様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：２０１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５K０９４８２

研究課題名（和文）MDS・AML由来エキソソームによる間質機能修飾機構の解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）The effect of exosomal miRNA on AML/MDS stromal cells

研究代表者
小船　雅義（Kobune, Masayoshi）

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：９０３３６３８９

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）：急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群患者において，骨髄間質細胞の異常なサイトカイン発現などを初めとした，様々な異常がみられることが報告されている。しかしながら，これらの異常が惹起される分子機構は明らかとされていない。本研究により，細胞外小胞（エクソソーム）が骨髄微細環境内に高濃度で存在し，白血病細胞から分泌されるエクソソームが骨髄間葉系幹細胞に移行し作用することを見出した。また、エクソソームは、造血幹細胞支持因子などの遺伝子を不安定にすることで、正常造血支持能を低下させることを明らかとした。これらことは、エクソソームを標的とした新規治療標的につながることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：The failure of normal hematopoiesis is observed in myeloid neoplasms. However, the precise mechanisms governing replacement of normal hematopoietic stem cells in their niche by myeloid neoplasm stem cells have not been clarified yet. Primary acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) cells induced aberrant expression of multiple hematopoietic factors including JAG1, SCF and ANGPT1 in mesenchymal stem cells. Importantly, transfer of myeloid neoplasm-derived extracellular vesicles reduced the hematopoietic-supportive capacity of mesenchymal stem cells. Analysis of exosomal microRNA indicated that several species including miR-7977 from acute myeloid leukemia cells were higher than those from normal CD34+ cells. Remarkably, the copy number of miR-7977 in BM interstitial fluid was elevated in not only AML, but also MDS, as compared with control bone marrow. Thus, miR-7977 in extracellular vesicles may be a critical factor that induces failure of normal hematopoiesis.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：エクソソーム　マイクロRNA　白血病　骨髄異形成症候群　骨髄間質細胞

１．研究開始当初の背景

近年、血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は日々進歩をとげているが、MDS や難治性白血病（AML）においては腫瘍細胞を根絶することが困難で、特に高齢者や骨髄移植が困難な症例においては根治治療が無いのが現状である。したがって、骨髄異形症候群の初期病態を明らかとし、その進展を食い止める手段を探索することは同疾患の新たな治療戦略を確立する上で意義が高い。最近、次世代シークエンサー（NSG: next generation sequencing）を用いたエクソン領域（エクソーム）の解析より骨髄異形成症候群の原因として、転写因子のみならず、様々なエピジェネティックス制御因子、スプライシングに関わる分子など様々な遺伝子群の異常が相次いで報告されその概要が明らかにされて来た。しかしながら、エクソームの NGS 解析によっても原因が特定できないクローン性増殖を呈する健常人の存在が明らかにされ(Raaijmakers-MH, et al.Nature Genetics 2012)、未解明の部分も残されていると考えられる。最近、骨髄間質細胞特異的にβcatenin あるいは Sbd といった単一遺伝子を Knockout したマウスでは、MDS が自然発症し、最終的に白血化することが報告された。さらに、MDS 患者においても、ストローマ細胞における Sbds および Drosha 遺伝子の発現低下が認められることが報告された。これらのことは、骨髄間質細胞の異常は MDS/AML 発症に関与する可能性を示唆している。これまで、申請者らは、MDS/AML のヒト骨髄間質細胞ゲノムの DNA メチル化に関して検討した結果、低リスク MDS から AML まで高率に DNA メチル化が認められることを見出した。さらに、申請者らは Hematopoiesis 関連遺伝子をアレイで解析した結果、MDS/AML 由来間質において、多数の遺伝子群が低下していることを見出し、特に造血前駆・幹細胞分画を制御する因子の発現が低下している事を preliminary ながら見出した。さらに申請者らは、間質細胞の遺伝子発現異常を誘導する腫瘍由来因子には液性因子で含まれることを preliminary ながら明らかとした。

そこで、様々な液性因子の中和抗体や阻害剤で解析を試みたが、AML/MDS 細胞による間質細胞の異常を阻止する事は困難であった。そこで、これまで解析していなかった細胞外小胞（EV：extracellular vesicle）の関与を想定し、CD34+AML 細胞に GFP 遺伝子を導入し、細胞膜を PKH26 で赤色蛍光標識した後に、共培養を行う extracellular vesicle transfer assay を用い解析した。超解像顕微鏡による解析の結果、ヒト骨髄間質細胞内に GFP シグナルが検出され、PKH26 陽性膜成分が細胞膜および細胞内エンドソームに検出されることが明らかとなった。この所見はエクソソームがトランスファーされた時に見られる所見と一致していたことから、その阻害剤を用いて検討したところ、エクソソーム・トランスファーが著減することが明らかとなった。これらのことは、MDS/AML 細胞から分泌されたエクソソームは、ヒト骨髄間質細胞にトランスファーされ、多彩な遺伝子群の発現異常を誘導することを示唆しているものと考えた。

２．研究の目的

本研究では研究期間内に、健常な骨髄および AML/MDS 患者から骨髄間質細胞を分離し、その mRNA、蛋白質および microRNA の発現の差異をより詳細なデータを取得し、それを基盤にして、エクソソームにより DNA からの遺伝子発現異常が惹起される分子機構を解明することを目的とする。また、血清中からエクソソームを単離し、それを解析することで早期診断法のみならず新規治療法の確立に役立つような研究に発展させていくことを最終目標とする。

３．研究の方法

1) 正常骨髄細胞および MDS/AML 患者由来間質細胞の分離

正常骨髄細胞および MDS/AML 患者由来間質細胞の分離の手続きは、申請者らの施設の倫理委員会で定められた指針に基づき骨髄を採取する(正常骨髄は献体、リンパ腫 stage I を対象)。

a)骨髄間質細胞を plastic dish に対する付着法で採取するときは、既報にしたがって分離し（Kobune-m et al. Exp Hematol 2003, Kobune-m et al. Exp Hematol 2008)、専用の培地（MSCGM、LONZA 社より購入）で培養する。

b)骨髄間質細胞を骨髄から直接分離解析するときは、cell sorter（FACS aria）で抗ヒト CD45 陰性、CD271 陽性および CD146 陽性および陰性分画に分離した後解析する。適時、DyeCycle Violet（violet laser 対応）で染色し、Cell cycle を解析する。

c)間葉系幹細胞の分離の行程と同時に CD34＋分画を分離する。CD34+MDS/AML 細胞は CD45dim 分画に gate をかけ正常 CD34+細胞が混入しないように分離する。

2) 正常および MDS/AML 間質細胞の機能の解析

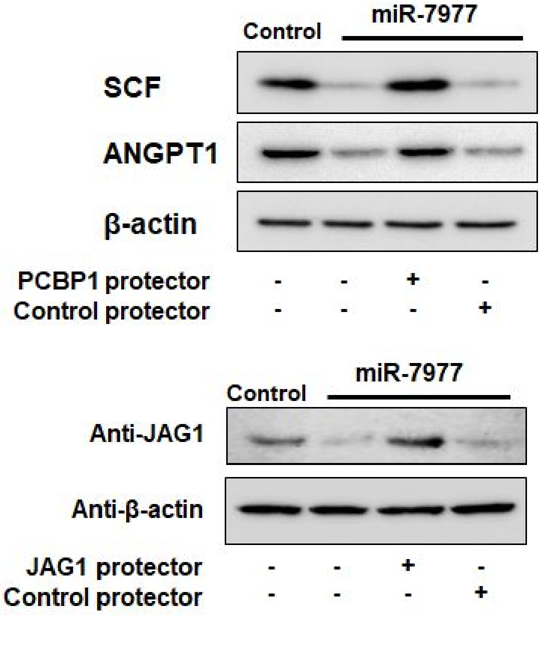
骨髄間質細胞の機能は、正常骨髄および MDS/AML 由来 CD34+細胞と共培養した後の、血球細胞のコロニー形成能および NOD/SCID マウスへの生着能を維持できるか否かで判定する。

3) 培養液および骨髄間質血清中からのエクソソームの分離精製(担当：堀口)

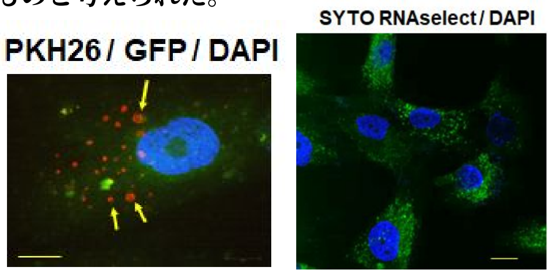
培養液からエクソソームを抽出するときは primary 細胞の培養には既報の無血清培養系を用いるが（Kawano-Y, Kobune-M et.al. Exp Hematol 2008:牛血清は多量のエクソソームを含有）、細胞株の培養には 10% vesicle-free FBS(SBI 社)を用いる。培養上清からのエクソソームの抽出は、2,000 x g for 20 分間の遠心後に得られた上清を、0.45μｍ

で細胞のデブリスおよびアポトーシス小体を除去した後に、ExoQuick-TC (Exosome Precipitation Solution)を添加し、overnight 後の沈澱分画をエクソソーム分画として用いる。
4) エクソソーム分画から Total RNA を抽出し、miRNA に対するアレイを施行することで、AML で高率に産生される miRNA を同定する。
5) 上記の miRNA アレイの結果を検証するために、qRT-PCR で測定検証する。
6) 検出された miRNA の機能を WEB ツールを用いた Target search で絞り込んだ後、ウエスタン・ブロティイング法、ターゲット・プロテクター法およびルシフェレースアッセイで確認することで、標的遺伝子を同定する。

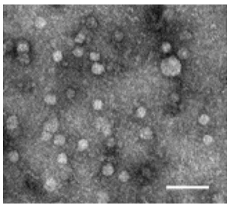
４．研究成果
平成 27 年度
骨髄異形成症候群（MDS）/白血病(AML)細胞の遺伝子解析の結果、その遺伝子変異の概要が明らかとされつつある。一方、最近になって、骨髄間質細胞特異的な Sbds/β-catenin ノックアウト・マウスにおいては、血球細胞の遺伝子異常が蓄積された結果、MDS/AML を発症することが見出され、ヒト MDS の発症進展におけるニッチ異常が注目されている。
そこで、Hematopoiesis 関連遺伝子を PCR アレイで解析した結果、MDS/AML 由来間質において、多数の遺伝子群が低下していることを見出し、特に造血前駆・幹細胞分画を制御する因子に着目して、AML/MDS 由来の骨髄間質細胞における遺伝子発現を解析した結果、SCF、ANGLP1、Jagged-1 の発現が低下していた。

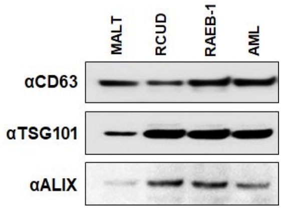


さらに、この異常が誘導される分子機構を解析した結果、MDS/AML 細胞と間質細胞は Boyden chamber を用いた非接着培養の両者において、遺伝子異常が誘導された。
これまで解析していなかった細胞外小胞（extracellular vesicle）の関与を想定し、CD34+AML 細胞に GFP 遺伝子を導入し、細胞膜を PKH26 で赤色蛍光標識した後に、間質との共培養を行った。
超解像顕微鏡による解析の結果、ヒト骨髄間質細胞内に GFP シグナルが、びまん性に検出され、PKH26 陽性膜成分が細胞膜および細胞内エンドソームに検出されることが明らかとなった。これらのことは、MDS/AML 細胞から分泌されたエクソソームは、ヒト骨髄間質細胞にトランスファーされ、多彩な遺伝子群の発現異常を誘導することを示唆しているものと考えられた。



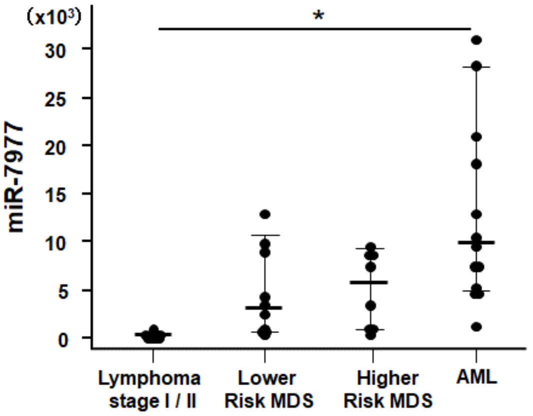
平成 28 年度
平成 28 年度は、細胞外小胞の種類の分類、小胞内に内包される物質の解析を行った。電子顕微鏡で細胞外小胞を観察した結果、20-50 nM の大小不同の細胞外小胞が観察され、骨髄微細環境には複数の種類の細胞外小胞が存在することが示された。小胞の蛋白質を解析したところ、CD63 抗原、TSG101 抗原および ALIX 抗原が検出されたことから、エクソソーム分画が含まれることが明らかとなった。



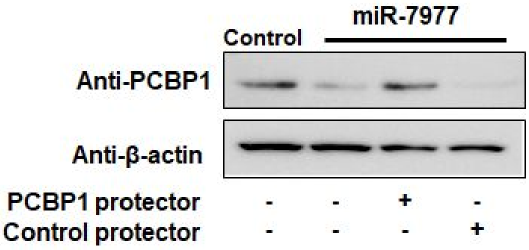


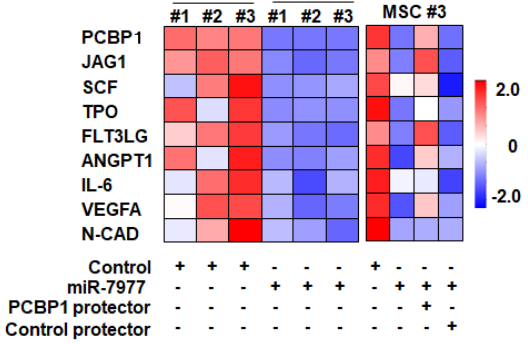
細胞外小胞内のマイクロ RNA をマイクロアレイで解析したところ、AML 由来の細胞内小胞では miR-4286,miR-8073 および miR-7977 が高値を取ることが示された。患者由来骨髄間質血清中のマイクロ RNA を測定したところ、miR-4286,miR-8073 および miR-7977 ともに、コントロール（リンパ腫 stageI）よりも増加していたが、なかでも miR-7977 は、MDS が増悪し AML に進展していくにつれて増加傾向にあることが示された。このことから、本研究では、miR-7977 の標的分子を同定していくこととした。

平成 29 年度



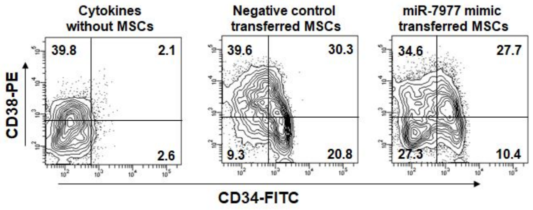
miR-7977 の標的分子の同定を試みた。まず、miRDB を用いることでバイオインフォマティクスの手法で予測される標的分子をスクリーニングした。その結果、poly(rC) binding protein 1（PCBP1）というメッセンジャーRNA(mRNA) の安定化因子および serine/threonine kinase 4（STK4）という細胞の過剰増殖を抑える因子が選択された。PCBP1 は幾つかの癌腫の腫瘍幹細胞の形成に不可欠であることが報告され、サイトカインおよび接着分子の発現増加に関与している。このため、PCBP1 mRNA に miR-7977 の結合配列の有無をスクリーニングした。その結果、５´端および３´端にそれぞれ１カ所づつ、合計２カ所の結合可能配列の存在が確認された。そこで、間葉系幹細胞に miR-7977 を導入した後に、PCBP の発現レベルを解析したところ、mRNA およびタンパク質ともに発現低下が惹起されることが示された。さらに、PCBP1 の３´端をプロテクトする target protector を用いて解析した結果、miR-7977 は同部位に結合することが明らかとなった。

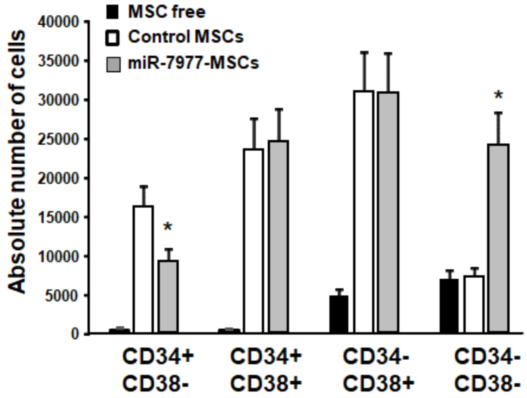




PCBP1 により発現が増加しているサイトカインおよび接着分子をスクリーニングした結果、ANGPT1、SCF、JAG1 が PCBP1 の制御を受け、miR-7977 が作用すると発現低下が惹起されることが明らかとされた。

さらに、miR-7977 導入間葉系幹細胞は





CD34+CD38-細胞分画に対する造血支持能が著しく低下することが明らかとされた。

これらの結果から AML 細胞から分泌される miR-7977 は、近接したニッチ細胞の正常造血機能を破綻させることが明らかとされた。今後、miR-7977 阻害剤などを用いた新規治療への発展を試みることを計画している。

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）

1. Arihara Y, Takada K, Kamihara Y, Hayasaka N, Nakamura H, Murase K, Ikeda H, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. Oncotarget. 2017, 8, 65889-65899. 査読有り DOI：10.18632/oncotarget.19508
2. Hirayama Y, Ishitani K, Sato Y, Iyama S, Takada K, Murase K, Kuroda H, Nagamachi Y, Konuma Y, Fujimi A, Sagawa T, Ono K, Horiguchi H, Terui T, Koike K, Kusakabe T, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. J Clin Oncol. 2015, 20, 866-871. 査読あり DOI：10.1007/s10147-015-0810-y

3. Ishiwatari H, Hayashi T, Yoshida M, Ono M, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Phase I trial of oral S-1 combined with hepatic arterial infusion of gemcitabine in unresectable biliary tract cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2015, 75, 805-812. 査読有り DOI：10.1007/s00280-015-2704-0
4. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Hepatology. 2015, 62, 751-761. 査読有り DOI：10.1002/hep.27774

〔雑誌論文〕（計　1　件）
1. 小船雅義，加藤淳二．鉄代謝の赤血球調節因子エリスロフェロン．月刊「血液内科」特集／鉄代謝制御機構と鉄過剰症 2015; 70:302-307.

〔学会発表〕（計　4　件）
1. 小船雅義、堀口拓人、宮西浩嗣、加藤淳二. PCBP1 発現低下による骨髄間質細胞の機能不全発症機序の解析．日本鉄バイオサイエンス学会（シンポジウム）東京（東京女子医科大学）．2017 年 9 月 24 日
2. Yoshida M, Kobune M, Miura S, Ibata S, Iyama S, Sato T, Murase K, Takada K, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Sugama Y, Kikuchi S, Ikeda H, Horiguchi H, Kawano Y, Miyanishi K、Kuroda H, Maeda M, Kato J. Extracellular vesicle microRNAs from acute myeloid leukemia are involved in the regulation of adherens junction in bone marrow microenvironment. American Society of Hematology. 2016 Dec 1-6: San Diego, U.S.A.
3. Miura S, Kobune M, Ibata S, Yoshida M, Iyama S, Sato T, Murase K, Takada K, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Sugama Y, Wataru J, Kikuchi S, Ikeda H, Horiguchi H, Kawano Y, Miyanishi K, Kuroda H, Maeda M, Kato J. CD34/EPO-R double positive MDS cells produced erythroferrone in response to erythropoietin. American Society of Hematology. 2016 Dec 1-6: San Diego, U.S.A.
4. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Sato Y, Miyanishi K, Takimoto R, Kuroda H, Maeda M, Kato J. Exosomal microRNAs in bone marrow cavity induce stromal dysfunction in AML/MDS. 第 77 回日本血液学会学術集会（石川県金沢市）2015 年 10 月 16 日～2015 年 10 月 18 日.

〔図書〕（計　3　件）
1．小船雅義．巨赤芽球性貧血．血液科研修ノート．東京：診断と治療社; 2016．頁 243-250．
2．小船雅義．今日の治療指針 2015：鉄欠乏性貧血．医学書院 2015．4 頁
3．小船雅義．今日の診断指針 2015：鉄欠乏性貧血．医学書院 2015．2 頁

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://web.sapmed.ac.jp/im4/

6．研究組織
(1)研究代表者
小船　雅義（KOBUNE MASAYOSHI）
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90336389

(2)研究分担者
高田　弘一（TAKADA KOHICHI）
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号： 90398321

(3) 研究分担者
村瀬　和幸（MURASE KAZUYUKI）
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：90444918