

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07425

研究課題名（和文）白血病細胞の骨髄ニッチ・クロストークによる抗がん剤耐性解明と治療反応評価法の開発

研究課題名（英文）Development of an evaluation method based on the elucidation of drug-resistance mechanisms of leukaemia cells through bone marrow niche cross talk

研究代表者

宮地 勇人（MIYACHI, Hayato）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病（AML）の治療において、抗がん剤に対する治療抵抗性（または耐性）は患者診療上の重要な課題である。治療後に骨髄に残存した白血病細胞は、骨髄（腔内）微小環境（ニッチ）内に潜伏し、その再増殖が再発、治療抵抗性の原因となる。本研究では、治療後骨髄ニッチ内に残存し再発、予後不良の原因となる抗がん剤耐性の分子機構を明らかにし、それに基づく診断・克服法の開発を目指すことを目的とした。FLT3またはKIT変異を有する株化培養白血病細胞を作製し、細胞と細胞外マトリックスとの相互反応を調べた結果、ara-C耐性の増強とその分子メカニズムが明らかとなり、診断治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性白血病の治療において、抗がん剤に対する治療抵抗性（耐性）は患者診療上の重要な課題で、耐性の分子機構の解明とそれに基づく、診断と克服法への応用は治療成績の向上につながると期待される。治療後に残存した白血病細胞は、骨髄（腔内）微小環境（ニッチ）内に潜伏し、その再増殖が再発、治療抵抗性の原因となる。本研究では、治療後骨髄ニッチ内に残存し、予後不良の原因となる白血病細胞の耐性の分子機構を明らかにした。これらに重要な分子は、治療抵抗性の診断と治療法の開発を通して、個別患者に最も適切な治療法の選択と治療予後の改善に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of acute leukemia patients, drug-resistance after therapy with chemotherapeutic agents is clinically problematic. The residual disease after the therapy survives and re-proliferates through bone marrow niche cross-talk. This study was undertaken to elucidate drug-resistance mechanisms of leukemia cells through bone marrow niche cross talk, and to development of an evaluation method based on it. Cultured leukemia cell lines with FLT3-ITD showed collateral resistance to ara-C in the presence of fibronectin or G-CSF, which can derive from stromal cells in bone marrow. This crosstalk can be target of evaluation and interruption for the overcome.

研究分野：臨床検査学

キーワード：白血病 抗がん剤抵抗性 細胞外マトリックス 骨髄ニッチ

1. 研究開始当初の背景

AML の治療予後は、染色体・遺伝子異常によって規定される。予後良好な染色体異常においても治療抵抗性の症例が少なからず存在する。receptor tyrosine kinase: RTK である *fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* 遺伝子の internal tandem duplication 異常 (*FLT3-ITD*) と *KIT* 変異は、予後不良マーカーとして知られる。*FLT3-ITD* は、AML の約 30% に認められ、独立した重要な予後不良因子とされている。我々は、*FLT3-ITD* を過剰発現させた白血病細胞が、低酸素下で誘導される転写因子 HIF1 を介して核酸アナログ ara-C に対して耐性を獲得することを明らかにした。治療後に骨髄に残存する白血病細胞は抗がん剤による細胞アポトーシスから逃れて再び増殖し再発の原因となることが報告されつつある。これらの結果は、低酸素状態にある骨髄において、細胞増殖を標的とする抗がん剤に耐性となる可能性を示唆している。白血病幹細胞は現在注目されている領域であるが、in vivo モデルにおいて白血病幹細胞の有する遺伝子異常と組織学的な分布や機能分子の発現について免疫組織学的検索は我々の研究成果を始め報告数が少ない。白血病幹細胞が骨髄微小環境と接触する上で重要なインテグリンに関して、細胞内シグナルは、主に結合するインテグリン関連キナーゼのカスケード活性化を介して腫瘍細胞の生存に関与する。これらから、インテグリンなどと骨髄微小環境との相互作用が細胞死からの回避や抗がん剤抵抗性をもたらしている可能性がある。我々は、同細胞の DNA マイクロアレイ解析にて、骨髄微小環境の構成分子 (フィブロネクチン、コラーゲンなど) およびその受容体 (インテグリン、LAIR2 など) の発現亢進を明らかとした。多くの白血病細胞を供給する白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と同様に骨髄腔内の niche ニッチ にあってその細胞増殖は抑えられているが、骨髄微小環境がその増殖を下支えしている可能性がある。

2. 研究の目的

急性白血病の治療において、抗がん剤に対する治療抵抗性 (または耐性) は患者診療上の重要な課題である。抗がん剤治療後に骨髄に残存した白血病細胞 (微小残存病変) は、骨髄 (腔内) 微小環境 (niche ニッチ) 内に潜伏し、その再増殖が再発、治療抵抗性の原因となる。

本研究では、白血病の治療予後の改善のため、治療後骨髄ニッチ内に残存し再発、予後不良の原因となる抗がん剤耐性の分子機構を明らかにし、それに基づく耐性の評価システムさらには克服法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

骨髄微小環境の要素として細胞外マトリックスには、白血病細胞表面の接着受容体と相互反応するフィブロネクチン、コラーゲン IV を用いた。細胞と細胞外環境の相互反応を阻害するモノクローナル抗体を用いて、抗がん剤への耐性度変化を調べた。抗がん剤感受性試験には、細胞死の評価に MTT 試験を用いた。白血病細胞と骨髄間質細胞との相互関係を知るため、急性骨髄性白血病において治療抵抗性のバイオマーカーとして知られる *FLT3* または *KIT* 変異を有する株化培養白血病細胞を作製した。

4. 研究成果

FLT3 または *KIT* 変異を有する株化培養白血病細胞において骨髄間質細胞から分泌液性因子 G-CSF による抗がん剤耐性への影響を調べた。G-CSF の存在下において、*FLT3* 陽性白血病細胞は ara-C に対して治療抵抗性をもたらすことが示された。*KIT* について、臨床的に頻度多い 4 種の変異を有する plasmid DNA を作製し、株化培養細胞株 HL-60 または U937 に細胞導入し、野生型と比較した。その結果、*KIT* 変異導入細胞において、Ara-C 耐性化が確認された。さらに、ara-C 耐性化の機構として、薬剤の細胞膜輸送低下や不活化をもたらす遺伝子発現変化が証明された。G-CSF は *KIT* 変異の中で *KITN822K* を有する Kasumi-1 細胞において、治療抵抗性をもたらすことが明らかとなった。

FLT3-ITD 導入 K562 細胞は、ファイブロネクチンをコートした培養プレートにて培養した場合、ara-C 耐性が増強することが明らかとなった。ファイブロネクチン接着を特異的に抑制する抗 B1 インテグリン抗体の投与にて、ara-C 耐性は減弱した。*FLT3-ITD* を導入した培養細胞株 K562 における遺伝子発現として、K562-*FLT3* 細胞における遺伝子発現を調べた結果、ファイブロネクチン遺伝子 (FN) と *FGFR1* の発現上昇が見られ、オートクライン機序にて細胞と細胞外マトリックスとの相互反応を強化し、治療抵抗性をもたらす可能性が示唆された。その現象における細胞内シグナルを知るため、関連する特異的分子を調べた。*TGFB1*, *TGFBR2*, *TGFBR1* その他 17 遺伝子を定量的リアルタイム PCR で調べた結果、ファイブロネクチン存在下で、*TGFB1*, *TGFBR2* と *SMAD2* 遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。さらに、*FLT3* 陽性の MOLM14 細胞と MV4-11 細胞にて、TGFβ1 蛋白レベルをウェスタンブロットにて調べた結果、ファイibroネクチン存在下にて 2 倍の発現亢進が認められた。TGFβ1 蛋白レベルとそのリン酸化は、ファイibroネクチン存在下で発現低下していた。TGFβ1 発現上昇と TGFβ1 発現低下が確認された。これらは、細胞介在の治療抵抗性をもたらす

細胞と細胞外マトリックスとの相互反応の結果、ara-C 耐性の増強における分子メカニズムとなる可能性が示唆された。

これらの結果は、**receptor tyrosine kinase: RTK** の活性化変異を有する AML 細胞が治療後残存し抵抗性を獲得する分子機構を説明するものと考えられる。これらは、細胞介在の治療抵抗性をもたらす細胞と細胞外マトリックスとの相互反応 (骨髄ニッチ・クロストーク) の結果、ara-C 耐性の増強における分子メカニズムとなる可能性が示唆され、これら分子機構に重要な遺伝子は、AML の治療抵抗性の診断と治療法の開発に貢献しうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ogasawara A, Matsushita H, Tanaka Y, Shirasugi Y, Ando K, Asai S, Miyachi H.	4. 巻 489
2. 論文標題 A simple screening method for the diagnosis of chronic myeloid leukemia using the parameters of a complete blood count and differentials.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta.	6. 最初と最後の頁 249-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2018.08.038.	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 2.Yamada A, Kinoshita M, Sawa D, Saito Y, Kamimura S, Miyachi H, Moritake H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term Remission of Acute Myeloid Leukemia Developed From Systemic Mastocytosis by Conventional Chemotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	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） 10.1097/MPH.0000000000001259.	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 3.Tomizawa D, Tanaka S, Hasegawa D, Iwamoto S, Hiramatsu H, Kiyokawa N, Miyachi H, Horibe K, Saito AM, Taga T, Adachi S.	4. 巻 48
2. 論文標題 Evaluation of high-dose cytarabine in induction therapy for children with de novo acute myeloid leukemia: a study protocol of the Japan Children's Cancer Group Multi-Center Seamless Phase II-III Randomized Trial	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 587-593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy061.	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 Hasegawa D, Tawa A, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S.	4. 巻 67
2. 論文標題 Attempts to optimize postinduction treatment in childhood acute myeloid leukemia without core-binding factors: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28692.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 ナツアグドルジ・ムンホエルデネ, ダムディンスレン・アナラ, ツェウエグジャワ・パヤルパタ, ネメフバアタルラハスレン, 柿添 英文, 浅井 さとみ, 宮地 勇人
2. 発表標題 FLT3-ITD陽性白血病細胞のAra-C耐性におけるTGFB経路の役割(A role of TGFB pathway in Ara-C resistance in FLT3-ITD-positive leukemia cells)
3. 学会等名 第66回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------