

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07227

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体によるPh陽性白血病幹細胞の制御

研究課題名(英文) Regulation of Ph-positive leukemia stem cells by glutamate receptors

研究代表者

岡部 聖一 (Okabe, Seiichi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40366109

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: chronic myeloid leukemia)は、多能性造血幹細胞の異常によって発症する、骨髄増殖性腫瘍である。Ph陽性白血病の予後は、ABL阻害薬の登場により劇的に改善した。しかし、ABL阻害薬の中止により、再発する症例が存在する。この原因として、ABL阻害薬に耐性の白血病幹細胞の存在が考えられている。他のがん細胞などで、グルタミン酸の受容体の発現の亢進が報告されている。本研究では、Ph陽性白血病由来iPS細胞を作成し、グルタミン酸受容体の発現が亢進していた。またABL阻害薬の耐性細胞を樹立しており、個々の耐性細胞に対して、マイクロアレイによる解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性骨髄性白血病の予後は、ABL阻害薬の登場により劇的に改善した。しかし、分子遺伝学的完全寛解に入った症例でも、薬剤の中止により、再発する症例が多数存在する。この原因として、ABL阻害薬に耐性の白血病幹細胞が骨髄内で残存し、ABL阻害薬治療中止後、白血病細胞を供給することがその原因と考えられている。本研究では、Ph陽性白血病由来iPS細胞を作成した。このiPS細胞は正常細胞と比較して、グルタミン酸受容体の発現が著明に亢進していることを確認した。またABL阻害薬(イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボナチニブ)の耐性細胞を樹立しており、個々の耐性細胞に対して、マイクロアレイによる解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder caused by the breakpoint cluster-Abelson (BCR-ABL) oncogene, and is characterized by the presence of the Philadelphia (Ph) chromosome within hematopoietic stem cells. ABL tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have improved the survival of CML patients. ABL TKIs do not eliminate the leukemia stem cells (LSCs), which may represent the most important event in leukemia relapse after TKI discontinuation. Glutamate receptor subunits are expressed in a variety of cancer cell lines. We found expression of glutamate receptor is increased CML ips cells. We established a new ABL TKI-resistant CML-like K562 cell lines and analyzed the drug sensitivity by microarray.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：分子標的

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (CML: chronic myeloid leukemia) は、多能性造血幹細胞の異常によって発症する、骨髄増殖性腫瘍である。90%以上の症例に9番と22番染色体の相互転座 t(9; 22) である、フィラデルフィア染色体が認められる。その際に形成される、BCR-ABL1 遺伝子が CML の発症に関与している。BCR-ABL1 遺伝子にコードされる、BCR-ABL チロシンキナーゼタンパクにより、細胞増殖、アポトーシスの抑制があり、Ph 陽性細胞が無秩序に増殖する。イマチニブをはじめとした BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害薬により、治療に至る症例が存在すること、また治療においても骨髄中に腫瘍細胞が残存することが示された。Ph 陽性白血病の予後は、ABL 阻害薬により改善した。しかし、ABL 阻害薬に耐性の白血病幹細胞により、再発する症例が多数存在する。造血幹細胞は、多分化能や自己複製能を維持しており、骨髄中のニッチと呼ばれる特別な微小環境に存在し、幹細胞の特性や生存が維持されている。がん細胞においても幹細胞の性質を持った少数のがん細胞が存在し、ニッチにみられることが示唆されている。CML を含む、Ph 陽性白血病においても、白血病幹細胞の存在が示されており、少数の自己複製能を有する白血病幹細胞が、大多数の有限の分裂能しか持たない、白血病細胞を供給する、幹細胞システムが形成されていると考えられている。よって残された課題は、骨髄に残存する、白血病幹細胞をいかに制御して、真の治療に向けた治療法を確立することである。グルタミン酸は、中枢神経系の主要な神経伝達物質であるが、Ph 陽性白血病幹細胞の維持と発症に関して、グルタミン酸経路の役割はいまだに明らかではない。

### 2. 研究の目的

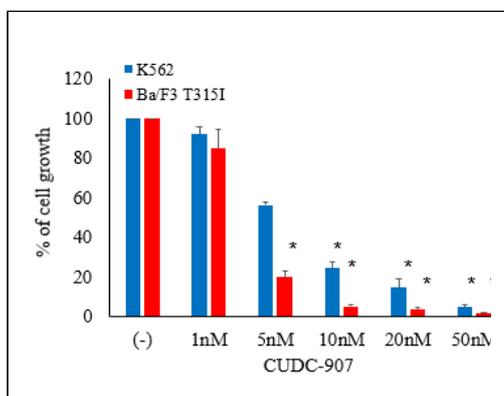
本研究計画では、Ph 陽性白血病細胞の進展、再発に深く関与する、白血病幹細胞からグルタミン酸受容体の探索を行う。幹細胞の同定には、患者サンプルを用いた、白血病細胞の表面抗原による分離、さらに iPS 細胞の作成による、細胞内分子の比較検討を行う。細胞死の抑制とシグナル経路を検証し、Ph 陽性白血病における白血病幹細胞の機能を分子・細胞レベルで明らかにし、Ph 陽性白血病幹細胞に対する創薬をめざすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

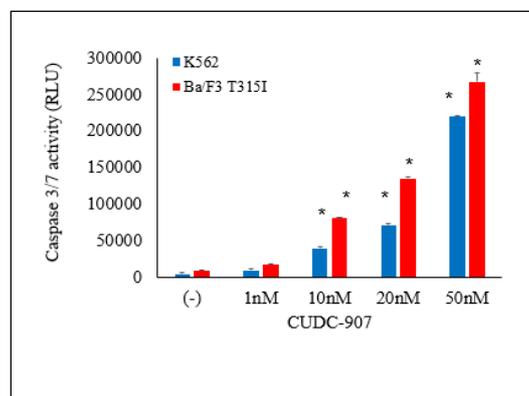
患者検体より、CD34 陽性 CD38 陰性分画の細胞について、ソーティングする。希釈後、シングルセルにする。細胞をフィーダー細胞下で、グルタミン酸受容体阻害薬を添加した群、グルタミン酸投与群に分けて、それぞれ培養を行う。得られた細胞は、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR 法、イムノプロット法などにより、フェノタイプの変化を解析する。また新規の薬剤の感受性についてスクリーニングを行う。次に ABL 阻害薬 (イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ポナチニブ) のそれぞれに耐性の Ph 陽性細胞株 (K562imatinib-R: イマチニブ 5 $\mu$ M 耐性、K562nilotinib-R: ニロチニブ 2 $\mu$ M 耐性、K562dasatinib-R: ダサチニブ 1 $\mu$ M 耐性、K562ponatinib-R: ポナチニブ 50nM 耐性) を樹立している。これらの培養細胞を用いて、グルタミン酸受容体の発現の有無、新規薬剤の感受性について検索した。

### 4. 研究成果

我々は、Ph 陽性白血病由来 iPS 細胞を作成した。この iPS 細胞は正常細胞と比較して、グルタミン酸受容体の発現が亢進していることを確認した。また ABL 阻害薬 (イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ポナチニブ) のそれぞれに耐性の Ph 陽性細胞株 (K562imatinib-R: イマチニブ 5 $\mu$ M 耐性、K562nilotinib-R: ニロチニブ 2 $\mu$ M 耐性、K562dasatinib-R: ダサチニブ 1 $\mu$ M 耐性、K562ponatinib-R: ポナチニブ 50nM 耐性) を樹立し、それぞれマイクロアレイにより、グルタミン酸経路の検索を行った。また新規分子標的薬による抗腫瘍効果について検討した。PI3K と HDAC 阻害薬である、CUDC-907 により、Ph 陽性白血病細胞で抗腫瘍効果がみられた (図 1、2)。

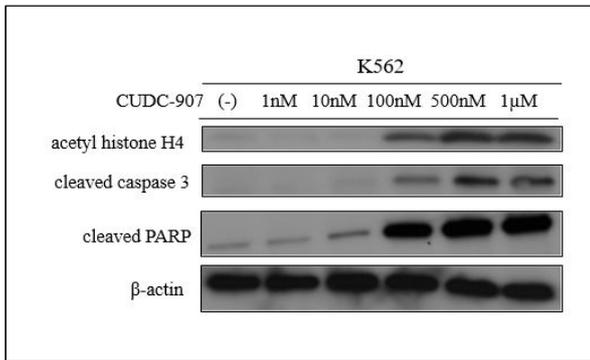


(図 1: CUDC-907 による増殖抑制効果)

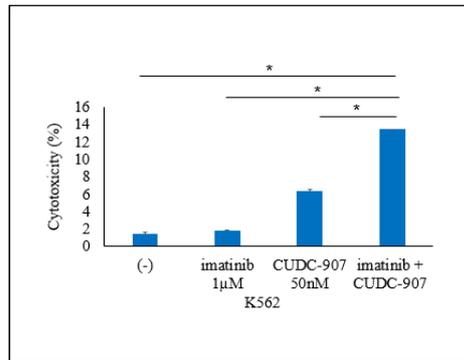


(図 2: CUDC-907 による caspase3/7 の活性化)

また CUDC-907 の投与により、ヒストン H4 のアセチル化、caspase 3 の活性化が確認された (図 3)

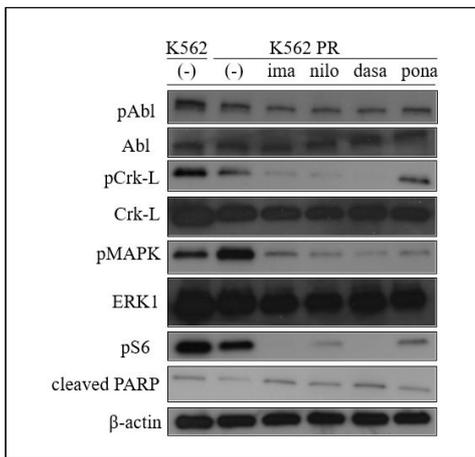


(図3 イムノプロットによる CUDC-907 の効果)

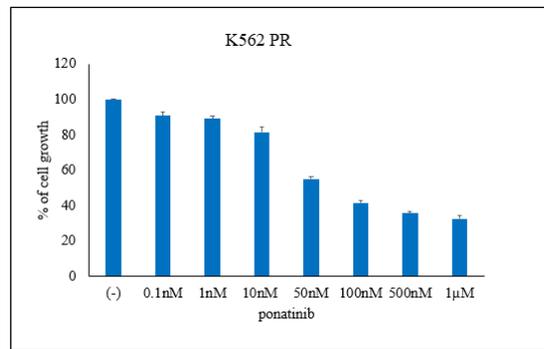


(図4 ABL 阻害薬と CUDC-907 の併用効果)

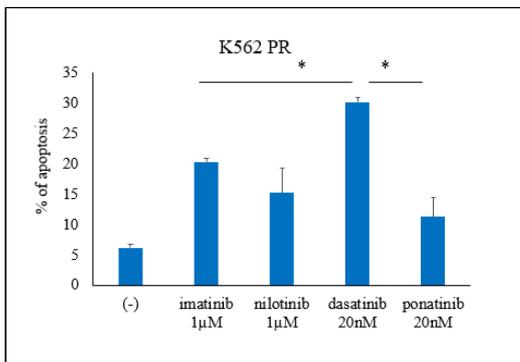
CUDC-907 と ABL 阻害薬の併用により、増殖阻害効果が増強した(図4)。以上より、ABL 阻害薬と CUDC-907 の併用は Ph 陽性白血病細胞に有効であることが示された。またポナチニブ耐性細胞株の解析を行った。ポナチニブ耐性細胞株はポナチニブや他の ABL 阻害薬であるニロチニブに対し、高度耐性であった(図5、6)。ところが ABL 阻害薬の一つである、ダサチニブには感受性があることが明らかとなった(図7)。



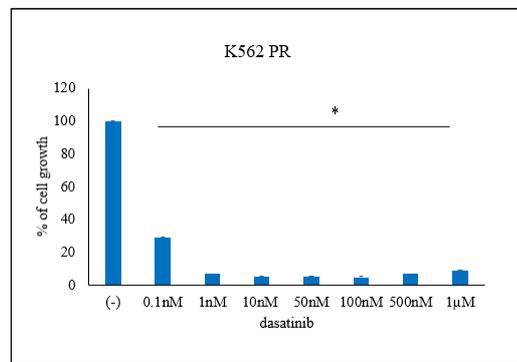
(図5 ポナチニブ耐性細胞株の性状)



(図6 ポナチニブ耐性株の増殖抑制効果)



(図7 ポナチニブ耐性細胞株に対するダサチニブの効果)



以上より、ポナチニブ耐性細胞株に対してダサチニブが有効であることが示され、論文として報告を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okabe S, Tanaka Y, Moriyama M, Gotoh A.	4. 巻 85
2. 論文標題 Effect of dual inhibition of histone deacetylase and phosphatidylinositol-3 kinase in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 401-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-019-04022-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okabe S, Tanaka Y, Moriyama M, Gotoh A.	4. 巻 61
2. 論文標題 Efficacy of dasatinib against ponatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 237-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10428194.2019.1660971.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片桐 誠一郎 (Katagiri Seiichiro) (50532298)	東京医科大学・医学部・助教  (32645)	