

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19543

研究課題名(和文) 難治性白血病の病態解明 (Notchシグナルによる白血病抑制機構の破綻)

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological mechanism in refractory leukemia,

研究代表者

加藤 貴康 (KATO, Takayasu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20646591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「血液がん」である急性骨髄性白血病は、標準治療により約40%の治癒が望まれる。残り60%に相当する難治性白血病を克服するためにさらなる病態解明が必要である。我々は血液細胞の発生・分化・および癌化等にかかわるNOTCHシグナルに注目して研究を行い、NOTCHシグナルが急性骨髄性白血病を抑制している事を発見した(Leukemia, 29:576-85, 2015)。また白血病本体ではなく白血病支持細胞自身もNOTCHシグナルにより白血病細胞を抑制していることを発見した。これは白血病細胞と造血環境との相互作用を示す重要な結果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia, "blood cancer", is expected to cure by about 40% with standard therapy. To overcome the remaining 60% refractory leukemia, it is necessary to elucidate further pathological mechanism. We focused on the NOTCH signaling, which is important for cell differentiation during embryonic and adult life, and dysregulated in many cancers. We found that the NOTCH signaling suppresses acute myeloid leukemia. We also discovered that bone marrow stromal cells also suppresses leukemic cell development through the NOTCH signaling. This is considered to be an important result showing the interaction between leukemic cells and the hematopoietic environmental cells.

研究分野：急性白血病

キーワード：NOTCHシグナル 急性骨髄性白血病 造血支持細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本研究課題の研究開始に至るまでの流れ

NOTCH シグナルは細胞の発生・分化において多彩な機能を有し、T 細胞分化ではもっとも重要なシグナル機構である。T 細胞性急性リンパ性白血病の約 50% に NOTCH の活性化型変異を認めることが 2004 年に報告され、NOTCH シグナルが正常分化と腫瘍化の双方に重要であることが示された。近年になり造血器腫瘍において NOTCH シグナルは腫瘍化と腫瘍抑制の 2 面性を持つことが示され、急性骨髄性白血病(AML)においては NOTCH シグナルが腫瘍抑制的に作用することが明らかになった。

### (2) 国内・国外からの研究動向及び位置づけ

慢性骨髄単球性白血病 (CMML) では NOTCH シグナルの複数の遺伝子 (Nicastrin, APH1A, MAML1, NOTCH2) に機能抑制型と考えられる変異を認め、造血細胞での Nicastrin 欠損マウスや Notch1/Notch2/Notch3 欠損マウスは CMML 様の病態を発症することが報告された (文献 1)。2013 年に NOTCH シグナルが AML に対して腫瘍抑制的に働くとの報告がなされた (文献 2,3)。しかしながら、NOTCH シグナルによる白血病抑制の機序は不明であり、NOTCH シグナルを用いた新規白血病治療を開発するため、詳細な白血病抑制機構の解明が必要であった。また 2014 年に造血支持細胞における Notch 欠損マウスが骨髄増殖性疾患を発症することが報告された (文献 4)。NOTCH シグナルが造血細胞および造血支持細胞の双方に腫瘍抑制的に働く事が示唆された。

### (3) Notch-Hes1 経路の急性骨髄性白血病制御機構の解明における申請者の研究状況

#### <AML と Notch-Hes1 の研究のはじまり>

申請者のグループは、約 18 年にわたり造血器における NOTCH シグナルにつき研究を行ってきた。2010 年には骨髄球系前駆細胞において Hes1 (NOTCH シグナルの下流の転写因子)

を活性化すると、骨髄球系前駆細胞は未分化な芽球様の形態を維持して不死化することを見いだした。また白血病融合遺伝子である BCR-ABL と Hes1 を骨髄球系前駆細胞へ導入しマウスへ移植したところ白血化を観察した。この結果は慢性骨髄性白血病の急性転化において Hes1 と BCR-ABL の協調的発現が重要であることを示唆している。申請者は大学院在学時から NOTCH シグナルの造血幹細胞制御と白血病制御について研究に取り組み、AML での NOTCH シグナルの役割を解明するため、NOTCH シグナルの重要な標的転写因子である RBPJ と Hes1 のノックアウトマウスからそれぞれ骨髄球系前駆細胞を単離し、白血病融合遺伝子 MLL-AF9 を導入した AML マウスモデルを作製した。この白血病モデルでは RBPJ 欠損および Hes1 欠損マウスは早期に白血病を発症し死亡した (図 1)。つまり

Notch-RBPJ-Hes1 経路が AML で腫瘍抑制機構として働く事を見いだした。また NOTCH シグナルを過剰発現させた白血病マウスモデルについて解析したところ、白血病発症までの期間が遅れる事を確認した。

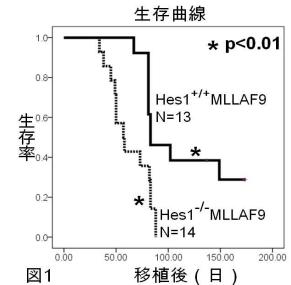


図1

(文献 5, Kato et al. 2015)

## 2. 研究の目的

AML は標準的な治療により約 40% の治癒が望まれる。しかし残りの 60% に相当する難治性白血病に関してはさらなる病態解明が白血病を克服するために必要である。申請者は NOTCH シグナルが AML に対し腫瘍抑制的に働く事を難治性白血病マウスモデルにて報告した。本研究では、マウス白血病モデルとヒト白血病検体を用いて、NOTCH シグナルによる白血病抑制機構の破綻について、造血支持細胞の NOTCH シグナルの発現異常に焦点を絞

り解析を行う。そして NOTCH シグナルの活性化による腫瘍抑制効果を期待した治療法の開発を目指し、難知性白血病の克服を最終目標とする。

#### **Notch-Hes1 経路のターゲットを同定**

Notch-RBPJ-Hes1 経路の下流ターゲットの探索のため野生型と Hes1 欠損白血病マウスから骨髓を採取し、マイクロアレイにて網羅的解析を行い、ターゲット候補遺伝子を複数同定している。白血病細胞株でこれらの遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて、個別に、または複数を同時に欠損させることで、NOTCH シグナルの白血病抑制機構への影響を詳細に解析する。

#### **NOTCH シグナルによる白血病抑制機構の破綻はなぜ起こるか**

AML では Notch シグナルが不活性化している。この不活性化のメカニズムとして以下の 3 つの機序が考えられる。

- # 1 Absence of NOTCH signaling in Niche
- # 2 Gene mutations of Notch pathway
- # 3 Epigenetic silencing of Notch pathway genes

上記の仮説のうち、今回の研究では # 1 に焦点をあて研究を行い、NOTCH シグナルによる白血病抑制機構の破綻の機序を明らかにする。申請者グループは NOTCH シグナル以外に TET2 を中心とした Epigenetics におけるリンパ腫の研究を行っており、血管免疫芽球性リンパ腫では Tet2 と RhoA の変異が発症に必要であることを報告した（文献 6）。また年齢依存的に Tet3 の発現量が変化することを見出した。上記研究の発展として、AML において、加齢に伴い Niche 細胞（造血支持細胞）の epigenetics 制御が変化し、Niche 細胞での Notch ligand の発現が低下する事で NOTCH シグナルが不活性化する。また加齢に伴い変異を持った造血細胞が増え、変異を持った造血

細胞に Niche 細胞からの NOTCH シグナルによる腫瘍抑制が働かなくなり白血病が発症するという仮説を考えている。

### 3 . 研究の方法

#### **(1) Notch-Hes1 経路による MLL-AF9 急性骨髄性白血病抑制機構の解明**

マイクロアレイにより Hes1 の下流遺伝子候補を同定し、それらの候補遺伝子をゲノム編集ツールである CRISPR/CAS9 システムを用いて複数を同時にノックアウトさせ、Notch-Hes1 経路の腫瘍抑制機構を検討した。

#### **(2) ヒト急性骨髄性白血病での造血支持細胞における Notch リガンドの発現レベルの解析**

AML 患者検体につき Notch リガンドの発現につき検討した。マウスで得られた知見がヒト AML 検体で実際に重要であるかにつき検討を行った。ヒト AML 検体の使用に関して、平成 26 年度中に筑波大学の倫理委員会と JALSG を通じて各施設の倫理委員会の承諾を得た。AML 検体（約 200 検体）について Real time PCR やフローサイトメトリーを用いて、NOTCH リガンドや NOTCH 下流遺伝子の発現レベルと予後につき検討した。

#### **(3) NOTCH シグナルによる白血病抑制機構の破綻はなぜ起こるか**

癌遺伝子(AML1-MTG8)をマウス造血細胞に導入し、造血支持細胞の NOTCH リガンド欠損マウス(DLL4f/f マウス)や RBPJ 欠損マウスに移植することで NOTCH シグナルの破綻による白血病発症の有無につき検討した。

マウス白血病モデルでの実験：

我々は癌遺伝子をレトロウイルスにて導入した造血幹細胞および骨髓球系前駆細胞を放射線照射マウスに移植する、マウス白血病モデルの系を確立している。さらに経時的な採血、末梢血や骨髓のサイトスピン、フローサイトメトリーなどにより白血病の発症について観察する。仮説における変異を持った造血細胞として、白血病融合遺伝子である

AML1-MTG8 をレンチウイルスもしくはレトロウイルスで造血細胞に導入した細胞を使用する。AML1-MTG8 導入 LSK 細胞 (造血幹細胞分画を含む細胞) は、サイトカインである IL3 存在下では Vitro で不死化する。また AML1-MTG8 導入細胞を正常マウスに移植した際に、1 年以上に渡り白血病を発症しない事は確認済みである。造血支持細胞において NOTCH リガンドや NOTCH シグナルの中樞をなす転写因子である RBPJ をノックアウトしたマウス (DLL1f/f マウス、DLL4f/f マウスや RBPJf/f マウスに造血支持細胞特異的な Cre マウスを交配させる) に AML-MTG8 導入細胞を移植し、造血細胞と造血支持細胞の双方の異常が白血病発症機構に関わるかどうかにつき観察する。

#### 4. 研究成果

##### 1. Notch-Hes1 経路による MLL-AF9 急性骨髄性白血病抑制機構の解明

Hes1 の下流ターゲットを同定するため、Hes1 欠損白血病マウス骨髄と Hes1 野生型白血病マウス骨髄を採取し、マイクロアレイを施行した。Hes1 欠損マウスではチロシンキナーゼ受容体である Flt3 の発現が有意に上昇しており、ウェスタンブロット法により FLT3 のリン酸化が Hes1 欠損細胞で亢進している事を確認した。また CHIP アッセイにより Hes1 が直接 Flt3 のプロモーターに結合することで、Flt3 の発現を制御していることを示した。

次にゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムを用いて、Hes1 欠損白血病細胞株において Flt3 を欠損させると、白血病細胞株の増殖能が有意に低下することを確認した。

Hes1 欠損白血病マウスの骨髄から Flt3 陽性白血病細胞と Flt3 陰性白血病細胞を分離し、それぞれの細胞を用いて継代移植を行うと、10000 細胞を移植した際には白血病発症において有意差を認めなかったが、1000 細胞および 100 細胞を移植した際には Flt3 陽性白血病細胞を移植した群が早期に白血病を

発症し死亡した。これらの結果から NOTCH シグナルが白血病幹細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。

##### 2. ヒト急性骨髄性白血病での造血支持細胞における NOTCH リガンドの発現レベルの解析

JALSG を通じて各施設の倫理委員会の承諾を得た AML 残余検体 (cDNA、約 200 検体) について Real time PCR を用いて、NOTCH 下流遺伝子である Hes1 の発現レベルと予後につき検討を行った。約 200 症例の残余検体の内、cDNA 量が十分あり、Real time PCR での発現解析が可能であった症例が少なかったことから、十分な予後解析ができなかった。現在筑波大学附属病院において急性骨髄性白血病の長期保存および遺伝子発現解析の同意が得られている骨髄検体について、Hes1 の発現レベルの解析と予後につき追加で検討を行っている段階である。

##### 3. NOTCH シグナルによる白血病抑制機構の破綻はなぜ起こるか

これまでの申請者の研究から AML に対して NOTCH シグナルは腫瘍抑制的に働くと考えられる (文献5, Kato et al. 2015)。AML では、微小環境との相互作用という視点では目立った研究報告がなされていない。申請者らは骨髄ストローマ細胞において、NOTCH シグナルが造血に影響を与えるという知見 (文献2) に基づき、骨髄ストローマ細胞における NOTCH シグナル減弱が AML に与える影響について検討した。NOTCH シグナルの重要なメディエーターである転写因子 RBPJ をノックアウトした RBPJ 欠損造血支持細胞と AML 細胞を共培養すると、白血病細胞の増殖が促進することを確認した。次に RBPJ 欠損マウス (造血支持細胞で RBPJ 欠損) もしくは RBPJ 野生型マウスに白血病融合遺伝子を導入した造血細胞を移植すると、RBPJ 欠損マウスが早期に死亡することを確認した。AML1-MTG8 融合

遺伝子導入造血細胞を野生型マウスに移植してもAMLを発症しないが、骨髄ストローマ細胞でNOTCHシグナルが抑制されたホストマウスに移植することで、急速にAMLを発症することを発見した(図2 未発表)。これはAMLにおける、腫瘍細胞と微小環境との相互作用仮説を示す重要な結果といえる。骨髄ストローマ細胞でのNOTCHシグナルの減弱は何らかの炎症状態を励起している可能性が高い(文献4)。一方AML1-MTG8融合たんぱく質は腫瘍細胞内でNF- $\kappa$ Bシグナルを活性化しているとの報告(文献7)もあることから、腫瘍細胞と微小環境細胞との特異的な相互作用が発生している可能性も想像される。現在は移植マウスの死因の詳細な解析と、NOTCHシグナルによる白血病抑制に重要な造血支持細胞の分子メカニズムの同定を行っている。またヒトAML骨髄から造血支持細胞をソートし、分解する方法の樹立おこなっている。

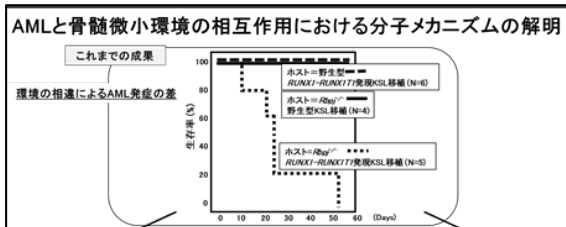


図2

参考文献:

- 1) Nature. 473:230-3, 2011, 2) JEM. 210:201-19, 2013, 3) JEM. 210:321-37, 2013, 4) Cell Stem Cell. 15:51-65, 2014, 5) Leukemia, 29:576-85, 2015(申請者発表), 6) Nature genetics. 46:171-75, 2014(申請者グループ発表), 7) Blood, 15;118(25): 6626-37, 2011

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5件)

1. Naoki Kurita, Masahiko Goshō, Yasuhisa Yokoyama, Takayasu Kato,

Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Y, Yuichi Hasegawa, Naoyuki Uchida, Satoshi Takahashi, Yasuji Kouzai, Yoshiko Atsuta, Tatsuo Ichinohe, Francesco Frassoni, and Shigeru Chiba. A phase I/II trial of intrabone marrow cord blood transplantation and comparison of the hematological recovery with the Japanese nationwide database. **Bone Marrow Transplantation**. Vol.(52), 574-79, 2017(査読有) doi:10.1038/bmt.2016.319

2. Sakata-Y M, Yokoyama Y, Muto H, Obara N, Kurita N, Kato T, Hasegawa Y, Miyazaki Y, Kurokawa M, Chiba S. A nationwide survey of co-occurrence of malignant lymphomas and myelodysplastic syndromes/myeloproliferative neoplasms. **Annals of Hematology**. Vol.95(5):829-30, 2016(査読有) doi: 10.1007/s00277-016-2612-3.

3. 千葉 滋, 加藤貴康. ヒストンメチル化酵素DOT1Lの阻害薬によるMLL白血病の治療. **Annual Review 血液 2016**. 中外医学社. 108-111. 2016.(査読無)

4. Takayasu Kato, Mamiko Sakata-Y, Hidekazu Nishikii, Masaya Ueno, Yasuyuki Miyake, Yasuhisa Yokoyama, Yukitsugu Asabe, Yuhei Kamada, Hideharu Muto, Naoshi Obara, Kazumi Suzukawa, Yuichi Hasegawa, Issay Kitabayashi, Kazuhiko Uchida, Atsushi Hirao, Hideo Yagita, Ryoichiro Kageyama, Shigeru Chiba. Hes1 suppresses acute myeloid

leukemia development through FLT3 repression. **Leukemia**. Vol.29 (3), 576-85, 2015. (査読有)  
doi:10.1038/leu.2014.281.

5. 横山 泰久, 柳元 麻実子, 小原 直, **加藤 貴康**, 武藤 秀治, 栗田 尚樹, 真家 紘一郎, 長谷川 雄一, 千葉 滋. 一酸化炭素肺拡散能の血色素量補正法の違いがもたらす HCT-CI 評価の不安定性. **日本造血細胞移植学会雑誌**, 4 巻 4 号, 108-114, 2015. (査読有)  
doi:10.7889/hct.4.108

[学会発表](計2件)

1. **加藤 貴康**. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3. 第 11 回麒麟塾. 2015 年 7 月. コクヨホール. 東京都港区.
2. **加藤 貴康**. Notch-Hes1 シグナルは Flt3 の制御を介して急性骨髄性白血病を抑制する. 第 3 回プリストル血液学アカデミー. 2015 年 9 月. 京王プラザホテル札幌. 北海道札幌市.

[図書](計1件)

6. **加藤 貴康**, 千葉 滋. Notch 遺伝子. **造血器腫瘍アトラス**. 日本医事新報社. 45-51. 2016.

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 貴康 (KATO, TAKAYASU)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 20646591

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

千葉 滋 (CHIBA, SHIGERU)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 60212049