

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09915

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病と骨髄微小環境相互作用の解明(造血器腫瘍と炎症)

研究課題名(英文)Notch signaling as a therapeutic target in refractory acute myeloid 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は急性骨髄性白血病(AML)を対象とし、AML細胞と骨髄微小環境(骨髄ストローマ細胞)との相互作用を解明することで新規治療標的を同定し白血病を克服することを目標とした。研究成果としては、骨髄微小環境でNOTCHシグナルが減弱すると、AML細胞の増殖が亢進した。全骨髄微小環境でNOTCHシグナルを欠損させたホストマウスでの白血病マウスは移植後極早期に死亡し解析が困難であった。そのため特定の骨髄ストローマ細胞のみにNOTCHシグナルを欠損するマウスを作成した。このマウスは赤芽球系に分化障害をおこすことを発見し、現在はこのマウスを用いた白血病マウスモデルを解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマウス白血病モデルとヒト検体を用いた解析であり、造血細胞と造血支持細胞(骨髄ストローマ細胞)の双方の異常が白血病発症機構に関わるという点が、学術的意義である。またAMLの現行治療による生存率は約40%であり、さらなる病態解明が必要である。特に本疾患が実際に好発する60歳代以降では、治療法の進歩に乏しい。本研究を進展させる事で、より副作用が少なく有効な治療法の開発に対する社会的意義が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study targeted acute myeloid leukemia (AML) and aimed to identify new therapeutic targets and overcome leukemia by clarifying the interaction between AML cells and bone marrow microenvironment (bone marrow stromal cells). As a result of the research, when NOTCH signal was knocked out in the whole bone marrow microenvironment, the proliferation of AML cells was enhanced. Leukemic mice, which are recipient mice lacking the NOTCH signal in the whole bone marrow microenvironment, died very early after transplantation and were difficult to analyze. Therefore, we created conditional knock out mice that lack the NOTCH signal only in specific bone marrow stromal cells. We discovered that this mouse causes a differentiation disorder in the erythroid lineage, and AML mouse model using this mouse is currently being analyzed.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 NOTCHシグナル 骨髄微小環境

1. 研究開始当初の背景

申請者グループは、発生・分化・増殖など細胞の運命決定に重要な役割を果たす NOTCH シグナルについて、造血器を中心に研究を行ってきた。申請者自身は造血幹細胞と急性骨髄性白血病 (AML) に焦点を当て研究を進めており、これまでの研究から 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 (Leukemia, 29:576-585, 2015)。AML 研究分野では、染色体転座に伴う融合遺伝子、および大規模シークエンスによるドライバー変異の同定はほぼ終了している。しかしながら、ゲノム研究の成果が慢性骨髄性白血病に対する BCR-ABL 阻害薬のような、決定的に有効な薬剤開発につながっておらず、新たな生物学的知見の発掘が求められている。AML では、微小環境との相互作用という視点で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での NOTCH シグナルが造血に影響を与えるという知見 (Cell Stem Cell, 2014) 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研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は血液がんである急性骨髄性白血病 (AML) を対象とし、腫瘍細胞 (AML 細胞) と骨髄微小環境 (骨髄ストローマ細胞) との相互作用を分子レベルで解明することで治療標的を同定し、難治性白血病を克服することを目的としている。AML は日本において最も頻度が高い白血病であり、標準治療により約 40% に治癒が望まれる。しかし約 60% に相当する難治性白血病を克服するにはさらなる病態の解明が必要である。若年者の治療成績は向上しつつあるが、本疾患が好発する 60 歳代以降では、治療法の進歩に乏しい現状となっている。高齢者における難治性疾患でもあり、副作用が少なく有効な治療法の開発に対する社会的要請は大きい。申請者は骨髄ストローマ細胞において NOTCH シグナルが減弱することで、AML 細胞の増殖が著しく支持されるという知見を得たため、これまで AML では必ずしも注目されてこなかった骨髄微小環境を治療標的とし、分子レベルに基づいた治療法開発基盤の構築を目指している。

3. 研究の方法

【ヒト AML 骨髄から、白血病細胞および骨髄ストローマ細胞の検体収集】

患者骨髄ストローマ細胞で RNA 解析等 (NOTCH シグナル等) を行うため、十分なインフォームドコンセントに基づいて患者から 1~5ml の骨髄液を研究用に採取し、全単核球細胞と、ストローマ細胞 (CD45 陰性、Lineage マーカー陰性) にソートし、保存する。

【ヒト AML 患者骨髄ストローマ細胞における NOTCH 発現レベルと、AML ゲノム異常との関連解析】
マウス骨髄微小環境で NOTCH シグナルが抑制 (*Rbpjk* 欠損) された場合のみ、RUNX1-RUNX1T1 融合遺伝子導入造血細胞を移植したマウスは早期に死亡した。一方、MLL-AF9 融合遺伝子導入造血細胞の移植では、NOTCH シグナルが正常な宿主骨髄微小環境でも AML を発症し死亡する。一部のヒト AML の発症にも、骨髄微小環境における NOTCH シグナルが影響を与えているかを検証するため、AML 患者骨髄細胞から分取した骨髄ストローマ細胞を用い、網羅的発現解析および miR155 定量により NOTCH シグナル発現レベルを評価する。別途 AML 細胞のゲノムプロファイリングを行い、骨髄ストローマ細胞における NOTCH シグナルが抑制されている AML の一群を同定する。RUNX1-RUNX1T1 陽性 AML と MLL 転座関連 AML では、ストローマ細胞の NOTCH シグナルレベルが異なる結果が得られれば、マウス実験が患者 AML のモデルであることが示されると期待される。

【骨髄ストローマ細胞における NOTCH シグナル抑制が、AML 発症を支持する機構の解析】

NOTCH シグナルの重要な転写因子である *Rbpjk* ノックアウトマウス骨髄ストローマ細胞では、miR155 の発現増加とこれに伴う NF- κ B シグナル活性化が報告された (Cell Stem Cell, 2014)。miR155 以外

のターゲットを同定するため、RUNX1-RUNX1T1 導入造血細胞を *Rbpjk* ノックアウトマウスおよび野生型マウスに移植したのち、AML 発症前に骨髄ストローマ細胞を分取し、mRNA および miR 発現解析を行い、miR155 発現増加とこれに伴う NF- B シグナル活性化がこの条件でもみとめられるかを検討する。またこれ以外のシグナル経路の変化を検索し、治療標的の候補リストを作成する。*Rbpjk* のノックアウトマウス骨髄ストローマ細胞は、共培養でも RUNX1-RUNX1T1 導入造血細胞の増殖を支持することを確認している。

【治療実験を用いた骨髄ストローマ細胞での NOTCH 抑制が AML 発症を支持する分子の特定】
免疫調整能をもつ抗体および NF- B シグナル阻害薬などによる、AML マウスモデルでの治療効果を評価し、NOTCH シグナル抑制が RUNX1-RUNX1T1 発現 AML 発症を支持する分子の同定をする。投与抗体は自己免疫性疾患で広く生物学的製剤として使用されている、抗サイトカイン/受容体 (TNF、IL-6) 抗体の抗マウス型抗体を用いる。

【Nestin 陽性細胞特異的に NOTCH シグナルを欠損させた遺伝子改変マウスの作成および機能解析】
このマウスはタモキシフェン投与下で Nestin 陽性細胞に特異的に GFP を発現し NOTCH シグナルを欠損させる遺伝子改変マウス (*Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{fllox/fllox}* マウス)

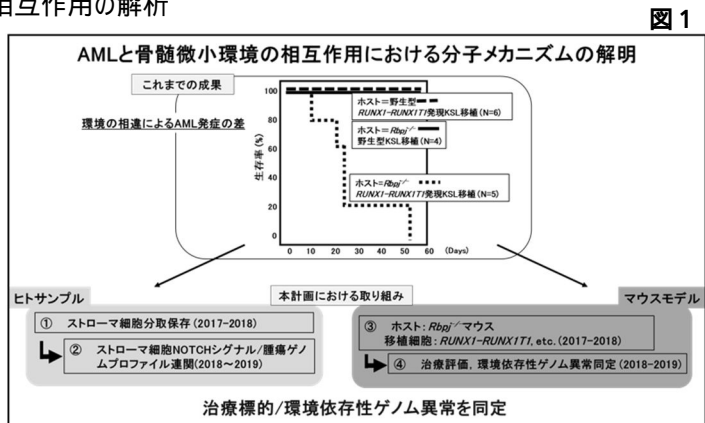
4. 研究成果

1) ヒト AML の骨髄検体保存

AML 患者骨髄から、白血病細胞および骨髄ストローマ細胞の検体収集については、継続して施行している。当院当科での臨床研究 (造血器腫瘍および固形腫瘍におけるゲノムおよびエピゲノム異常の網羅的解析) で同意を得ることができた症例について、本研究期間に約 80 例の白血病細胞および骨髄ストローマ細胞の検体採取をおこない、生細胞を凍結保存している。

2) マウス AML 細胞と骨髄微小環境との相互作用の解析

AML でもっとも頻度の高い染色体転座 t(8; 21) に由来する *RUNX1-RUNX1T1* 融合遺伝子をマウス造血細胞にレトロウイルスを用いて発現させ、致死量の放射線照射 (9.5Gy) をおこなった野生型マウスおよび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 (*Rbpj^{fllox/fllox};MxCre* マウス) に移植を行った。*RUNX1-RUNX1T1* 導入



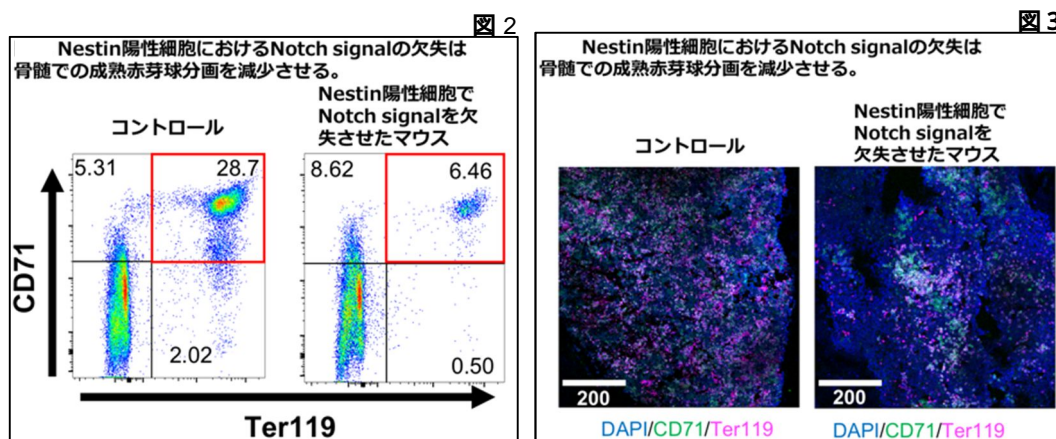
造血細胞を移植した野生型ホストマウスは生存しているが、*Rbpj^{fllox/fllox};MxCre* ホストマウスは移植後早期 (2-4 週間) にマウスが死亡した (図 1)。さらに *Rbpj^{fllox/fllox};MxCre* ホストマウスに正常造血細胞を移植してもマウスが死亡することはなかった。骨髄ストローマ細胞での NOTCH シグナルの減弱は何らかの炎症状態を励起している可能性が高く (Cell Stem Cell, 2014)、一方で RUNX1-RUNX1T1 融合たんぱく質は腫瘍細胞内で NF- B シグナルを活性化しているとの報告 (Blood, 2011) もあり、本研究の結果から AML 細胞と骨髄微小環境には NOTCH シグナルを介した何らかの相互作用があることが示唆された。しかしながら移植モデルの症例数を増やしていくと、全骨髄ストローマ細胞で NOTCH シグナルを欠損させた *Rbpj^{fllox/fllox};MxCre* マウスでは移植後極初期 (2 週間以内) に死亡するマウスが多く、死亡原因が白血病発症によるものか、それ以外の原因があるのかの判定が困難であり、骨髄ストローマ細胞も移植前の放射線照射の影響を受けており、解析が困難であった。全骨髄ストローマ細胞に NOTCH シグナルを欠損させると

AML 細胞に対し過剰な相互作用が働くと考え、特定の骨髄ストローマ細胞において NOTCH シグナルを欠損させるマウスで、AML と相互作用を検討する必要があると考えられた。そこで骨髄ストローマ細胞のひとつである Nestin 陽性細胞において特異的に NOTCH シグナルを欠損させた遺伝子改変マウス (*Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウス) を検討した。近年、造血制御機構が徐々に明らかになり、造血幹細胞を支持する非血液細胞で構成される造血微小環境の重要性が報告されている。造血微小環境の構成細胞として様々な細胞が相補的に働く可能性が示唆されており、例としては骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、CXCL12 強陽性細胞網細胞(CAR 細胞)などが報告されている。さらに神経幹細胞マーカーの一つである Nestin を発現する細胞が骨髄内に存在し、造血幹細胞にとって重要な微小環境構成細胞である可能性が示された。申請者グループは、Nestin 発現骨髄内造血支持細胞に着目し、Nestin 発現細胞特異的に NOTCH シグナルを欠損させた遺伝子改変マウスを同時期に作成した。このマウスはタモキシフェン投与下で Nestin 陽性細胞に特異的に GFP を発現し NOTCH シグナルを欠損させる遺伝子改変マウス (*Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウス) であり、まずはこのマウスの解析を行い、次に白血病モデルのホストマウスとして使用する事を計画した。

3) Nestin 陽性細胞特異的 NOTCH シグナル欠損マウスの解析

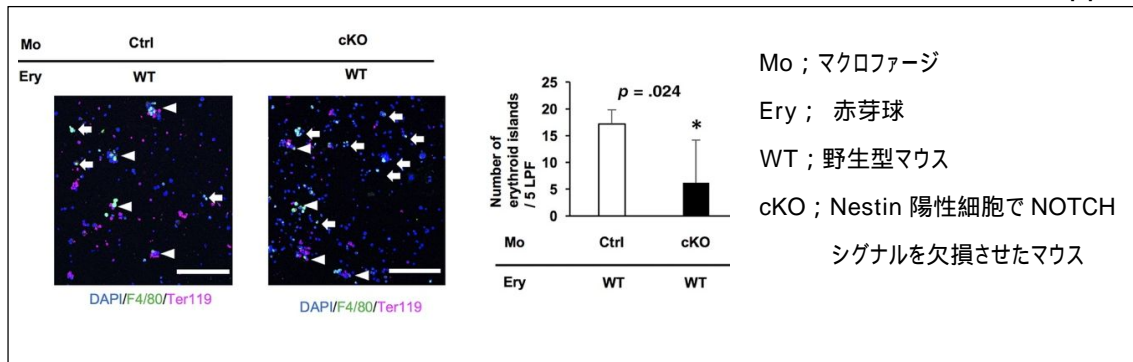
骨髄ストローマ細胞全体で NOTCH シグナルを欠損させたホストマウスでの白血病モデルでは、移植後極早期にマウスが死亡することから、詳細な解析が困難であった。そのため骨髄ストローマ細胞のひとつである Nestin 陽性細胞において特異的に NOTCH シグナルを欠損させた遺伝子改変マウスを作成した (*Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウス)。このマウスは赤芽球系に特異的に分化障害をおこすことを発見し報告をした (Stem cells 37:924-936, 2019)。

3-1) *Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウスは、骨髄で赤芽球造血が特異的に障害され、CD71+Ter119-未熟赤芽球の増加と CD71+Ter119+成熟赤芽球の減少を呈した (図 2、3)。

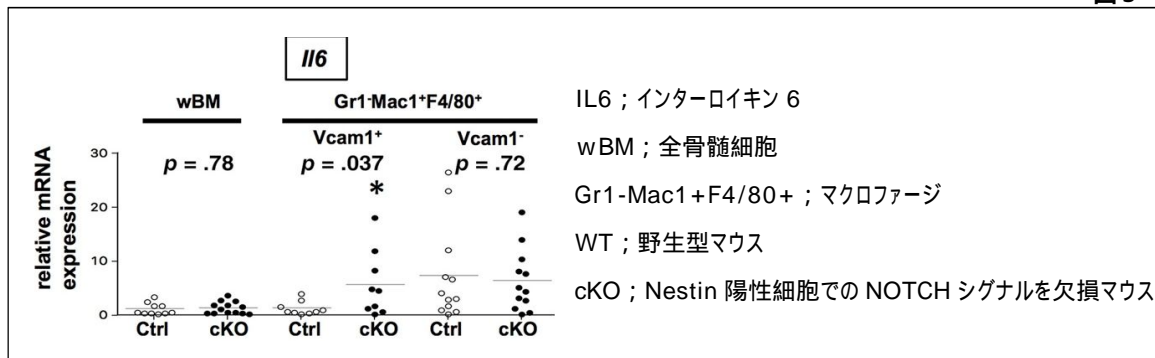


3-2) *Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウスから採取した骨髄細胞を致死量の放射線を照射した野生型マウスに移植したところ、赤芽球造血の障害は出現しなかった。野生型マウスから採取した骨髄細胞を致死量の放射線を照射したこの遺伝子改変マウスに移植したところ赤芽球造血の障害が再現された。従って赤芽球分化障害が、血液細胞に由来するものではなく、微小環境に由来するものであることが示された。

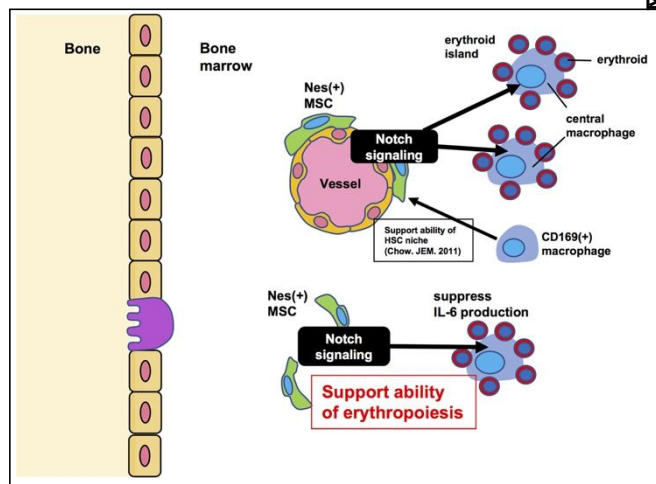
3-3) *Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウスでは骨髄内のマクロファージでの赤芽球島形成能が低下していることを示した。(図 4)



3-4) *Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウスの骨髄内セントラルマクロファージ(Gr1-Mac1+F4/80+Vcam1+)では IL6 の発現が増加しており (図 5)、In vivo で IL6 の発現を阻害すると、骨髄での赤芽球造血障害が回復することを示した。



3-5) Nestin 陽性造血支持細胞が Notch シグナルを介して骨髄内セントラルマクロファージの IL6 を制御することで赤血球造血分化を調整していることを明らかにした (図 6)。



4) Nestin 陽性細胞特異的 NOTCH シグナル欠損マウスと AML 細胞の相互作用の検討

骨髄ストローマ細胞のひとつである Nestin 陽性細胞で特異的に NOTCH シグナルを欠損させたホストマウス (*Nestin-CreER^{T2};Z/EG;RBPJ^{flox/flox}* マウス) に *RUNX1-RUNX1T1* 融合遺伝子や *MLL-AF9* 融合遺伝子を発現させたマウス造血細胞を移植し、白血病発症および白血病細胞と微小環境の相互作用につき現在解析中である。

<引用文献>

Leukemia, 29:576-585, 2015. Cell Stem Cell, 15: 51-65, 2014. Blood, 15;118(25): 6626-37, 2011. Stem cells 37:924-936, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto T, Obara N, Nishikii H, Kato T, Cao-Sy L, Fujimura R, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Takahashi S, Chiba S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Notch Signaling in Nestin-Expressing Cells in the Bone Marrow Maintains Erythropoiesis via Macrophage Integrity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3011.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto, Naoshi Obara, Hidekazu Nishikii, Takayasu Kato, Ryosuke Fujimura, Luan Cao Sy, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba
2. 発表標題 BONE MARROW ERYTHROPOIETIC DEFECT ACCOMPANYING EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS IS MIMICKED BY DOWNREGULATION OF NOTCH SIGNALING IN SPECIFIC MICROENVIRONMENT.
3. 学会等名 23rd Congress of EHA 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto, Naoshi Obara, Hidekazu Nishikii, Takayasu Kato, Ryosuke Fujimura, Luan Cao Sy, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Impairment of bone marrow erythropoiesis is induced by disruption of Notch signaling in specific bone marrow microenvironment
3. 学会等名 The 16th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto, Naoshi Obara, Hidekazu Nishikii, Takayasu Kato, Ryosuke Fujimura, Luan Cao Sy, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Bone Marrow Erythropoiesis is Maintained by Notch Signaling in Specific Bone Marrow
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 in Kyoto（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto, Naoshi Obara, Ryosuke Fujimura, Takayasu Kato, Cao Sy Luan, Hidekazu Nishikii, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Nestin-expressing cells in bone marrow is involved in BM erythropoiesis.
3. 学会等名 第29回日本血液学会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----