

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09005

研究課題名(和文)急性白血病の幹細胞を根絶する分子標的薬の効果を予測するコンパニオン検査法の開発

研究課題名(英文) Companion Diagnostics to predict the effects of molecularly-targeted drugs on acute leukemia stem cells

研究代表者

東田 修二 (Tohda, Shuji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：急性白血病細胞におけるNOTCH、Hedgehog、BMI1、HIF、MERTKなどの種々の幹細胞制御シグナルの、細胞増殖における意義、その阻害剤添加による細胞増殖の抑制効果を示した。また、シグナル蛋白の発現と活性、標的遺伝子の発現の解析により、阻害剤の効果の分子機序を明らかにした。この効果が off-target ではないことを示すため、阻害剤の対象となる蛋白を産生する遺伝子をノックダウンして、同様の効果が見られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、白血病幹細胞の分子病態の一部を明らかにするとともに、将来の白血病臨床において、白血病の幹細胞性を抑制する効果を示した阻害剤(低分子化合物)が、急性白血病に対する新たな分子標的治療薬の候補となる可能性があることを示した。さらに、どのような解析をすれば、その効果が予測できるかを明らかにしたことで、その阻害剤が標的薬となった際の、コンパニオン診断検査として用いることのできる検査法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the significance of stemness-related signaling molecules such as NOTCH, Hedgehog, BMI1, HIF, MERTK in the growth of acute leukemia cells. We have also showed that the inhibitors of the above signals suppressed the growth of leukemia cells and how the inhibitors affected the signaling molecules. Knockdown of the genes to produce the above signaling molecules showed the same effects as the inhibitors, which indicates that the effects of the inhibitors were not due to off-target effects.

研究分野：白血病の分子病態検査学

キーワード：白血病幹細胞 分子標的薬 コンパニオン診断検査 NOTCH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、造血幹細胞が遺伝子異常をきたして白血病幹細胞となり、過度の自己複製と細胞分裂により、白血病細胞が増殖する疾患である。約 8 割の症例では化学療法により寛解となるが、その半数は、わずかに残存していた白血病幹細胞が再び増殖して再発する。治癒率を向上するには、現行の抗癌剤で白血病細胞を壊す治療だけでなく、白血病幹細胞を根絶する、あるいは幹細胞としての機能を失わせる治療戦略が必要である。

乳癌や肺癌などに対しては、発症原因となった異常遺伝子から作られた蛋白を標的とする分子標的薬が臨床に導入されている。そして、有効性が期待できる患者を選別するための、癌細胞の異常遺伝子や蛋白発現を調べる検査であるコンパニオン検査が行なわれている。急性白血病に対する分子標的薬はごく少数であり、かつ、白血病幹細胞を標的としたものではない。さらに、現行のコンパニオン検査も標的分子の存在を確認する検査であり、有効性を十分に予測できるものではない。

2. 研究の目的

急性白血病を治癒させるには、白血病幹細胞の根絶が必須である。それには、症例ごとの白血病幹細胞を複製する分子メカニズムに対応した分子標的薬の開発と、その効果を予測するコンパニオン検査法の確立が必要である。本研究では次の 3 つの検査法を開発する。

- 1) 症例ごとの白血病幹細胞で活性化している幹細胞シグナルを特定する検査
- 2) そのシグナルに対する分子標的薬の白血病幹細胞の抑制効果を細胞レベルで調べる検査
- 3) その分子標的薬の効果の分子レベルでの解析による有効性予測のコンパニオン検査

これにより、分子標的薬の白血病幹細胞に対する効果の、細胞・分子レベルでの根拠を示し、その分子標的薬が臨床使用される際のコンパニオン検査法を確立する。

3. 研究の方法

1) 検体：急性白血病由来の細胞株、および、研究利用の同意を得た白血病患者の血液検体の残余から分離した白血病細胞を用いる。

2) 検体ごとの幹細胞シグナルの検索：細胞から蛋白と RNA を抽出し、幹細胞シグナルに関連する蛋白の発現と活性をイムノプロット法で、標的遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法で解析し、活性化しているシグナルを特定する。

3) シグナル阻害剤の細胞増殖に対する効果：シグナル阻害剤を添加して白血病細胞を培養し、細胞増殖、アポトーシスや分化の誘導、コロニー形成能などを評価して、シグナル阻害剤の効果を判定する。フローサイトメトリーで幹細胞比率やアポトーシス誘導比率を調べる。

4) シグナル阻害剤の効果の分子生物学的機序：阻害剤添加によるシグナル蛋白の活性や標的遺伝子の発現の変化を調べ、効果の分子生物学的機序を明らかにする。さらにマイクロアレイ解析で、阻害剤添加に伴う網羅的な遺伝子の発現の変化を調べる。さらに、その阻害剤の on-target 作用としてこの効果が現れたことの確認として、阻害剤の標的となる蛋白を産生する遺伝子をノックダウンして、同様の効果が得られるかを確認する。

5) 総括：幹細胞性を制御しうる阻害剤が見つければ、これが白血病幹細胞に対する分子標的薬の候補となりうる。また、どの検査のこういった所見が、この効果を反映するかを総括し、この検査がコンパニオン診断検査の候補となる。

4. 研究成果

この 3 年間に末尾のリストに示す 10 編の英文原著論文を発表した。これらの成果は、白血病幹細胞に対する分子標的薬の開発に直接結びつくものではない成果も含まれるが、白血病幹細胞の分子病態の解明、その分子標的治療の足かかり、さらには、新たなコンパニオン診断の開発につながるものである。白血病患者検体を用いた研究が、まだ途上であり、今後、研究を進める予定である。以下に、主な論文の概要を報告する。

1) BMI 阻害剤は急性白血病細胞の NOTCH シグナルを抑制して細胞増殖を抑制する

BMI1 は転写制御に関わる分子であるが、白血病細胞の培養系に、その発現や機能を阻害する低分子化合物、および、BMI1 発現をノックダウンする siRNA を添加すると、細胞増殖が抑制され、その機序の一部として、NOTCH シグナルの抑制が関与していることを明らかにした。BMI1 阻害剤は新たな分子標的薬となりうる可能性を示し、その有効性を *in vitro* で調べる検査法を示した。

2) Hedgehog シグナル活性化は Jurkat 細胞下部において NOTCH シグナルを活性化する

T リンパ芽球性白血病 Jurkat 細胞株の、Hedgehog シグナルを活性化させると、NOTCH シグナルも活性化され、両者の幹細胞制御シグナルが cross-talk している現象を見出した。分子標的治療にあたっては、他のシグナルへの作用をも考慮する必要があることを明らかにした。

3) GLI1 と カテニン遺伝子のノックダウンは NOTCH と mTOR シグナルを活性化する

急性前骨髄球性白血病 NB4 細胞株で、Hedgehog 系や WNT 系のシグナル構成分子の遺伝子であ

る *GLI1* や *CTNMB1* 遺伝子をノックダウンすると、NOTCH や mTOR シグナルが活性化する現象を見出した。このことは、Hedgehog シグナルや WNT シグナルが、NOTCH シグナルや mTOR シグナルの上流にあり、これらを負に制御している可能性を示した。

4) FOXP3 のノックダウンは T リンパ芽球性白血病細胞の増殖と NOTCH 発現を抑制する

急性 T リンパ芽球性白血病 Jurkat と KOPT-K1 細胞株において、FOXP3 分子をノックダウンすると、NOTCH シグナルを抑制し、アポトーシスを誘導して増殖を抑える現象を見出した。このことは、FOXP3 が T リンパ芽球性白血病の細胞増殖の維持に関与している可能性を示した。

5) NOTCH の活性化は急性骨髄性白血病細胞において糖転移酵素の発現を増強する

NOTCH シグナルの活性化には NOTCH 蛋白への糖鎖の付加が影響を与えることが知られている。急性骨髄性白血病 THP-1 細胞株と TMD7 細胞株において、NOTCH リガンド刺激による NOTCH シグナル活性化が、種々の糖転移酵素の発現を増強させることを見出した。NOTCH 活性化による NOTCH 蛋白への糖鎖付加が、NOTCH リガンドへの感受性を高めている可能性を示した。

6) MERTK 阻害剤は急性骨髄性白血病細胞の増殖を抑制する

急性骨髄性白血病細胞に対して、受容体型チロシンキナーゼである MERTK の阻害剤を添加すると、その下流にある AKT や ERK の活性を抑制して、細胞増殖を抑制することを示した。このことは、MERTK が恒常的に活性化している白血病症例に対して、MERTK 阻害剤は新たな分子標的治療薬となる可能性を示した。

7) 低酸素環境は HIF 発現を増強するが NOTCH 活性と細胞増殖を抑制する

急性白血病細胞を低酸素状態で培養すると、細胞増殖が抑制されるだけでなく、幹細胞性の指標となるコロニー形成能を有する細胞の複製を抑制することを示した。これはこれまでの、低酸素状態が白血病幹細胞を維持するという定説の逆の結果であった。低酸素状態は HIF 蛋白の発現を亢進させたが、NOTCH の発現や活性、その下流に存在する種々のシグナル系を抑制することを見出した。これまで HIF は NOTCH を活性化すると考えられていたが、これと逆の見解であり、前述した幹細胞自己複製抑制の分子メカニズムの一つであることが推測される。分子標的薬のコンパニオン診断としての薬剤感受性検査を行うにあたっては、白血病幹細胞の存在する骨髄内微小環境に近い低酸素状態で実施する必要がある。本研究により、低酸素が種々の幹細胞シグナルに影響を与えることを考慮して、感受性検査法を確立させる必要があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 OKUHASHI YUKI、 ITOH MAI、 TOHDA SHUJI	4. 巻 38
2. 論文標題 GLI1 and CTNNB1 Knockdown Activates NOTCH and mTOR Signalling in NB4 Myeloid Leukaemia Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6329-6332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12990	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 Yonekura Satoru、 Itoh Mai、 Shiratori Erika、 Ohtaka Mika、 Tohda Shuji	4. 巻 11
2. 論文標題 FOXP3 knockdown inhibits the proliferation and reduces NOTCH1 expression of T cell acute lymphoblastic leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-018-3700-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wang Shichun、 Itoh Mai、 Shiratori Erika、 Ohtaka Mika、 Tohda Shuji	4. 巻 10
2. 論文標題 NOTCH activation promotes glycosyltransferase expression in human myeloid leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 7576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4081/hr.2018.7576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koda Y、 Itoh M、 Tohda S	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of MERTK Inhibitors UNC569 and UNC1062 on the Growth of Acute Myeloid Leukaemia Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 199-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12208	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 Ohtaka M, Itoh M, Tohda S	4. 巻 37
2. 論文標題 BMI1 Inhibitors Down-regulate NOTCH Signaling and Suppress Proliferation of Acute Leukemia Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6047-6053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Okuhashi Y, Itoh M, Tohda S	4. 巻 37
2. 論文標題 Hedgehog Stimulation Suppresses Clonogenicity and Activates NOTCH Signalling in T-lymphoblastic Leukaemia Jurkat Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5005-5009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nogami S, Kawaguchi-Ihara N, Shiratori E, Ohtaka M, Itoh M, Tohda S.	4. 巻 39
2. 論文標題 Detection of theMYD88mutation by the combination of the allele-specific PCR and quenching probe methods	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Laboratory Hematology	6. 最初と最後の頁 163 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.12598	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 Shiratori E, Itoh M, Tohda S	4. 巻 37
2. 論文標題 MYD88 Inhibitor ST2825 Suppresses the Growth of Lymphoma and Leukaemia Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6203-6209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 東田修二	4. 巻 65
2. 論文標題 腫瘍マーカーとコンパニオン診断の適切利用による個別化医療の推進	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 314-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Itoh M, Okuhashi Y, Takahashi Y, Sonoda Y, Mohammad S, Saito T, Shiratori E, Tohda S	4. 巻 39
2. 論文標題 Hypoxia up-regulates HIF expression while suppressing cell growth and NOTCH activity in leukaemia cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4165 4170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 KAWAGUCHI-IHARA NORIKO, ZHAO YAN, NAKAMURA SUZUNE, SUZUKI KEIKO, ZHANG YI, TOHDA SHUJI, MUROHASHI IKUO	4. 巻 39
2. 論文標題 Chloroquine Inhibits Self-Renewal of Blast Progenitors Synergistically With Phytochemicals or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Hematological Malignant Cell Lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 87 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13083	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大高美香、伊藤真以、東田修二
2. 発表標題 種々の白血病細胞の増殖に対するBrequinar sodiumの作用
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二
2. 発表標題 TIM-3蛋白のパーキットリンパ腫細胞株の増殖における意義の検討
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Ohtaka, Mai Itoh, and Shuji Tohda
2. 発表標題 BMI1 inhibitors suppress cell growth and NOTCH signalling of acute leukemia cells
3. 学会等名 46th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 甲田祐樹、大高美香、白鳥恵理香、伊藤真以、東田修二
2. 発表標題 MERチロシンキナーゼ阻害による白血病細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥橋佑基、細萱茂実、東田修二
2. 発表標題 siRNAとCRISPER/Cas9システムを用いたゲノム編集による白血病細胞の増殖への効果
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二
2. 発表標題 リンパ系腫瘍細胞に対するMYD88阻害薬の細胞分子 生物学的作用
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuya Saito, Mai Itoh, Shuji Tohda
2. 発表標題 Metformin inhibits the growth of myeloid leukemia cells partly due to suppression of tyro3 expression
3. 学会等名 24th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学 臨床検査医学分野 http://www.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab-J.html</p>

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