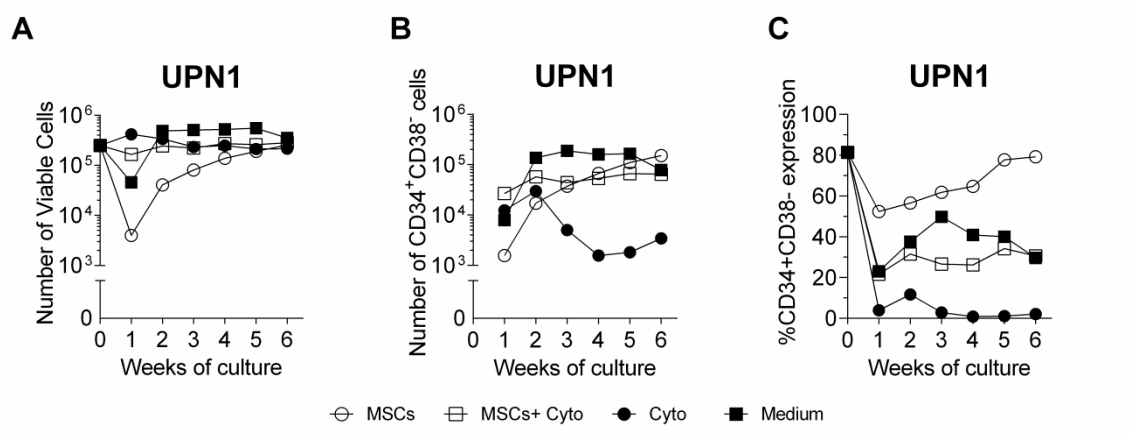


Figure 3　UPN1 白血病細胞のみ、培養条件にかかわらず維持された。(A)　生存白血病細胞絶対細胞数。(B) $CD34^{+}CD38^{-}$ の生存白血病絶対細胞数。(C) $CD34^{+}CD38^{-}$ 細胞の割合は、骨髄間葉細胞培養条件で最も高い割合で維持された。

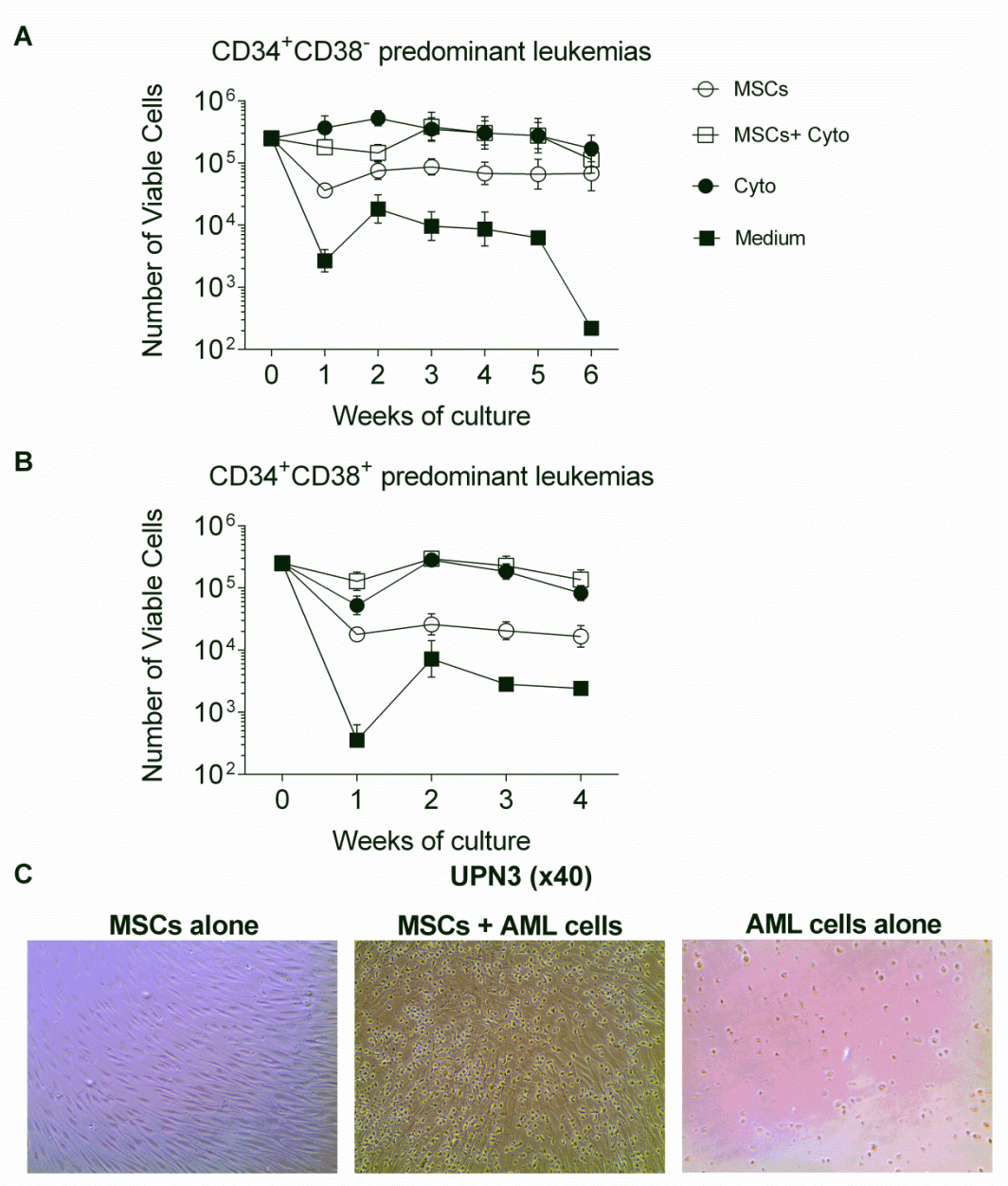
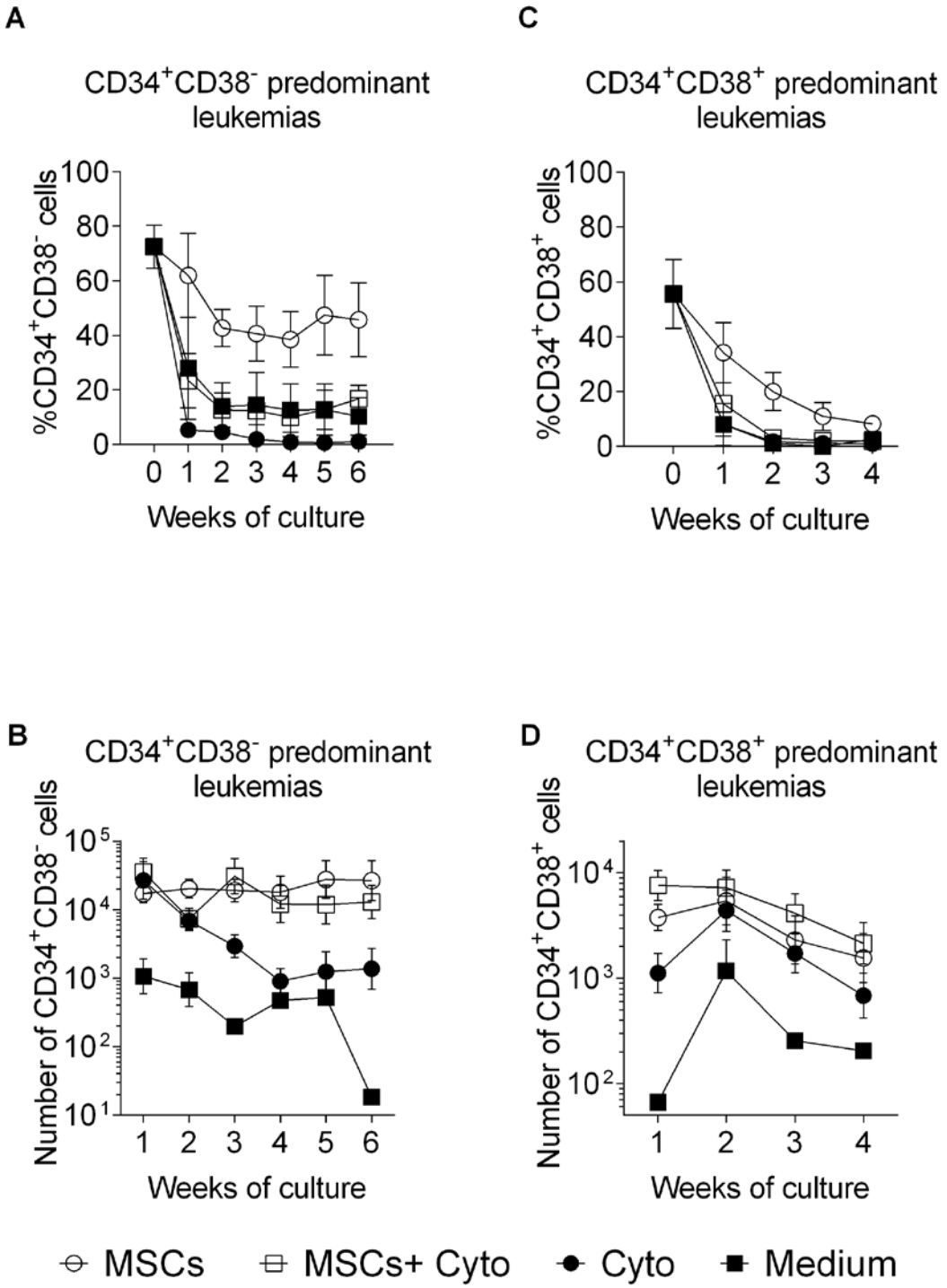


Figure 4 培養中の白血病細胞絶対数。(A) $CD34^+CD38^-$ 優位白血病細胞の絶対生存細胞数の推移。培養液のみの条件に比較して、骨髄間葉細胞培養条件（MSCs）、骨髄間葉細胞とサイトカイン（IL-3、Flt3-ligand、SCF）培養条件（MSCs + Cyto)、サイトカインのみの条件（Cyto）で統計学的有意に生存白血病細胞の絶対数が維持された。(B) $CD34^+CD38^-$ 優位白血病細胞の白血病細胞の推移。（C）骨髄間葉細胞との共培養条件での顕微鏡下での形態。培養開始２週間後の白血病細胞の形態を UPN3 ($CD34^+CD38^-$ 優位白血病） を一例に提示する。左図、骨髄間葉細胞のみ。中央図、骨髄間葉細胞と白血病細胞の共培養、右図、白血病細胞のみ。

骨髄間葉細胞との共培養により白血病細胞の表面マーカーの表現型が維持される

次に、それぞれの培養条件における白血病細胞の表面マーカーを週一度の頻度で評価した。$CD34^+$ $CD38^-$優位の白血病細胞群(n = 4)は、培養開始 6 週後において骨髄間葉細胞のみの培養条件が他の条件に比べて統計学的有意に MSCs + cytokines ($p = 0.03$), cytokines ($p = 0.03$), または medium alone ($p = 0.03$) 元来の $CD34^+CD38^-$の表現型を維持していた。他の条件では 2 週間以内に迅速に $CD34^+CD38^-$の表現型を失い、$CD34^+CD38^+$あるいは CD34 陰性の表現型に移行していた (**Figure 5A**)。$CD34^+CD38^+$優位の白血病細胞においても同様に、骨髄間葉細胞のみの培養条件が培養開始 2 週後において、他の条件に比較して統計学的有意に MSCs + cytokines ($p = 0.05$)、 cytokines ($p = 0.03$)、medium alone ($p = 0.03$) $CD34^+CD38^+$ 表現型を維持していた (**Figure 5B**)。$CD34^+CD38^-$優位の白血病において、$CD34^+CD38^-$絶対細胞数は骨髄間葉細胞共培養条件あるいは骨髄間葉細胞およびサイトカイン添加条件において最も多く維持されることが観察された (**Figure 5C**)。同様に、$CD34^+CD38^+$優位の白血病細胞において、$CD34^+CD38^+$絶対細胞数は骨髄間葉細胞共培養条件あるいは骨髄間葉細胞およびサイトカイン添加条件において最も多く維持されることが観察された (**Figure 5D**)。サイトカインを添加した条件では細胞は CD34 発現を急速に失うことを確認し、この現象は白血病細胞の分化を意味するのではないかと考えられる。それに比較して、骨髄間葉細胞との共培養条件では白血病細胞は未分化のまま維持されている状態を示唆している（**Figure 5E**）。トランスウェルを使用した実験では、骨髄間葉細胞の共培養条件であっても、トランスウェルにて分離した状態での培養条件では、細胞間接着を維持した通常の共培養条件に比較して、白血病細胞の生存絶対数および元来の表現型の維持は統計学的有意に減少することが確認された。この現象は共培養にとって白血病細胞と骨髄間葉細胞の直接的接着が重要であることを示唆している (**Figure 6**)。


A
CD34+CD38- predominant leukemias
%CD34+CD38- cells
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6
Weeks of culture
C
CD34+CD38+ predominant leukemias
%CD34+CD38+ cells
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4
Weeks of culture
B
CD34+CD38- predominant leukemias
Number of CD34+CD38- cells
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1 2 3 4 5 6
Weeks of culture
D
CD34+CD38+ predominant leukemias
Number of CD34+CD38+ cells
10^4
10^3
10^2
1 2 3 4
Weeks of culture
MSCs
MSCs+ Cyto
Cyto
Medium

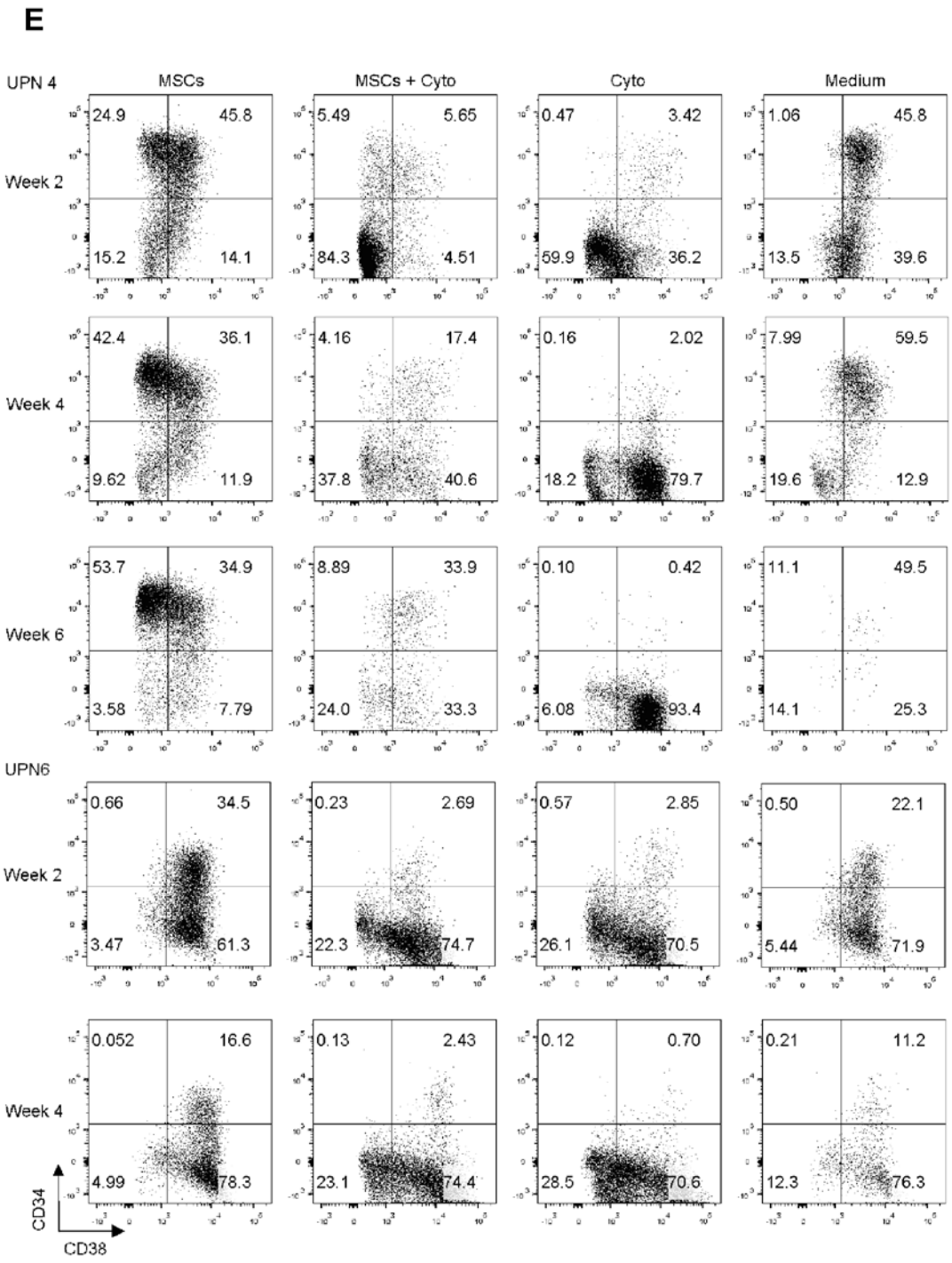


Figure 5 培養中の白血病細胞の表現型の推移。 (A) $CD34^+$ $CD38^-$優位の白血病細胞において $CD34^+CD38^-$細胞の割合のそれぞれの培養条件 MSCs, MSCs with cytokines (MSCs + Cyto), cytokines alone (Cyto), or medium alone (Medium) の推移。$CD34^+CD38^-$ 優位白血病細胞（平均%$CD34^+CD38^-$ 72.5%；

range 55.6-90.0% at day 0）はその元来の $CD34^+CD38^-$表現型の細胞を、骨髄間葉細胞条件にて最も高い割合で維持した。 (B) $CD34^+CD38^+$優位白血病細胞（平均 $\%CD34^+CD38^+$ 55.6%; range 30.3- 89.9% at day 0）はその元来の $CD34^+CD38^+$表現型の細胞を、骨髄間葉細胞条件にて最も高い割合で維持した。(C) $CD34^+CD38^-$優位白血病細胞において生存 $CD34^+CD38^-$ 絶対細胞数の推移。(D) $CD34^+CD38^+$優位白血病細胞において生存 $CD34^+CD38^+$絶対細胞数の推移。(E) UPN4 ($CD34^+CD38^-$ 優位白血病）と UPN6 ($CD34^+CD38^+$ 優位白血病）を例に、具体的な表現型の推移の様子を異なる培養条件と比較して示した。

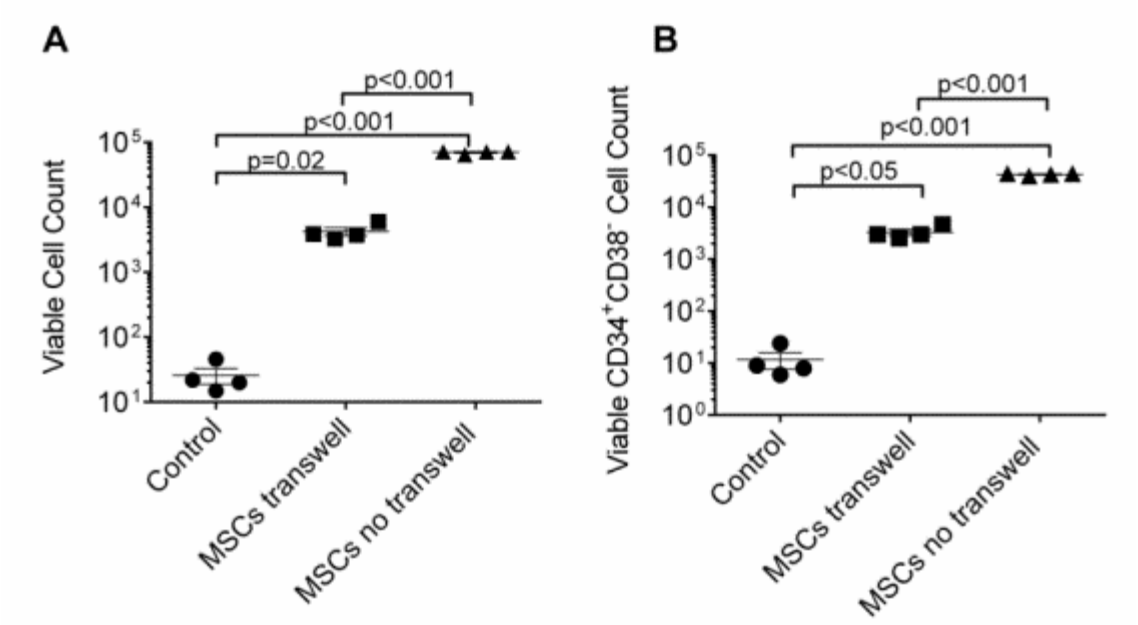


Figure 6 トランスウェルによる白血病細胞（UPN3） の骨髄間葉細胞との共培養実験。（A）生存絶対細胞数（AnnexinV、PI 両陰性分画） の培養２週後の比較。トランスウェルを用いない条件の骨髄間葉細胞との共培養が、トランスウェルを用いた条件（細胞間接着を阻害した状態）よりも、統計学的に有意な差で、生存白血病絶対細胞数が維持されていた（$p < 0.001$）。トランスウェルおよび非トランスウェルのどちらの条件でも、培養液のみのコントロール条件よりも生存白血病絶対細胞数が維持されていた（$p < 0.001$、$p = 0.02$）。（B）培養２週間後の $CD34^+CD38^-$絶対細胞数の比較。トランスウェルを用いない条件の骨髄間葉細胞との共培養が、トランスウェルを用いた条件（細胞間接着を阻害した状態）よりも、統計学的に有意な差で、元来の表現型である $CD34^+CD38^-$の絶対細胞数を維持していた（$p < 0.0002$）。トランスウェルおよび非トランスウェルのどちらの条件でも、培養液のみのコントロール条件よりも $CD34^+CD38^-$の絶対細胞数が維持されていた（$p < 0.05$, $p < 0.001$）。

骨髄間葉細胞との共培養により白血病細胞の細胞周期は静止期に維持される

細胞周期分析は体外培養開始後、１および２週間後に行われた。骨髄間葉細胞との共培養の条件下では他の培養条件に比べて、より多くの割合の $CD45^{+}CD34^{+}$白血病細胞が、G0 期に維持されていた（MSCs；平均 51.1 ± 5.1%、MSCs + cytokines； 平均 34.8 ± 5.1%; $p = 0.01$、cytokines；34.2 ± 4.3%；$p = 0.05$, **Figures 7A and 7B**）。G0/G1 比についても、骨髄間葉細胞との共培養条件下にてより高い比率を維持していた（MSCs；2.0 ± 0.36 、MSCs + cytokines；0.99 ± 0.25; $p = 0.01$、cytokines； 0.99 ± 0.28; $p = 0.05$)。G0 期にある絶対細胞数については骨髄間葉細胞条件にかかわらず有意差は認められなかった（**Figure 7C and 7D**)。これらの現象は、骨髄間葉細胞が他の培養条件に比較して、白血病細胞にとって細胞周期をより静止期に維持させる環境を提供していると考えられる。

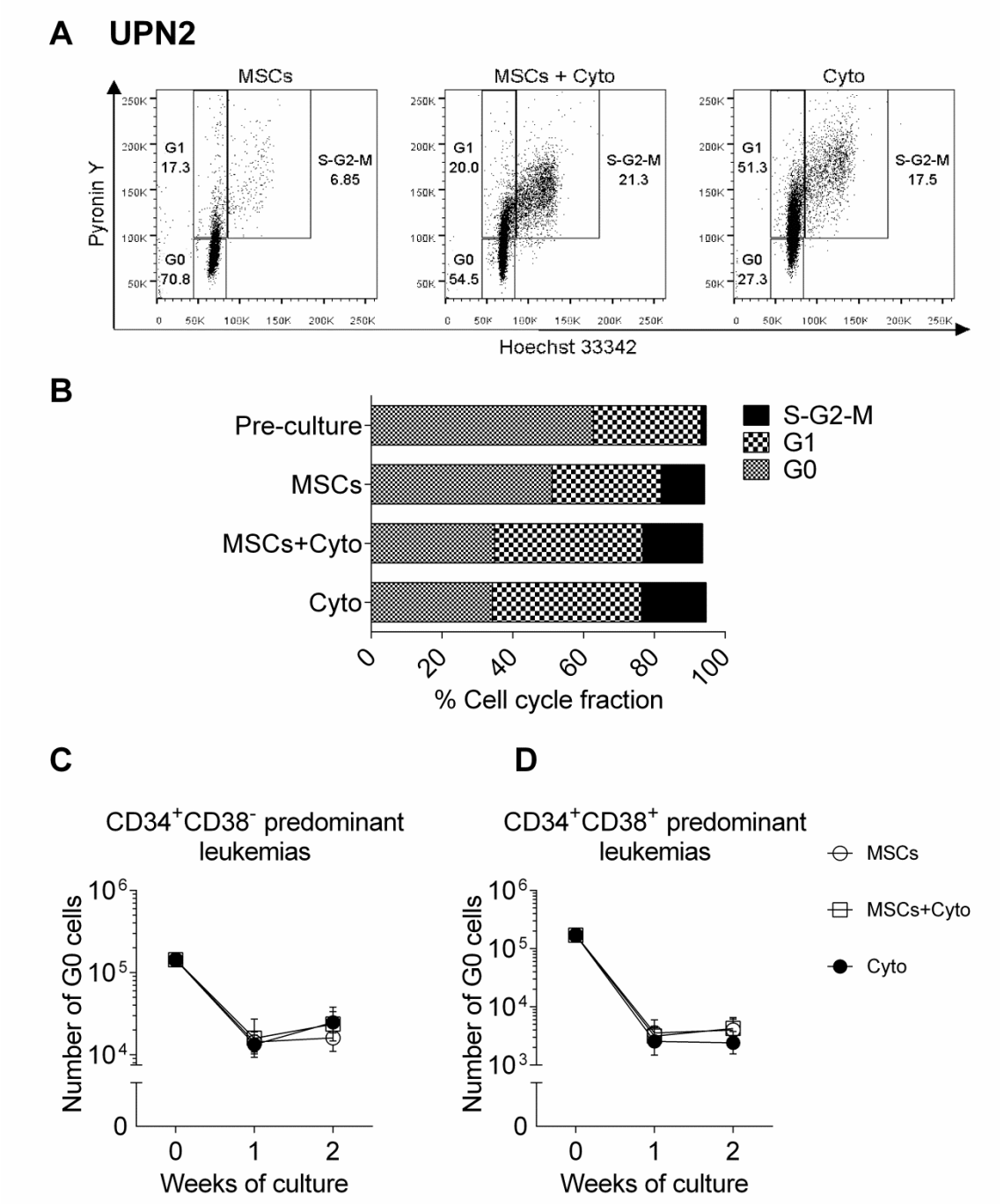


Figure 7　培養中の白血病細胞の細胞周期分析。(A) UPN2 ($CD34^+CD38^-$ 優位白血病) を例とした培養 1 週間後の細胞周期のフローサイトメトリーデータ。左 MSCs、中央 MSCs with cytokines (MSCs + Cyto)、右 cytokines alone (Cyto) 。(B) 培養 1 週間後の細胞周期のデータ (n = 8) 。骨髄間葉細胞と共細胞した条件では、他のサイトカインを用いた条件より多くの割合の細胞が G0 に

維持されていた。 (C) $CD34^+CD38^-$ 優位白血病細胞の G0 に属する絶対細胞数の推移。(D) $D34^+CD38^+$ 優位白血病細胞の G0 に属する絶対細胞数の推移。

NSG マウスモデルにおける白血病幹細胞の頻度は、$CD34^+$ $CD38^-$ 優位細胞により高い頻度でみとめられる

白血病幹細胞の頻度を、代表する二つの患者由来の白血病細胞（UPN1 ; $CD34^+$ $CD38^-$優位白血病、UPN6 ; $CD34^+CD38^+$優位白血病）を用いて、限界希釈実験により測定した。5×10^3 から 5×10^5 の白血病細胞数をマウスに投与した８週間後には、どちらの白血病細胞もヒト $CD45^+CD34^+$細胞が０．１％以上認められる基準を満たしたマウスへの生着を認めた。限界希釈実験に基づいて、白血病幹細胞の頻度を計算したところ、UPN6（$CD34^+CD38^+$優位白血病）の白血病幹細胞の頻度（1 LIC per 3.8×10^5, 95% CI：$2.3\text{-}6.4 \times 10^5$）に比較して、UPN1（$CD34^+CD38^-$優位白血病）により多くの白血病幹細胞が認めらた（1 LIC per 2.7×10^3, 95% CI：$1.6\text{-}4.6 \times 10^3$、$p = 0.0003$)。

骨髄間葉細胞との長期共培養後にも白血病細胞は NSG マウスに生着した

骨髄間葉細胞との長期共培養後の白血病細胞にも幹細胞が存在することを証明するために、マウス移植モデルを繰り返し実行した。UPN1 白血病細胞を６週間、UPN６白血病細胞を４週間、骨髄間葉細胞と共培養を継続し、フローサイトメトリーにて厳格に $CD45^+$白血病細胞を分離し、同数の新しい、培養していない $CD34^+$細胞をマウス尾静脈に同日に投与した。どちらの条件の白血病細胞も８週後に NSG マウスにほぼ同じ頻度で生着した（UPN1：$p = 0.54$、UPN6：$p = 0.99$：**Figure 8A**)。 生着した細胞は、$CD34^+CD38^-$ 優位、あるいは $CD34^+$ $CD38^+$優位といった元来の表現型を維持していた（**Figure 8B**)。この実験により、体外長期培養にもかかわらず、骨髄間葉細胞は白血病幹細胞を維持することを証明した。

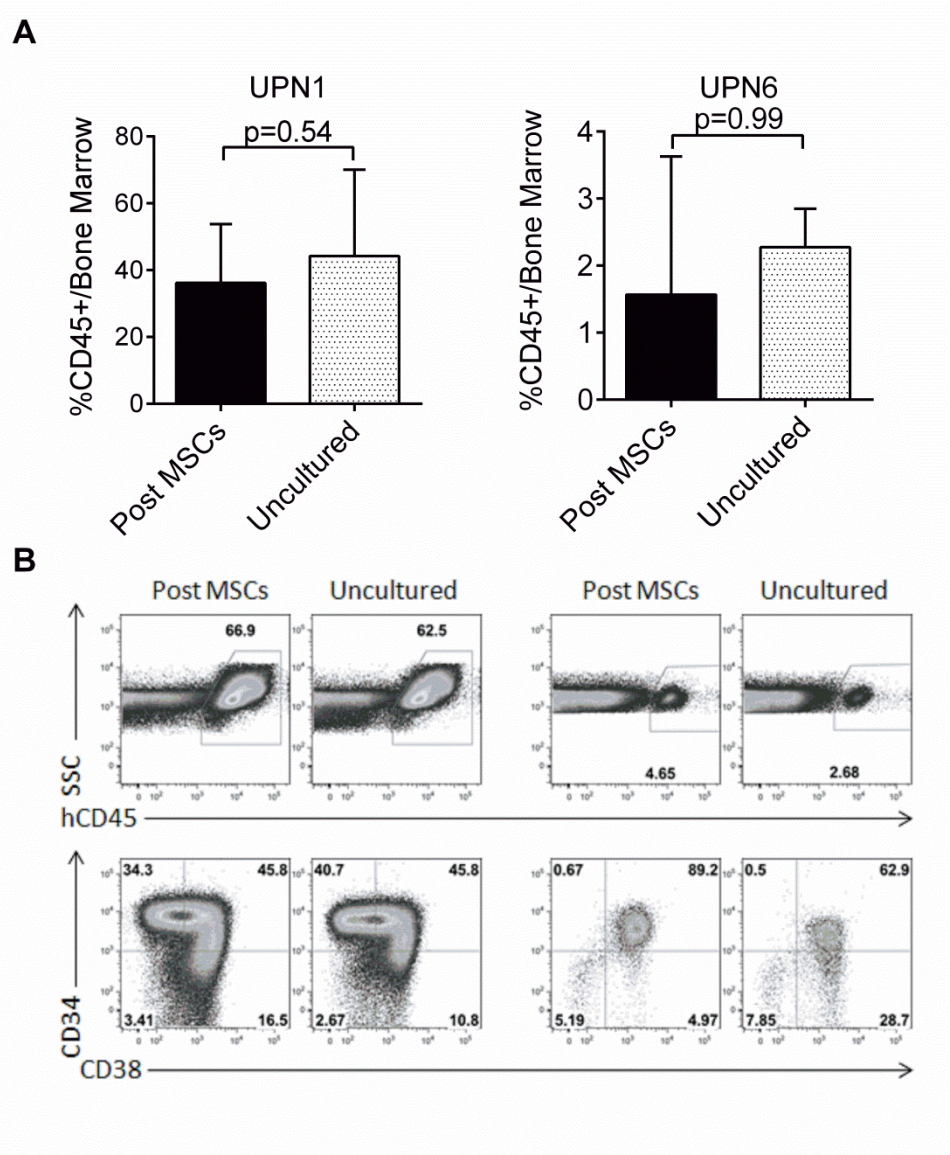
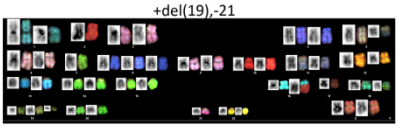
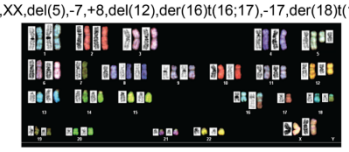
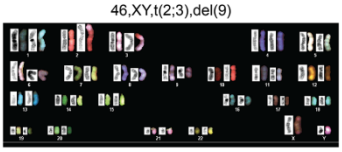


Figure 8 NSG マウスへの白血病細胞移植実験。(A) 骨髄間葉細胞との共培養後の細胞と、新たに解凍した、培養していない白血病細胞とでは、生着率にその差は認められなかった。**(B)** 生着した白血病細胞の表現型は、CD34 と CD38 の発現において、骨髄間葉細胞共培養後と非培養細胞とでは違いは認められなかった。

骨髄間葉細胞は、白血病細胞クローン性を維持した

UPN1 および UPN6 由来細胞において、（１） 骨髄間葉細胞との共培養前の患者検体から分離した CD34⁺細胞、（２） 骨髄間葉細胞との共培養を６週間継続後に分離した CD45⁺細胞、（３）NSG マウス移植後の採取した骨髄から分離した CD45⁺細胞の染色体異常をスペクトラル核型分析にて評価した。元来の CD34⁺細胞に認められた染色体異常は、骨髄間葉細胞との共培養後、あるいはその後に NSG マウスへ移植し生直後にも継続して確認された。ただし、さらなる染色体異常の進化も認められた（**Figures 9A and 9B**）。

A	UPN1	UPN6
Original CD34+	44,XX,-2,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7) +del(19),-21 	46,XY,t(2;3) 
Post MSC co-culture	45,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7) 	Not enough metaphases
Post xeno-transplant CD45+	45,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7) 	46,XY,t(2;3),del(9) 

B	UPN1	UPN6
Original CD34+	Total cells analyzed 17 Clone 1: 44,XX,-2,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7)+del(19),-21[7] Clone 2: 47,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(18)t(18;7)+del(19)[5] Clone 3: 46,XX,der(2)t(2;16),del(5),-7,+8,der(16)t(16;17),der(18)t(18;7)[3] Clone 4: 41,XX,del(5),-6,-7,+8,-9,del(12),-17,der(18)t(18;7),-21,-22[2]	Total cells analyzed 20 Clone 1: 46,XY,t(2;3)[8] Clone 2: 46,XY,t(2;3),t(11;16)[5] Clone 3: 46,XY,t(1;12),t(2;3),t(2;6),t(13;14)[3] Clone 4: 46,XY,t(2;3),t(2;13),del(14)[2] Clone 5: 47,XY,t(1;12),t(2;3),t(2;6),del(6),der(9)t(9;10),+del(13),del(14)[2]
Post MSC co-culture	Total cells analyzed 25 Clone 1: 46,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),der(18)t(18;7)[13] Clone 2: 45,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7)[6] Clone 3: 47,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),der(18)t(18;7),+del(19)[4] Clone 4: 45,XX,del(5),-7,+8,der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7)[3]	Not enough metaphases
Post xeno-transplant CD45+	Total cells analyzed 24 Clone 1: 45,XX,del(5),-7,+8,del(12),der(16)t(16;17),-17,der(18)t(18;7)[13] Clone 2: 44,XX,t(1;7),t(2;16),del(5),-7,+8,del(12),-15,-16,der(16)t(16;17),der(18)t(18;7)[3] Clone 3: 45,XX,t(1;7),t(2;16),del(5),-7,+8,del(12),-16,der(16)t(16;17),der(18)t(18;7)[2] Clone 4: 45,XX,t(1;7),t(2;16),del(5),-7,+t(8;2),del(12),-16,der(16)t(16;17),der(18)t(18;7)[2] Clone 5: 46,XX,del(5),t(5;10),-7,del(7),+8,del(12),del(14),der(16)t(16;7),der(18)t(18;7)[2] Clone 6: 45,XX,del(5),-7,del(7),+t(8;16),del(12),-16,der(18)t(18;7)[2]	Total cells analyzed 22 Clone 1: 46,XY,t(2;3)[16] Clone 2: 46,XY,t(2;3),del(9)[6]

Figure 9　白血病細胞の染色体検査。(A) スペクトラム染色体検査によるデータの例。 **(B)**　白血病細胞に認められた染色体異常の推移。UPN1 (CD34⁺ CD38⁻ 優位白血病細胞）と UPN6 (CD34⁺CD38⁺ 優位白血病細胞） のどちらにおいても、元来の染色体異常（上段）は, 骨髄間葉細胞との共培養６週間後の CD45⁺細胞（中段）、およびその後のマウス投与８週間後に生着した CD45⁺細胞（下段）に継続的に認められた。さらなる染色体異常の進化も同時に認められた。

骨髄間葉細胞は、白血病細胞の化学療法耐性を促進している

骨髄間葉細胞が白血病細胞の機能に関わっているか調べるために、白血病治療によく使われる化学療法である cytarabine への感受性を評価した。6 つの白血病検体（$CD34^+CD38^-$ 優位白血病（n = 3）、$CD34^+CD38^+$ 優位白血病細胞（n = 3))より Lin^-CD34^+細胞を分離し、様々な濃度の cytarabine を添加して骨髄間葉細胞との共培養の有無の条件を比較した。骨髄間葉細胞との共培養の条件では、有意に cytarabine に対する化学療法感受性が低くなっていることが確認された（$p = 0.0009$：**Figure 10**）。この現象は、骨髄間葉細胞が白血病細胞を化学療法による毒性から守り、生存に有利な条件を提供していると考えられる。

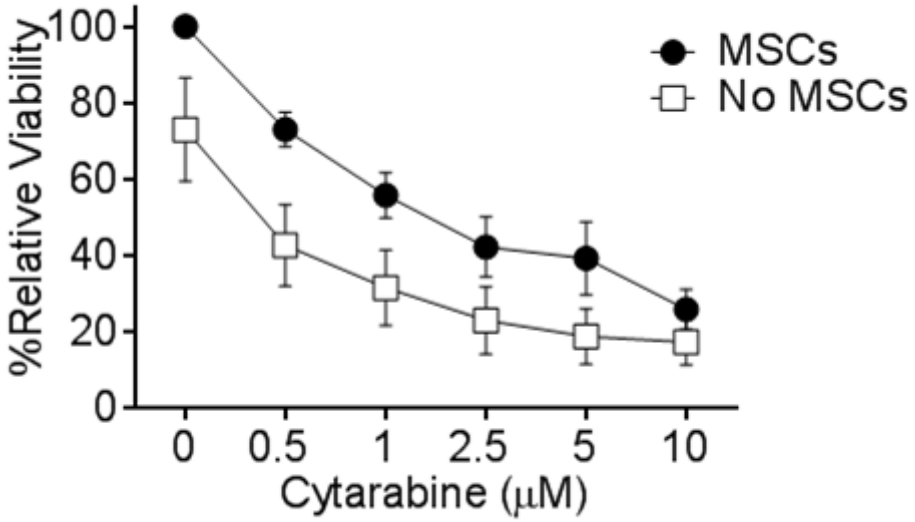


Figure 10　白血病細胞の cytarabine に対する化学療法感受性。白血病細胞を様々な濃度の cytarabine を４８時間添加した条件のもと、骨髄間葉細胞による共培養の有無による生存白血病割合を示している。白血病細胞の生存は骨髄間葉細胞との共培養により多くの細胞で認められた。

6 考察

骨髄間葉細胞は他の骨髄間質細胞とともに、造血幹細胞の維持に必要な環境を作り出し、造血細胞の分化と増殖を常に支えている。骨髄間葉細胞は培養が比較的簡単であり、骨髄間葉細胞と造血幹細胞の相互関係の研究に頻用されている。骨髄間葉細胞はその特性を活かして、造血幹細胞と造血前駆細胞の増幅の手段として臍帯血細胞移植に利用されている[27]。間葉細胞と白血病幹細胞との相互作用の性質を理解することは、化学療法後の残存白血病を効果的に治療する方法につながる可能性がある。体外での白血病細胞と骨髄間葉細胞の共培養法は、白血病幹細胞を長期培養するのに適した条件を満たしており、将来的に白血病幹細胞を標的とした治療法を探索するためのモデルとして利用できる可能性がある。

本研究において私たちは、ヒト骨髄間葉細胞との共培養により、白血病幹細胞の表現型を維持し、主に静止期（非分裂期）の細胞のまま長期間体外で培養することが可能であることを示した。さらに、6週間の体外培養後に採取した細胞が、NSGマウスモデルを用いて、幹細胞の性質であるマウスの骨髄への生着を維持し続けていることも証明した。また、ヒト骨髄間葉細胞による培養条件が、増殖因子を含んだサイトカイン培養条件、あるいは培養液のみの条件よりも、より静止期の細胞を維持し、細胞の過度な増殖を抑える働きがあることがわかった。例外として８症例のうち１症例では、骨髄間葉細胞なしでも白血病幹細胞を維持していることから、白血病の中には自律的に自己増殖能力を獲得し、間葉細胞による幹細胞へのサポートを必要としない白血病も存在することがわかった。白血病細胞のサンプルによって多様な性質があることは以前にも報告されている[29]。 間葉細胞株による白血病細胞の維持は他のグループによっても報告されている。たとえば、van Gosliga et al[30] はMS5 stromal 細胞株を利用し、Klco et al[29] はヒトHS27 stromal細胞株を用いて白血病細胞を培養している。しかしどちらのグループも間葉細胞株に加えて、増殖因子（SCF, IL-3, Flt-3 ligand +/- TPO）を培養に添加しており、前者のグループは長期培養により白血病細胞のCD34マーカーが失われてしまうことを示している。[30] いずれのグループとも異なる間葉細胞を使用しているとはいえ、本研究の結果は培養中の増殖因子の添加が白血病細胞の分化を促し、白血病幹細胞の相対的な割合の減少を引き起こす可能性を示唆している。

体外での長期培養にもかかわらず、骨髄間葉細胞により白血病細胞のクローン性は大部分維持されていることが染色体検査により証明された。骨髄間葉細胞

による白血病の表現型の維持される割合は、$CD34^+CD38^+$ 優位の白血病細胞に比べて、$CD34^+CD38^-$ 優位の白血病細胞に多く見られた。よって骨髄間葉細胞による白血病細胞の生存優位性は、白血病幹細胞の頻度にも影響されているとも考えられる。

また本研究では、白血病幹細胞の維持には、骨髄間葉細胞との細胞間接触が必要であることが、トランスウェル培養の実験により証明された。骨髄間葉細胞が白血病幹細胞の生存、静止期への維持を支える機序についてさらなる研究が望まれる。たとえば、骨髄間葉細胞と白血病幹細胞それぞれの細胞表面接着因子やレセプターの相互関係についてさらなる研究が進めば、その機序を利用した新たな白血病の治療法が開発されるかもしれない。

また本研究で示したように、骨髄間葉細胞により白血病細胞が標準的化学療法である cytarabine への耐性を獲得する現象を考慮すると、本研究の培養法が、特に化学療法後に残存した白血病細胞のモデルとして、新しい化学療法やその他の治療法のスクリーニングに使用可能性がある。

本研究ではこの培養法におけるさらなる分子的な機序の解明にまで踏み込んだ研究をすることはできなかった。正常の造血幹細胞において重要な役割を果たしているサイトカイン、ケモカイン、接着因子などが、この培養系においてどのように白血病幹細胞の維持機構にかかわっているのか、今後研究する必要がある。また、白血病幹細胞自体が、どのように骨髄間葉細胞に作用するのかというのも解明すべき課題である。たとえば、白血病細胞と共培養した場合に、骨髄間葉細胞はその多くが２週間以内にその網目構造を失い、消滅していく現象を観察している。白血病幹細胞から分泌される蛋白分解酵素や細胞毒性のあるエクソソームなどが、骨髄間葉細胞の構造に影響を与えている仮説もたてられる。白血病幹細胞の骨髄間葉細胞に与える影響の機序を解き明かすことで、骨髄内での骨髄間葉細胞の正常な機能をさらに深く理解できる可能性がある。

急性骨髄性白血病の寛解導入と支持療法、骨髄移植により白血病治療は進歩してきたが、いまだに再発への治療法は確立されているとはいえない。同種造血幹細胞移植が現在のところ唯一治癒をもたらす治療法であり、それは移植片対白血病効果（graft-versus-leukemia effect, GVL effect）によって残存した白血病細胞が駆逐されるためと考えられている。緒言で述べたように、白血病幹細胞の標準的実験方法は SCID マウスを使用した白血病細胞の生着であるが、このモデルでは、白血病におけるヒト免疫システムの役割について検討すること

ができない。本研究の体外培養法を用いることで、白血病幹細胞、ヒト骨髄間葉細胞、さらにはヒト免疫細胞の共培養が可能となり、GVL 効果のさらなる解明、さらには新たな免疫療法の開発の手がかりになるかもしれない。免疫抑制的に働くヒト骨髄間葉細胞の機能が、骨髄内の免疫細胞を直接抑制し、それが相乗的に白血病幹細胞を保護している仮説も立てられる[19]。この培養法は将来的に、様々な白血病幹細胞および骨髄微小環境を対象とした研究に応用できる可能性に満ちた培養法であると期待している。

7 総括および結論

本研究にて以下の知見が得られた。

- 患者由来の白血病細胞は、骨髄間葉細胞との共培養により長期の体外培養が可能である。
- 骨髄間葉細胞との共培養は、元来の白血病幹細胞の表現型を維持し、また白血病細胞の細胞周期を静止期（非分裂期）に維持する。
- ６週間の長期体外培養後にも、骨髄間葉細胞との共培養後の白血病細胞は NSG マウス骨髄への生着能力を維持する。
- 骨髄間葉細胞との共培養により、白血病細胞の化学療法（Cytarabine）への感受性が低下する。
- 骨髄間葉細胞との共培養による白血病幹細胞の維持には、骨髄間葉細胞と白血病細胞との間に細胞間接着が必要である。

本研究の意義は、白血病幹細胞を長期間生体外で維持する簡易な培養法を確立したことにあり、この方法は、骨髄微小環境における白血病幹細胞の維持機構を解明し、新たな治療法を開発するために有用な技術となる可能性がある。たとえば、骨髄間葉細胞と白血病幹細胞、それぞれの細胞表面接着分子、レセプター、あるいは細胞間シグナルの相互関係について研究する手段として有用だと考えられる。また、骨髄微小環境による薬剤耐性のモデルとして、新たな抗がん剤の初期スクリーニングに使用される可能性もある。さらに、白血病幹細胞、ヒト骨髄間葉細胞に加えて、ヒト免疫細胞の共培養も理論上可能であり、新たな免疫療法の開発の手がかりになるかもしれない。

今後の課題としては、使用するヒト骨髄間葉細胞の標準化や、共培養後の白血病細胞を分離し分子学的あるいは免疫学的な実験につなげる系の確立など、実験系のさらなる調整や検討が必要である。また、体外での共培養モデルと、NSG マウスなどを用いた in vivo モデルとの相関や対比を、実験目的に合わせて追試する必要もある。いずれにしろ、この培養法により、白血病幹細胞および骨髄微小環境を対象とした研究が、将来さらに発展されることが望まれる。

8 謝辞

この論文は米国国立衛生研究所、心肺血液研究所、血液内科分野の A John Barrett 教授ならびに、北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野、秋田弘俊教授の指導により完成された。

Barrett 教授には白血病の病態のみならず骨髄移植や癌免疫など様々な分野における探索的研究について多大な示唆に富むご指導をいただいたことに心から感謝する。

秋田教授には、北海道大学医学部学生時代から癌の探索的研究についての構想をいち早く教授くださり、さらに長い年月をかけて継続的に粘り強くご指導いただいたことを心より深く感謝する。

また、私自身の両親の深い愛情に基づいた献身的な支えにこの場を借りて感謝申し上げる。

9 引用文献

1 Valent, P. *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature reviews. Cancer* **12**, 767-775, (2012).

2 Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793-4807, (2008).

3 Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648, (1994).

4 Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I. & Dick, J. E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* **4**, 1038-1045, (1998).

5 Eppert, K. *et al.* Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* **17**, 1086-1093, (2011).

6 Gentles, A. J., Plevritis, S. K., Majeti, R. & Alizadeh, A. A. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* **304**, 2706-2715, (2010).

7 Saito, Y. *et al.* A Pyrrolo-Pyrimidine Derivative Targets Human Primary AML Stem Cells in Vivo. *Sci Transl Med* **5**, 181ra152, (2013).

8 Saito, Y. *et al.* Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med* **2**, 17ra19, (2010).

9 Misaghian, N. *et al.* Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia* **23**, 25-42, (2009).

10 Sarry, J. E. *et al.* Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 384-395, (2011).

11 Cancer Genome Atlas Research, N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **368**, 2059-2074, (2013).

12 Ley, T. J. *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **363**, 2424-2433, (2010).

13 Jan, M. *et al.* Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science translational medicine* **4**, 149ra118, (2012).

14 Shlush, L. I. *et al.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328-333, (2014).

15 Goyama, S., Wunderlich, M. & Mulloy, J. C. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood* **125**, 2630-2640, (2015).

16 Kennedy, J. A. & Barabe, F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia* **22**, 2029-2040, (2008).

17 Schepers, K., Campbell, T. B. & Passegue, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell stem cell* **16**, 254-267, (2015).

18 Bulycheva, E. *et al.* Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies. *Leukemia* **29**, 259-268, (2015).

19 Keating, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell* **10**, 709-716, (2012).

20 Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621-2629, (2015).

21 Sipkins, D. A. *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* **435**, 969-973, (2005).

22 Krause, D. S. *et al.* Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nature medicine* **19**, 1513-1517, (2013).

23 Walkley, C. R. *et al.* A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* **129**, 1097-1110, (2007).

24 Walkley, C. R., Shea, J. M., Sims, N. A., Purton, L. E. & Orkin, S. H. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* **129**, 1081-1095, (2007).

25 Kode, A. *et al.* Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* **506**, 240-244, (2014).

26 Hanoun, M. *et al.* Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell stem cell* **15**, 365-375, (2014).

27 de Lima, M. *et al.* Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* **367**, 2305-2315, (2012).

28 Robinson, S. N. *et al.* Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* **37**, 359-366, (2006).

29 Klco, J. M. *et al.* Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. *Blood* **121**, 1633-1643, (2013).

30 van Gosliga, D. *et al.* Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Exp Hematol* **35**, 1538-1549, (2007).

31 Larochelle, A. *et al.* Bone marrow homing and engraftment of human hematopoietic stem and progenitor cells is mediated by a polarized membrane domain. *Blood* **119**, 1848-1855, (2012).