

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09453

研究課題名(和文) 骨髄間葉系間質細胞を標的とした前駆B細胞性急性白血病治療に関する検討

研究課題名(英文) Targeting of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for the treatment of B cell acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

三浦 康生 (MIURA, Yasuo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70605146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：成人前駆B細胞性急性リンパ性白血病(B cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)は様々な治療の工夫にも関わらず長期予後は不良である。本研究課題では、ヒト骨髄間葉系間質細胞と接着するヒトB-ALL細胞が抗がん剤抵抗性を示す細胞集団であること、複数のプロテアソーム阻害剤が細胞間の接着性を減弱しB-ALL細胞の抗がん剤感受性を回復すること、ボルテゾミブを含む化学療法はB-ALLモデルマウスの生存期間を延長させることを示した。以上より、ヒト骨髄間葉系間質細胞を標的とした薬物療法がヒトB-ALL患者の治療に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adult B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) belongs to an entity of intractable hematological diseases. In this study, we found that human B-ALL cells that adhered to human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells (BM-MSC) showed resistance to anti-cancer drugs. Proteasome inhibitors interfered with the adhesion of B-ALL cells to BM-MSCs and subsequently restored chemosensitivity of B-ALL cells. In B-ALL mouse model, chemotherapy with bortezomib-containing anti-cancer drugs prolonged the survival of the mice. These findings suggest that pharmacological targeting of BM-MSCs is effective for the treatment of patients with B-ALL.

研究分野：細胞治療学

キーワード：急性リンパ性白血病 間葉系間質細胞 抗がん剤抵抗性 細胞接着 骨髄微小環境 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 成人前駆 B 細胞性急性リンパ性白血病 (B cell acute lymphoblastic leukemia: B-ALL) は様々な治療の工夫にも関わらず、長期予後は 30%前後にとどまっている (Int J Hematol 92:490, 2010). 一般に、急性白血病の治療は白血病細胞に対して作用機序の異なる薬剤を組み合わせた多剤併用抗がん剤治療が繰り返し行われる。しかしながら、再発の原因となる抗がん剤抵抗性の微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) の存在など、白血病細胞を標的として治療強度を増強するだけでは白血病の根絶は困難であることが明らかとなりつつある。成人 B-ALL においては免疫学的機序による抗がん剤抵抗性白血病細胞の駆逐が期待できる同種造血幹細胞移植の有効性も定まった見解が得られておらず (Cancer 116:3447, 2010), 有効な治療戦略の開発が臨床上的課題である。

(2) 現在、白血病細胞に対する骨髄微小環境の関与が精力的に検討されている。マウスでは驚くべきことに骨髄微小環境の異常が白血病病態を発症させることが示された (Nature 464:852, 2010, Nature 506:240, 2014)。また、白血病細胞が骨髄微小環境に異常を来し、異常な骨髄微小環境が白血病細胞の抗がん剤抵抗性を引き起こす悪循環を形成すること、MRD は骨内膜表面に形成され白血病細胞は quiescent な状態に保たれるために抗がん剤抵抗性を獲得することが示されている (Nat Biotechnol 25:1315, 2007, Cancer Cell 21:577, 2012, Cell Stem Cell 13:285, 2013, Cell Stem Cell 14:1, 2014)。このような知見の蓄積されるなかで、我々は B-ALL 白血病細胞に影響を与える骨髄微小環境を治療標的とすることを着想した。

2. 研究の目的

(1) 骨髄微小環境は様々な細胞により構成されている。B-ALL 白血病細胞の正常対応細胞である前駆 B 細胞は骨芽細胞, interleukin (IL) -7 産生細胞, CXCL12-abundant reticular 細胞など間葉系間質細胞 (多能性間葉系ストローマ細胞, 間葉系幹細胞, bone marrow mesenchymal stromal/stem cell. 以下, BM-MSC という) を造血の場としている (Nature Rev Immunol 6:107, 2006)。

(2) 我々はこれまでに、B-ALL 細胞の増殖も BM-MSC の影響を受けており、BM-MSC が B-ALL 細胞の増殖を促進すること、逆に BM-MSC の機能低下によって増殖が抑制され

ることを転写因子 C/EBP β ノックアウトマウスを用いて明らかにした (Stem Cells 2014)。また、BM-MSC が支持する造血は BM-MSC に作用する薬物で影響を受けることをこれまでに明らかにしている (PLoS ONE 2008, Blood 2009, Stem Cells 2014)。さらに、マウスモデルでは骨芽細胞が B-ALL 細胞の生存を支持することが最近の研究で示された (Blood 121:4821, 2013)。

(3) これらの先行研究の成果を踏まえ、本研究課題では B-ALL 細胞の抗がん剤感受性に BM-MSC が影響を及ぼすとする仮説を検証し、そのメカニズムとして B-ALL 細胞の細胞周期、アポトーシスや生存シグナルなどの変化について検討する。そして、BM-MSC を標的とする薬剤が B-ALL 細胞の抗がん剤感受性を高めることを *in vitro* および *in vivo* の系で明らかにする。以上により B-ALL 治療において BM-MSC を標的とする rationale を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) B-ALL 細胞は NALM6 細胞を用い、NALM6 の抗がん剤感受性に BM-MSC が影響することを検討し、そのメカニズムを明らかにする。

(2) BM-MSC を標的とする薬剤が B-ALL 細胞の抗がん剤感受性を高めることを *in vitro* および *in vivo* の実験で検討する。

4. 研究成果

(1) NALM6 細胞とヒト BM-MSC を共培養すると、NALM6 細胞は BM-MSC と接着する集団と接着せず浮遊する集団の 2 群が認められた。この培養系を応用することで、BM-MSC の影響を強く受ける NALM6 細胞 (= NALM6/adhesion) と、それ以外の細胞 (= NALM6/suspension) の比較検討を行った。その結果、NALM6/adhesion は NALM6/suspension と比較して、抗アポトーシス分子 Bcl-2 の発現増強や細胞生存シグナル分子 Akt の機能亢進が認められた。また、細胞周期解析を行うと、NALM6/adhesion には S/G2/M 期および G0 期の割合が多いことを確認した。従って、BM-MSC に接着する NALM6 細胞は浮遊する細胞と比較して抗がん剤抵抗性を示す細胞集団であることが明らかになった。

以上から、BM-MSC と接着しその影響を受ける B-ALL 細胞が抗がん剤抵抗性を持つことを示し、B-ALL 患者の治療においては白血病細胞のみではなく、BM-MSC を治療標的とすることが妥当である可能性が示された (次ページ図)。

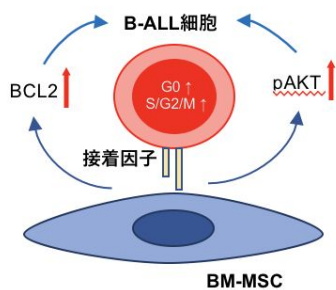


図 B-ALL細胞の抗がん剤抵抗性獲得

(2) BM-MSc に作用し、B-ALL 細胞との接着性を減弱する薬剤の検討を行った。その結果、ボルテゾミブおよび他の2つのプロテアソーム阻害剤が有望であることを確認した。BM-MSc をこれらの薬物で刺激し、B-ALL 細胞と共培養すると、B-ALL 細胞との接着性が減弱した。そして、B-ALL 細胞は、細胞周期に変化が見られ、Akt のリン酸化や Bcl-2 の発現が低下していた。従って、プロテアソーム阻害剤は BM-MSc に作用することで B-ALL 細胞との接着性を減弱させ、その結果 B-ALL 細胞の抗がん剤感受性を回復させることが明らかとなった。

以上より、B-ALL 患者の治療においては、プロテアソーム阻害剤を用いた BM-MSc を標的とする治療戦略が有効である可能性を in vitro の検証で示した。

(3) 上述のプロテアソーム阻害剤による効果を in vivo の実験で検証した。NALM6 細胞を免疫不全マウスに移植することで、B-ALL の異種移植モデルマウスを作成した。このマウスの生存期間は治療薬を投与しない群(無治療群)では中央値 35 日であった。一方、治療薬を投与した群の生存期間中央値は、ボルテゾミブ投与群で 39 日、ボルテゾミブ+ドキシソルピシン併用投与群で 57.5 日であり、生存期間の延長効果が認められた。骨髓内の BCP-ALL 細胞はボルテゾミブ+ドキシソルピシン併用投与群で顕著に減少していた。

(4) 本研究課題では、ヒト BM-MSc と接着することでその影響を強く受けるヒト B-ALL 細胞は、それ以外の細胞と比較して抗がん剤抵抗性を示す細胞集団であること、ボルテゾミブおよび他のプロテアソーム阻害剤が細胞の接着性を減弱し、その結果 B-ALL 細胞の抗がん剤感受性を回復すること、BCP-ALL モデルマウスにおいてボルテゾミブ単独または既存の白血病治療薬との併用がマウスの生存期間を延長させることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計17件)

Iwasa M, Miura Y[#] (2 番目), Fujishiro A, et al (他 9 名). (2017) Bortezomib interferes with adhesion of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells through SPARC up-regulation in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. *Int J Hematol.* 105(5):587-597. (査読有)
doi: 10.1007/s12185-016-2169-x.
(#Corresponding author)

Sugino N, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Miura Y[#]. (2017) Pharmacological targeting of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for the treatment of hematological disorders. *Inflamm Regen.* 37:7. (査読有)
doi: 10.1186/s41232-017-0038-5.
(#Corresponding author)

Fujii S, Miura Y[#] (2 番目), Iwasa M, et al (他 9 名). (2017) Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. *J Clin Exp Hematopathol.* 57:1-8. (査読有)
doi: 10.3960/jslrt.16019.
(#Corresponding author)

三浦康生[#]:ヒト間葉系幹細胞の基礎と臨床. *Clin Calcium.* 2017; 27:851-856. (査読無)(#責任著者)

Miura Y[#], Ichinohe T, Maekawa T. (2015) Human mesenchymal stromal/stem cell-mediated bone marrow organization. *J J Trans Cell Ther.* 61:489-490. (査読有)
(#Corresponding author)

Uchiyama T, Kawabata H, Miura Y (3 番目), et al (他 9 名). (2015) The role of growth differentiation factor 15 in the pathogenesis of primary myelofibrosis. *Cancer Med.* 4:1558-1572. (査読有)
doi: 10.1002/cam4.502.

Miura Y[#]. (2016) Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells:

current clinical applications and potential for hematology. Int J Hematol. 103:122-128. (査読有)
doi: 10.1007/s12185-015-1920-z.
(#Corresponding author)

Miura Y#. (2016) Guest editorial: Human mesenchymal stromal/stem cell (MSC). Int J Hematol. 103:119-121. (査読有)
doi: 10.1007/s12185-015-1931-9.
(#Corresponding author)

三浦康生# : Mesenchymal stromal/stem cell の基礎と臨床. 臨床血液. 2015; 56: 2195-2204. (査読有)(#責任著者)

[学会発表](計35件)

1. Iwasa M, Miura Y# (2番目), Fujishiro A, (他7名). Bortezomib contributes to the elimination of B-ALL cells through SPARC upregulation in BM-MSCs. The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Tokyo, October 20, 2017.
2. 三浦康生. ヒト間葉系幹細胞の特性に基づいた治療への応用の可能性. 第64回日本輸血・細胞治療学会総会 シンポジウム 6 間葉系幹細胞を用いた細胞治療 <細胞治療サイエンス・フォーラム> 平成28年4月9日, 京都 [招待講演]
3. 三浦康生. ヒト間葉系幹細胞を標的とした難治性造血器悪性疾患治療. 第37回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 5 「組織幹細胞治療と炎症」 平成28年6月16日 京都 [招待講演]
4. 三浦康生: Mesenchymal stromal/stem cell の基礎と臨床 [Abstract #EL-7]. 第77回日本血液学会総会, 金沢, 平成27年10月16日 [教育講演]
5. Iwasa M, Miura Y# (2番目), Fujishiro A, et al (他11名). Bortezomib Attenuates Adhesion of B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells Via Regulating SPARC Expression [Abstract #786]. American Society of Hematology, 57th Annual Meeting, Orlando, FL, USA, December 5-8, 2015. [Abstract

Achievement Award]

6. 岩佐磨佐紀, 三浦康生, 藤城綾, 他(他10名): ポルテゾミブは前駆B細胞性白血病細胞の骨髄間葉系幹細胞への接着を減弱させる [Abstract #P-3228]. 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋, 平成27年10月8日~10日.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

文部科学省 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 「骨髄ニッチを標的にした急性白血病の治療法開発」
<http://ganshien.umin.jp/research/main/maekawa/05.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 康生 (MIURA YASUO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70605146

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

岩佐 磨佐紀 (IWASA, Masaki)
滋賀医科大学・消化器血液内科・大学院生
藤城 綾 :(FUJISHIRO, Aya)
滋賀医科大学・消化器血液内科・大学院生

藤井 紀恵 (FUJII, Sumie)
京都大学・血液・腫瘍内科・大学院生