

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09944

研究課題名(和文)白血球幹細胞を保護する骨髄血管ニッチ：その制御機構の解明

研究課題名(英文) analysis of the regulatory mechanism for the vascular niche to protect leukemia stem cells.

研究代表者

中山 享之 (Nakayama, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00456659

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)：白血球幹細胞は、骨髄血管ニッチにより保護されている。しかし血管ニッチの制御機構は未だ不明である。我々は、血管ニッチ近傍に存在する骨芽細胞に注目し、血液悪性腫瘍予後不良因子であるFGF2の影響を検討した。骨芽細胞は、強力な血管新生因子であるVEGF-A165isoformを大量に分泌していた。FGF2刺激により骨芽細胞は、mRNA発現増大を伴ったVEGF-A分泌を増加させた。マウスVEGF-Aのプロモーターを利用しルシフェラーズアッセイを行ったが、FGF2刺激による活性は上昇せずプロモーターを介したものではなかった。よってmRNAの安定性に起因するものか、マイクロRNAによるものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血球幹細胞は、骨髄血管ニッチにより保護されているため、化学療法などに抵抗性となり再発につながる。しかし血管ニッチの制御機構は未だ不明である。我々は、血管ニッチ近傍に存在する骨芽細胞に注目し、血液悪性腫瘍予後不良因子であるFGF2の影響を検討した。骨芽細胞は、強力な血管新生因子であるVEGF-A165isoformを大量に分泌していた。したがって今後の検討により骨芽細胞由来VEGF-Aの血管ニッチにおける意義を確認すれば、新たな抗白血球幹細胞治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have reported that leukemia stem cells are protected by vascular niche in the bone marrow. However, the regulatory mechanism for the vascular niche is still unknown. We focused on angiogenic factors from osteoblasts closely resided near vascular niche, and Fibroblast growth factor 2 (FGF2), which was prognostically significant for hematological malignancies. We found that osteoblasts secreted VEGF-A 165: the most potent isoform, and FGF2 induce VEGF-A secretion from osteoblasts with increased mRNA expression. Next, we examined whether FGF2 regulates the VEGF-A promoter activity. However, luciferase assays with mouse VEGF-A promoter showed FGF2 did not increase luciferase activity. These observations provide evidence that FGF2 does not regulate VEGF-A transcription in osteoblasts. Thus, we supposed that FGF2 up-regulated VEGF-A expression by accelerating VEGF-A mRNA stability or micro RNA.

研究分野：血液内科学

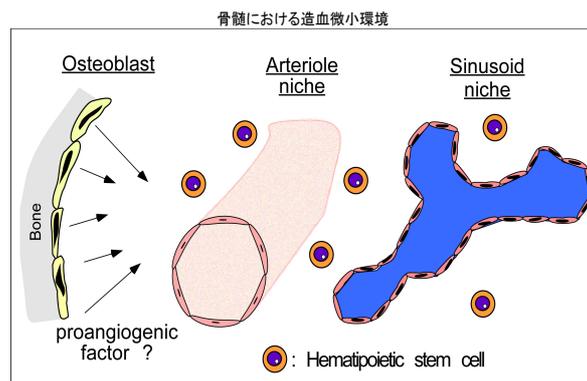
キーワード：骨髄造血微小環境 骨芽細胞 血管新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学療法技術の向上により血液悪性腫瘍における寛解率は、大きく向上した。しかし再発率が高く5年生存率は、例えば白血病の場合には約40%に留まる[Sakamaki et al. Int J Hematol. 2010]。近年の研究から、血液悪性腫瘍幹細胞が特定部位(ニッチ)に存在し静止期にあり薬剤耐性を獲得し再発の原因となっていることが明らかとなった[Krause et al. Nature medicine. 2006]。したがって治療成績を向上させるためには血液悪性細胞に対する直接的な療法だけでは、限界があり微小環境を標的にする必要があることは明らかである。骨髄内において巨核芽球など多様な細胞がニッチを形成するが、主要なニッチは2つである。1つは毛細血管に隣接するストローマニッチであり、もう1つは骨芽細胞に隣接する細動脈ニッチである(下図参照)。細動脈ニッチのほうが、より未分化な造血幹細胞を保持していると考えられている[Frenette et al. Blood 2014]。よって白血病幹細胞をターゲットとする治療法を開発する上で、重要なのは細動脈ニッチの制御機構の解明である。以前は、骨芽細胞そのものがニッチを形成すると考えられていたが、現在では直接的な影響は否定されている。しかし骨芽細胞数と造血幹細胞数は、比列すること「Calvi et al. Nature 2003」や、細動脈ニッチは、骨芽細胞に隣接していること等から、細動脈ニッチは骨芽細胞から何らかの影響を受けていると思われるが、詳細は不明である。つまり骨髄内における血管形成や維持のメカニズムは、殆ど解析されていない。

予後改善のため血液悪性疾患における微小環境研究の必要性は高いと考えられるが、微小環境を構成するメカニズムを解明しようとした報告は、現在までに極めて少ない。とくに骨髄は、骨の中にあるという特殊な環境により解析が困難であるためか、白血病幹細胞ニッチと考えられている骨髄内細動脈の制御機構を解析した研究は、皆無といってよい。VEGF-Aは、血管組織の維持に必要不可欠のサイトカインだが、骨髄中にはこれを豊富に分泌する細胞は、骨芽細胞の他にはない。したがって重要な機能を担っていると予想される。細動脈は、もともと化学療法剤や放射線に耐性があり、それが骨芽細胞からのVEGF-A刺激によって増強されていると判明すれば、低分子化合物や抗体等により、それを減弱することができる。このメカニズムを解析することによって、白血病の微小環境を破壊するという新規療法に発展出来る可能性がある。。



予後改善のため血液悪性疾患における微小環境研究の必要性は高いと考えられるが、微小環境を構成するメカニズムを解明しようとした報告は、現在までに極めて少ない。とくに骨髄は、骨の中にあるという特殊な環境により解析が困難であるためか、白血病幹細胞ニッチと考えられている骨髄内細動脈の制御機構を解析した研究は、皆無といってよい。VEGF-Aは、血管組織の維持に必要不可欠のサイトカインだが、骨髄中にはこれを豊富に分泌する細胞は、骨芽細胞の他にはない。したがって重要な機能を担っていると予想される。細動脈は、もともと化学療法剤や放射線に耐性があり、それが骨芽細胞からのVEGF-A刺激によって増強されていると判明すれば、低分子化合物や抗体等により、それを減弱することができる。このメカニズムを解析することによって、白血病の微小環境を破壊するという新規療法に発展出来る可能性がある。。

2. 研究の目的

骨芽細胞に隣接している細動脈叢は、より未分化な造血幹細胞(白血病幹細胞を含む)を保持する骨髄ニッチと報告されているが、その制御機構は不明である。ヒト白血病マウスを、予後不良因子であるFGF2で処理したところ骨芽細胞と幼若白血病細胞の増加、抗癌剤抵抗性の亢進が認められた。FGF2は、白血病細胞に対して直接的な増殖効果は無く、骨芽細胞においても白血病細胞に対する支持能力を亢進させなかった。よってFGF2は、細動脈ニッチの機能制御を通じ、白血病細胞の生存に関与しているのではないかと推測した。そこで骨芽細胞から分泌される血管新生因子の生理機能確認とFGF2による影響の解析を行う。

3. 研究の方法

骨芽細胞から分泌される血管新生因子のスクリーニングを行い整理作用が強いと思われるものを選出する。骨芽細胞から分泌されるVEGF-Aの生理的意義を検証するため、骨芽細胞特異的にVEGF-Aをノックアウトしたマウスを、骨芽細胞に特異的に発現するプロモーター*col 2.3*の下流にCreを組み込んだマウスとVEGF-A遺伝子の両端にfloxを組み込んだマウスの交配により作製する。その後、同系マウスの白血病細胞を移植し、FGF2と抗癌剤で処理する。wild typeと比較して骨髄中の白血病細胞数や薬剤耐性がどのように変化するか検証する。FGF2が、osteoblastにおけるVEGF-A発現を上昇させるメカニズムを解析するためにルシフェラーゼを用いたVEGF-Aのプロモーター解析や抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング法によりシグナル伝達経路を同定する。次にFGF2刺激による影響を検討し、もし反応があればそのメカニズムを同定する。

4. 研究成果

まず骨芽細胞においてどのような血管新生因子が発現されているか、マイクロアレイでスクリーニングを欠けたところ右図のような結果となった。この中で我々は、強力な血管新生因子かつ血管保護因子である VEGF-A に着目した。ヒト VEGF-A は、アミノ酸 121 個、165 個、189 個ある 3 つのアイソフォームが知られているが、RT-PCR で解析したところマウス骨芽細胞は、VEGF122 と VEGF164 を主に発現していることが明らかとなった。アイソフォームのなかで VEGF165 が最も効率よく血管を誘導できるといわれている。また FGF2 刺激により VEGF-A の変化を ELISA で検討したところ分泌量が増加していた。この反応は、VEGF-A の mRNA 増加を伴っていた。

FGF2 が、骨芽細胞における VEGF-A 発現を上昇させるメカニズムを解析するために、マウス VEGF-A のプロモーターをクローニン後にルシフェラーズベクターにサブクローニングした。これをもちいて FGF2 による VEGF-A 発現上昇がプロモーターを介したものを解析したところ、FGF2 刺激を加えてもルシフェラーズ活性は、上昇せずプロモーターを介したものではないことが確認された。よって mRNA の安定性に起因するものか、マイクロ RNA によるものと推察された。したがってアマニチンを用いた mRNA の安定性を確認するとともに、FGF2 刺激によりどのようなマイクロ RNA 発現が増加するかを検討している。しかしながらまだ同定には至っていない。文献的には、riboswitch と呼ばれるような現象や micro RNA とは異なる non-coding RNA によっても VEGF-A 発現の調整が報告されており、今後はこちらを解析する予定である。

Factors related to angiogenesis in osteoblasts

Gene Symbol	signal intensity	Gene function
Efnb2	122.81	angiogenesis
Tnfaip2	121	angiogenesis
Vegfa	581.59	angiogenesis
Wars	278.19	angiogenesis
Figf	606.69	angiogenesis
Angpt1	405.1	angiogenesis
Lox	958.32	vessel development

VEGF-A isoforms expressed in osteoblasts



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Yisireyli Maimaiti, Uchida Yasuhiro, Yamamoto Koji, Nakayama Takayuki, Cheng Xian Wu, Matsushita Tadashi, Nakamura Shigeo, Murohara Toyooki, Takeshita Kyosuke	4. 巻 69
2. 論文標題 Angiotensin receptor blocker irbesartan reduces stress-induced intestinal inflammation via AT1a signaling and ACE2-dependent mechanism in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 167 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2017.11.010	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 Shibata Yuka, Himeno Tatsuhito, Kamiya Taeko, Tani Hiroya, Nakayama Takayuki, Kojima Chika, Sugiura-Roth Yukako, Naito Ena, Kondo Masaki, Tsunekawa Shin, Kato Yoshiro, Nakamura Jiro, Kamiya Hideki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Validity and reliability of a point-of-care nerve conduction device in diabetes patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13007	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 Ikebe Emi, Matsuoka Sahoko, Tanaka Asashi, Yonemura Yuji, Fujii Yasuhiko, Ohsaka Akimichi, Okazaki Hitoshi, Kitazawa Junichi, Ohtani Shinichi, Nakayama Takayuki, Momose Shun-ya, Miwa Izumi, Taira Rikizo, Toyota Kuro, Kino Shuichi, Kato Hidefumi, Hamaguchi Isao	4. 巻 58
2. 論文標題 Reduction in adverse transfusion reactions with increased use of washed platelet concentrates in Japan?A retrospective multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 162 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transci.2018.12.021	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 Yisireyli Maimaiti, Hayashi Motoharu, Wu Hongxian, Uchida Yasuhiro, Yamamoto Koji, Kikuchi Ryosuke, Shoaib Hamrah Mohammad, Nakayama Takayuki, Wu Cheng Xian, Matsushita Tadashi, Nakamura Shigeo, Niwa Toshimitsu, Murohara Toyooki, Takeshita Kyosuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1266-1280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-01366-3	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 Nakagami Yuya, Suzuki Susumu, Espinoza J. Luis, Vu Quang Lam, Enomoto Megumi, Takasugi Souichi, Nakamura Ayano, Nakayama Takayuki, Tani Hiroya, Hanamura Ichiro, Takami Akiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunomodulatory and Metabolic Changes after Gnetin-C Supplementation in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11061403	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 Suzuki Toshihiko, Sato Yoshiaki, Yamamoto Hidenori, Kato Taichi, Kitase Yuma, Ueda Kazuto, Mimatsu Haruka, Sugiyama Yuichiro, Onoda Atsuto, Saito Shigeki, Takahashi Yoshiyuki, Nakayama Takayuki, Hayakawa Masahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced with an inhibitor of CC chemokine ligand 2 ameliorate bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 180 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2020.01.009	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中山享之
2. 発表標題 Livedoid vasculopathy and popliteal artery occlusion in a patient with protein S deficiency
3. 学会等名 日本輸血学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Nakayama
2. 発表標題 Fibroblast Growth Factor-2 facilitates the growth and chemo-resistance of leukemia cells in the bone marrow by modulating osteoblast functions.
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山享之
2. 発表標題 トロンピン産生を阻害する抗プロトロンピン抗体により出血傾向を呈したと考えられるLAHPSの一例
3. 学会等名 日本血栓止血学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山享之
2. 発表標題 トロンボモジュリン遺伝子導入により安全性を高めた間葉系幹細胞
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	国崎 祐哉 (Kunisaki Yuya) (80737099)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	