

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08733

研究課題名(和文)慢性骨髄性白血病における炎症性ケモカインCCL3の病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of inflammatory chemokine, CCL3, in chronic myeloid leukemia

研究代表者

馬場 智久 (BABA, Tomohisa)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：00452095

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)：慢性骨髄性白血病(CML)の発症初期の骨髄内において、白血病幹細胞から分化誘導する好塩基球様の白血病細胞が、幹細胞抑制作用を示す炎症性ケモカインCCL3を恒常的に産生し、正常造血幹・前駆細胞の増殖を選択的に抑制することで白血病幹細胞の優先的な増殖、さらにはCML病態の増悪・進展に寄与していることを明らかにした。

この分子・細胞機序の治療標的としての可能性を検討したところ、CML発症初期過程における好塩基球様の白血病細胞の選択的除去、もしくはCCL3阻害剤の投与によって、効果的なCMLの発症予防効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CMLの原因遺伝子である、BCR-ABLに対するチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の開発により、CML患者の生命予後が劇的に改善されている。しかしながら、TKI抵抗性を示す、白血病幹細胞が治療後も残存し、再発の原因となっていることが知られている。本研究で得られた知見を基盤として、正常造血細胞と白血病幹細胞の競合的相互作用を標的とした治療戦略の確立による、CMLの根治を目的とした新たな治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Basophilia is a frequently observed hematological abnormality in chronic myeloid leukemia (CML), but its pathophysiological roles are undefined. In this study, we demonstrated that basophil-like leukemia cells proliferate and constitutively express an inflammatory chemokine, CCL3, in the bone marrow of mice developing CML. Moreover, CCL3 preferentially inhibits the proliferation of normal hematopoietic stem/progenitor cells, thereby facilitating the dominant proliferation of leukemia stem cells during the initiation process of CML development. We further demonstrated that the depletion of basophil-like leukemia cells or the oral-administration of CCL3 inhibitor efficiently prevented the CML development.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 造血幹細胞 炎症性ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (CML) は造血幹細胞 (HSC) レベルにおける骨髄増殖性腫瘍であり、9 番・22 番染色体間での相互転座により生成される BCR-ABL 融合タンパクが示す、恒常的なチロシナーゼ活性による白血病細胞の腫瘍性増殖の主な病因である。悪性転換した HSC は CML 白血病幹細胞 (LIC) として、白血病細胞の腫瘍性増殖を維持し、その起源となっている。

CML 発症の最初期の骨髄では、大多数が正常造血細胞によって占められている中に、ごく少数出現した LIC が、正常造血細胞との競合に打ち勝ち、徐々に造血システムにおいて優位になると考えられる。しかし、正常血液細胞が占有している、限られた骨髄内微小環境において、どのように LIC が優位性を獲得していくかについては明らかになっていない。

研究代表者は、この CML 発症初期過程における細胞間競合的相互作用をより正確に解析するために、従来の X 線照射により正常造血系を破壊してから白血病細胞を移植して CML を発症させる実験モデルを改良し、正常造血系を維持した状態で白血病を発症させる X 線非照射 CML モデルを確立した。さらに、この実験モデルを用いることで、発症初期過程の骨髄内において、LIC から分化するある種の白血病細胞から過剰産生される炎症性ケモカイン CCL3 が、正常な造血幹 / 前駆細胞 (HSPC) を選択的に抑制することで、間接的に LIC の優位的増殖をサポートしていることを明らかにした。しかしながら、CCL3 による HSPC の抑制機構の詳細は不明である上に、CCL3 を主に産生している白血病細胞についても未同定であり、CML 骨髄内における正常・白血病性造血システム間における詳細な競合拮抗メカニズムについては明らかになっていない。

これらの未解明な点を中心として、CML 発症初期過程における CCL3 の骨髄微小環境因子としての役割の解明、さらには CML の治療法への応用の可能性を検討することを目的として本研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的としては、正常マウスと CML マウスの骨髄内において、CCL3 を恒常的に産生している主要な細胞を同定し、同定した細胞、ならびにその細胞から産生される CCL3 が、正常造血細胞に対してどのような生理的、さらには CML 病態生理的な作用を持つのを明らかにすることを中心として研究を遂行した。最終的にはその作用が、骨髄内における細胞間競合的相互作用の本態として、CML 発症・進展過程における LIC の優位的増殖に寄与しているかを検証したうえで、その阻害による CML 治療効果の可能性を検討し、LIC の選択的排除を目的とした新規治療法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) CML 発症過程で観察される CCL3 産生細胞の同定

研究開始時までの観察から、CML 発症過程の骨髄内において、BCR-ABL 陰性正常細胞・陽性白血病細胞画分の両方において、lineage marker<sup>low</sup>c-kit<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>の細胞表面マーカー発現パターンを示す骨髄細胞群において、特異的に CCL3 の発現が認められており、共通に白血球分類される細胞群からの選択的な CCL3 の産生が予想されていた。ただし、CCL3 は分泌系のタンパクであるため、CCL3 陽性細胞を直接分離精製することは困難であった。したがって、以上の細胞表面マーカーの発現パターン (lineage marker<sup>low</sup>c-kit<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>) を示す細胞画分を、骨髄細胞から FACSAria cell sorter を用いて純化した。分離した細胞の形態的特徴から、細胞の種類を予想し、すでに知られている細胞表面マーカーの発現を確認することで CCL3 産生細胞の同定を試みた。

### (2) 正常造血過程における CCL3、ならびに CCL3 産生細胞の生理的作用の解析

(1) の解析から、BCR-ABL 陰性正常骨髄細胞・陽性白血病細胞群ともに、好塩基球に分類される細胞が、共通して CCL3 が恒常的に産生していることが判明した。次に、野生型マウスと CCL3・CCL3 レセプター (CCR1、CCR5) 欠損マウスの生理的な骨髄造血、さらにはそれぞれのマウスから採取した骨髄細胞をドナーとした骨髄移植後の血球再構築過程を比較観察し、正常造血過程における CCL3 の生理的作用を検討した。また、好塩基球特異的にジフテリア毒素受容体を発現させたマウス (MCPT8-DTR マウス) から骨髄細胞を採取し、骨髄移植を行った。移植後、定期的にジフテリア毒素を投与することで好塩基球を排除した時の血液再構築過程が、CCL3 欠損マウスと同様の変化を示すかを検討した。

### (3) CML 発症過程における CCL3、ならびに CCL3 産生細胞の病態生理的作用の解析

MCPT8-DTR マウスから採取した HSPC に BCR-ABL を遺伝子導入して作製した LIC を用いて、X 線非照射 CML モデルを作製した。LIC の移植後、定期的にジフテリア毒素を投与し、LIC から分化・増殖する好塩基球様白血病細胞を選択的に除去し、骨髄内の LIC 数、末梢血白血球数の変動を中心に、CML 発症・進展過程を経過的に観察した。

CCL3 を分子標的とした治療法の検討としては、CCL3 の特異的レセプターの一つである CCR5

との結合阻害剤で、抗 HIV 治療薬としてすでに承認されているマラビロクを経口投与し、CML 発症・進展過程を経過的に観察し、CML 発症予防効果、ならび治療効果を検討した。

### 3. 研究成果

健常マウスの骨髄から純化した lineage marker<sup>low</sup>c-kit<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>の細胞表面マーカー発現パターンを示す、予想される CCL3 産生細胞の形態を観察したところ、軽度に分葉した核と細胞質内に好塩基性の顆粒が認められた。このことから、好塩基球系の細胞である可能性が示唆されたため、好塩基球特異的な細胞表面マーカーFc R1、CD200R3、CD49b の発現を検討した結果、好塩基球であることを同定した。さらに、好塩基球マーカー陽性細胞に焦点を絞り、あらためて CCL3 の発現を健常マウス、CML マウスの骨髄において観察した結果、同様に好塩基球系の細胞が選択的に CCL3 を産生していることが明らかとなった。

CCL3 欠損マウスは、生理的条件下では血液細胞学的異常は認められなかった。一方で、CCL3、CCR1、CCR5 を遺伝子欠損した骨髄細胞をドナーとした骨髄移植を行った結果、末梢血白血球や骨髄内の HSPC が、野生型と比較して過剰に再構築されることを認めた。同様に、骨髄移植後に好塩基球を選択的に除去した場合にも過剰な血球再構築が認められた。さらに、正常 HSPC と好塩基球を共培養した結果、好塩基球から産生される CCL3 依存的に、HSPC の増殖が抑制されたことから、骨髄移植後の血球再構築過程において、骨髄内で分化する好塩基球は、HSPC の過剰な増殖を制御する働きがあることを明らかにした。

X 線非照射 CML モデルを作製し、発症過程の骨髄内を詳細に観察したところ、CML 患者で報告されているとおり、好塩基球様白血病細胞が顕著に増加していた。CML 発症過程において、好塩基球様白血病細胞を選択的に除去すると、末梢血白血球数、脾腫、骨髄内 LIC 数が顕著に減弱し、CML 病態が著明に軽減した。さらに、CCL3 を新たな分子標的とした治療法の確立を目的として、CCL3 と CCR5 の結合阻害剤であるマラビロクを用いた前臨床試験を行った結果、CML 発症前から経口投与することで、明らかな発症予防作用があることを認めた(図1)。

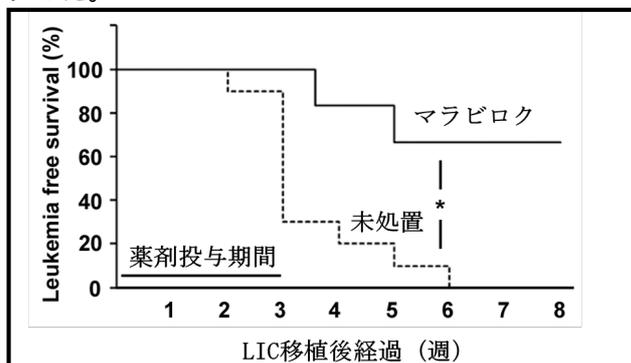


図1. CCL3抑制剤によるCML発症予防効果

これらの結果から、CML 発症過程の骨髄内で、LIC から分化・増殖する好塩基球様の白血病細胞が、CCL3 を恒常的に産生し、正常 HSPC を選択的に抑制することで、結果として LIC が優位に骨髄内で増殖し、CML の発症・進展に重要な役割を担っていると考えられる(図2)。これらの結果は、アメリカ血液学会誌 Blood に報告し(発表論文 3)、CML の新たな治療標的となりうる、白血病・正常造血間における競合的相互作用の解明として世界的に注目されている。

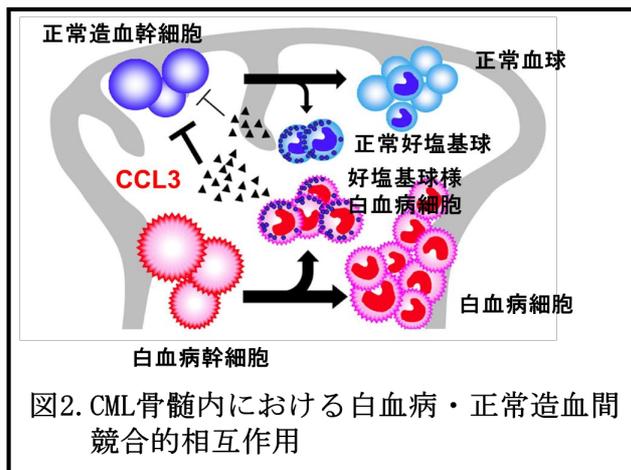


図2. CML骨髄内における白血病・正常造血間競合的相互作用

次に、CML 発症後におけるマラビロク投与による治療効果は限定的であったため、一般的な白血病の根治を目的とした治療法である、骨髄移植療法との併用を検討した。骨髄移植治療の前処置として、異なる線量で X 線を照射し、正常ドナーマウス由来の骨髄細胞を移植し、最適な治療条件の検討を行った結果、予想外にも長期的に CML の再発が認められずに生存したマウスにおいて、正常ドナー細胞から新たに白血病が発症していることを見出した。これらの現象は、臨床的にはドナー細胞由来白血病として報告されているが、実験モデルが開発されておらず、その病態生理については明らかになっていない上に、重症な症例が多いことから、現在临床上大きな問題となりつつある。したがって、本研究課題で最終目標とした、白血病細胞と正常造血細胞との競合的相互作用を標的とした新たな治療法の確立において、正常ドナー骨髄細胞の白血病化の原因解明とその克服は急務であり、新たな研究課題として現在解析中である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

1. Nosaka T., Baba T., Tanabe Y., Sasaki S., Nishimura T., Imamura Y., Yurino H., Hashimoto S., Arita M., Nakamoto Y., Mukaida N.  
Alveolar Macrophages Drive Hepatocellular Carcinoma Lung Metastasis by Generating Leukotriene B<sub>4</sub>.  
J Immunol. 200:1839-1852. 2018. 査読有 doi:10.4049/jimmunol.1700544.
2. Mukaida N., Tanabe Y., Baba T.  
Chemokines as a Conductor of Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia.  
Int J Mol Sci. 18:1824. 2017. 査読有 doi:10.3390/ijms18081824.
3. Baba T., Tanabe Y., Yoshikawa S., Yamanishi Y., Morishita S., Komatsu N., Karasuyama H., Hirao A., Mukaida N.  
MIP-1 /CCL3-expressing basophil-lineage cells drive the leukemic hematopoiesis of chronic myeloid leukemia in mice.  
Blood. 127:2607-17. 2016. 査読有 doi:10.1182/blood-2015-10-673087.

〔学会発表〕(計 7件)

1. 馬場 智久  
慢性骨髄性白血病におけるケモカイン CCL3 を介した正常・白血病性造血間でのクロストーク (指定口演)  
日本病理学会総会 2018年
2. Baba T., Mukaida N.  
Pathological contribution of an inflammatory chemokine CCL3 in chronic myeloid leukemia as a stem cell inhibitor. (指定口演)  
5th Annual meeting of the international cytokine and interferon society 2017年
3. Baba T., Tanabe Y., Mukaida N.  
CCL3-expressing basophil-like leukemia cells drive leukemia-tropic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia  
日本癌学会学術総会 2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

発明者: 馬場智久, 向田直史

発明の名称: 慢性骨髄性白血病治療剤及び該治療剤をスクリーニングする方法

特願2016-25365

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/bunsiseitai/JapContent.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 向田 直史

ローマ字氏名: Mukaida Naofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。