

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09649

研究課題名(和文) 新規白血病治療薬開拓に向けた白血病微小環境におけるN-カドヘリン分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of N-cadherin in leukemia microenvironment to develop a new drug for leukemia

研究代表者

岩本 彰太郎 (Iwamoto, Shotaro)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20456734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、小児白血病における白血病治療薬耐性機序の一つとして細胞接着分子の一つであるN-カドヘリン分子に注目した。本研究により、N-カドヘリン分子接着を高発現する白血病細胞株において、同分子の接着を阻害すると、デキサメサゾンに対して感受性が増加することが分かった。白血病治療薬として広く使用されるオンコピン、メソトレキサート、L-アスパラギナーゼへの感受性には影響を認めなかった。また、骨髄ニッチモデルで検証を進めるため、N-カドヘリン分子を高発現する骨髄ストローマ細胞から同分子をノックダウンした細胞株を樹立した。今後は、これらの細胞株を用いて、実験を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether N-cadherin, one of the adhesion molecules, could play pivotal roles in resistance against anti-leukemic drugs in childhood leukemia. We showed the sensitivity for dexamethasone, not L-asparaginase, Vincristine or Methotrexate, in 697 leukemia cell line with the highly expression of N-cadherin using the neutralizing antibody (GC-4) was increased in cytotoxic assay. Moreover, we developed N-cadherin knock-down bone marrow stroma cell (BMSC) lines to investigate this specific mechanism in bone marrow microenvironment niche model. In next step, we will examine the influence for dexamethasone in the co-culture system using 697 and BMSC with various expression of N-cadherin and to study the molecular mechanism.

研究分野：小児白血病

キーワード：小児白血病 白血病微小環境 N-カドヘリン分子

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞の薬剤耐性機序の一つとして、骨髄ニッチの関与が指摘されている。特に、白血病細胞と骨髄ストローマ細胞との細胞間接着に関しては、多くの研究が行われているが、カルシウム依存性細胞接着分子であるカドヘリンに着眼した報告は少ない。

約 20 種類のサブファミリーから構成されるクラシックカドヘリンの一つに N-カドヘリンがある。N-カドヘリンの分布は主に神経及び筋肉細胞とされてきたが、近年、骨髄ストローマ細胞及び造血幹細胞にもその発現が報告された。Zhang らは造血幹細胞の自己複製能を支持するのは骨芽細胞であり、その中でも骨表面に並ぶ N-カドヘリン陽性紡錘形細胞が造血幹細胞と接着し、正常造血幹細胞のニッチを形成していることを報告した (Nature.2003;425:836)。更に、Hosokawa らは造血幹細胞の long-term engraftment には骨髄ニッチにおける N-カドヘリンが不可欠であることを示した (Blood. 2010;116:554)。この骨芽細胞を裏打ちし、かつ同細胞へ分化可能な細胞こそがストローマ細胞である。N-カドヘリンは、近年様々な癌細胞に高発現していることが示され、白血病細胞においても、いくつかの報告が散見される。また、マウスモデルにおいて N-カドヘリンを発現するフィラデルフィア陽性リンパ性白血病細胞株を mouse embryonic fibroblast と共培養すると、白血病細胞株に薬剤耐性が生ずることが報告されている。一方、急性骨髄性白血病 (AML) に関しては、成人 AML 初発時及び治療後骨髄検体における N-カドヘリン蛋白の発現変化をフローサイトメトリーで検討し、初発時検体では CD34+/CD38-/CD123+/N-カドヘリン+分画を 0~49.8%に認め、その頻度は予後不良染色体異常を有する群で有意に高く、治療抵抗群では治療後検体で同分画の増加を認めた (Cancer letter. 2010 ;296:65)。これらの報告から、急性白血病細胞と骨髄ストローマ細胞とが接着することで誘導される薬剤耐性機構に N-カドヘリン分子が関与することが示唆される。

2. 研究の目的

ヒト白血病細胞 骨髄ストローマ細胞間に形成される白血病微小環境において、N-カドヘリン分子がヒト白血病細胞の薬剤耐性機序に関与するか否かについて、遺伝子改変細胞を用いて研究することとした。

3. 研究の方法

白血病微小環境における N-カドヘリンの意義を “in vitro ヒト白血病微小環境モデル” を用いて検討する。すなわち、白血病骨髄微小環境にはヒト骨髄由来不死化ストローマ細胞株を用い、急性白血病細胞との共培養で、migration、leukemic cell adhesion 及び cytotoxicity assay を行う。N-カドヘリン分子機能解析には、N-カドヘリン中和抗体、レトロウイルス遺伝子改変技術によ

る N-カドヘリン蛋白発現レベルの異なる細胞株、N-カドヘリン発現抑制薬剤を用いて検証する。その他、N-カドヘリン関連細胞内シグナル伝達分子の発現は RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、FACS、免疫染色及び共焦点レーザー顕微鏡で、細胞形態変化は倒立型顕微鏡で検討する。

4. 研究成果

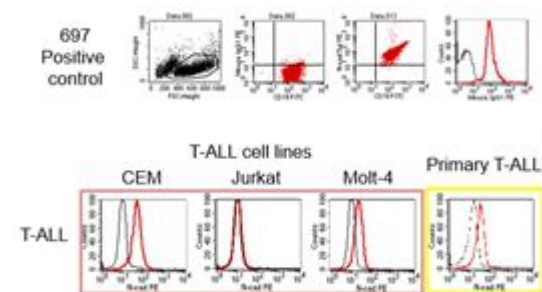
(1) 白血病における N-カドヘリン分子の発現

ヒト白血病細胞株における発現 (RT-PCR) : 急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞株 6 種類 (OP-1,380,NaIm6, RS4;11,REH,697) と急性骨髄性白血病細胞株 3 種類 (U937,KG1,KG-1a) を用いて RT-PCR にて N-カドヘリンの発現を検討したところ、ALL では 697 で、AML では KG1、KG1a でその発現を認めた。

小児急性リンパ性白血病細胞における発現 (RT-PCR) :

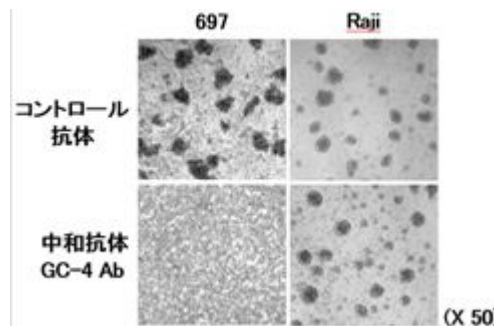
小児急性リンパ性白血病初発時 15 検体においては、強弱はあるものの、9 検体 = 60%において N-カドヘリンの発現を認めた。これは、米国 St. Jude こども病院の公開するデータベースより高頻度であった。

ヒト白血病細胞株及び小児急性リンパ性白血病における発現 (FACS) :



上記図の上段に示すように、697 細胞株では N-カドヘリンの発現が蛋白レベルでも明瞭に確認でき、T-ALL においては、CEM 及び Molt4 細胞株に加え初発時の 1 検体においても、蛋白レベルでの発現を認めた。

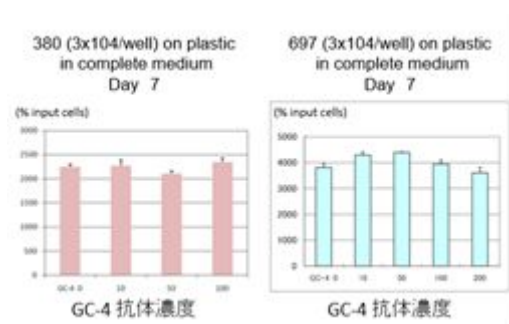
(2) N-カドヘリンブロッッキング抗体による細胞接着への影響 :



697 細胞株と他の細胞塊をつくって増殖する N-カドヘリン非発現 Raji 細胞株を用いて、N-カドヘリン中和抗体 (GC-4) の効果を検討した。中和抗体を培養液に添加すると、697 細胞株においてのみ、特異的に細胞接着が阻害された。すなわち、GC-4 中和抗体は、N-

カドヘリン間の接着を阻害する効果を持ち、697 細胞株では同分子間での接着が主であることが示唆された。

(3) N カドヘリンブロッキング抗体による細胞増殖への影響：



N カドヘリン分子発現のない 380 (小児 ALL 細胞株) 及び 697 細胞株の培養液に、中和抗体 GC-4 を添加した。しかし高濃度であっても抗体自体が細胞増殖に影響することは認めなかった。

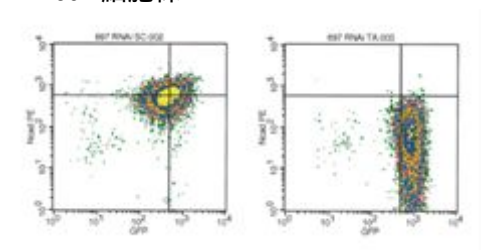
(4) 697 細胞株の抗がん剤感受性に対する N カドヘリンブロッキング抗体の影響：

ALL 治療薬として広く使用されているステロイド、L-asparaginase, Vincristine, Methotrexate を本研究の試験薬として用いた。各薬剤の添加濃度は、697 細胞株に対する IC50 で実施した。興味深いことに、N-カドヘリン中和抗体添加により感受性が増したのは、ステロイドのみであった。

(5) N カドヘリン分子ノックダウンの細胞株の樹立：

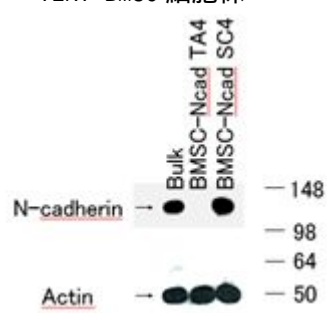
siRNA を用いて、N カドヘリンを強発現する ALL 及び BMSC 細胞株から同分子を恒久的にノックダウンした細胞株を樹立した。

697 細胞株



ウイルスベクターはレトロウイルスベクターを用いて、遺伝子改変細胞株の樹立を試みた。その結果、上図左は Scramble 配列を組み込んだ 697 細胞株で、縦軸に示す N-カドヘリンの発現は高いままであった。しかし、右のように、Target 配列を組み込んだ siRNA 細胞では N-カドヘリンの発現が著しく低下した。尚、当初、siRNA 細胞株での N-カドヘリンの発現が戻ることを繰り返したため、single cell sorting など工夫を加え、樹立するのに 1 年以上の時間を要した。

TERT-BMSC 細胞株



同様に、TERT にて不死化したヒト骨髄由来ストローマ細胞 (BMSC) に、遺伝子改変を加えた。上図は遺伝子改変 BMSC の N カドヘリン蛋白発現をウエスタンブロットで確認したものである。確かに、Target 配列を組み込んだ siRNA BMSC-Ncd TA4 では N - カドヘリン発現が完全に低下していることが示された。これらを 2 年以上継体培養しても、その発現が回復しないことも確認した。

本研究期間においては、ここまでの結果に留まった。

しかし (4) の結果からも、骨髄ニッチにおける薬剤 (特にステロイド) 耐性の獲得に N カドヘリンが一役を担っている可能性が示唆されており、今後は (5) で樹立した細胞株で検証することとする。

また、当初研究計画にあげていた白血病の中枢神経浸潤における検証もできなかったが、siRNA 方法を用いてヒト脳由来微小血管内皮細胞 (HBMEC) でも検証する。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

- Huang M, Inukai T, Miyake K, Tanaka Y, Kagami K, Abe M, Goto H, Minegishi M, **Iwamoto S**, Sugihara E, Watanabe A, Somazu S, Shinohara T, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K. Clofarabine exerts antileukemic activity against cytarabine-resistant B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with low deoxycytidine kinase expression. *Cancer Med.* 2018;7(4):1297-1316. (査読有)
- Shimada A, Iijima-Yamashita Y, Tawa A, Tomizawa D, Yamada M, Norio S, Watanabe T, Taga T, **Iwamoto S**, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H,

- Kosaka Y, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Tanaka S, Adachi S. Risk-stratified therapy for children with FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: results from the JPLSG AML-05 study. *Int J Hematol*. 2018;107(5):586-595. (査読有)
3. Huang M, Inukai T, Kagami K, Abe M, Shinohara T, Watanabe A, Somazu S, Oshiro H, Goi K, Goto H, Minegishi M, **Iwamoto S**, Urayama KY, Sugita K. Splicing variant profiles and single nucleotide polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in relation to glucocorticoid sensitivity of B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol*. 2018;36(1):245-251. (査読有)
  4. Takahashi K, Inukai T, Imamura T, Yano M, Tomoyasu C, Lucas DM, Nemoto A, Sato H, Huang M, Abe M, Kagami K, Shinohara T, Watanabe A, Somazu S, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Kikuchi J, Furukawa Y, Goto H, Minegishi M, **Iwamoto S**, Sugita K. Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188680. (査読有)
  5. Nakayama H, Tomizawa D, Tanaka S, **Iwamoto S**, Shimada A, Saito AM, Yamashita Y, Moritake H, Terui K, Taga T, Matsuo H, Kosaka Y, Koh K, Hosoi H, Kurosawa H, Isoyama K, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Iudarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor and idarubicin for relapsed childhood acute myeloid leukemia. *ediatr Int*. 2017;59(10):1046-1052. (査読有)
  6. Huang M, Miyake K, Kagami K, Abe M, Shinohara T, Watanabe A, Somazu S, Oshiro H, Goi K, Goto H, Minegishi M, **Iwamoto S**, Kiyokawa N, Sugita K, Inukai T. Lack of association between deletion polymorphism of BIM gene and in vitro drug sensitivity in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2017;60:24-30. (査読有)
  7. Moritake H, Tanaka S, Nakayama H, Miyamura T, **Iwamoto S**, Shimada A, Terui K, Saito A, Shiba N, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Goto H, Hasegawa D, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Outcome of relapsed core binding factor acute myeloid leukemia in children: A result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05R study. *ediatr Blood Cancer*. 2017;64(10). (査読有)
  8. Yamada A, Moritake H, Kinoshita M, Sawa D, Kamimura S, **Iwamoto S**, Yamashita Y, Inagaki J, Takahashi T, Shimada A, Obara M, Nunoi H. Relapsed childhood acute myeloid leukemia patient with inversion of chromosome 16 harboring a low FLT3 internal tandem duplication allelic burden and KIT mutations. *ediatr Int*. 2016;58(9):905-908. (査読有)
  9. Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, **Iwamoto S**, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita

- H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. Br J Haematol. 2016;174(3):437-43. (査読有)
10. Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, **Iwamoto S**, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. Pediatr Blood Cancer. 2016;63(2):248-54. (査読有)
11. Tomizawa D, Watanabe T, Hanada R, Horibe K, Horikoshi Y, **Iwamoto S**, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent patients with acute myeloid leukemia treated with pediatric protocols. Int J Hematol. 2015;102(3):318-26. (査読有)
12. Shankar V, Hori H, Kihira K, Lei Q, Toyoda H, **Iwamoto S**, Komada Y. Mesenchymal stromal cell secretome up-regulates 47 kDa CXCR4

expression, and induce invasiveness in neuroblastoma cell lines. PLoS One. 2015;10(3):e0120069. (査読有)

〔学会発表〕(計0件)  
該当なし

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
該当なし

出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
岩本 彰太郎 (IWAMOTO, Shotaro)  
三重大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 20456734

(2)研究分担者  
平山 雅浩 (HIRAYAMA, Masahiro)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 90293795

(3)連携研究者  
(該当者なし)

(4)研究協力者  
(該当者なし)