

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390261

研究課題名（和文）白血病残存に関わる分子細胞メカニズムの解明とその克服

研究課題名（英文）Molecular mechanisms and therapeutic approach of residual leukemia

研究代表者

直江 知樹 (NAOE TOMOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50217634

研究成果の概要（和文）：

ヒト白血病細胞をNOGマウスに移植し、その生着・増殖・残存の夫々に関わる骨髄内の部位につき解析した。これまでに解析したAML、CML/BC、preB-ALL、T-ALL20数例では大半が骨端部の骨芽細胞内面に接するように生着した。CML/BC、Ph+ALL症例からの白血病細胞中のCD34+CD38⁻、CD34+CD38⁺、CD34⁻CD38⁺のいずれの分画も生着し、白血病を発症した。また、CD34、CD38の発現パターンも分画によらず再現された。これらの結果からCML/BC、Ph+ALLではAML、CML/CPと異なりCD34+細胞とCD34⁻細胞は相互移行することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

To identify the leukemia-propagating stem cell fraction of Philadelphia chromosome-positive (Ph+) leukemia, we serially transplanted human leukemia cells from patients with chronic myeloid leukemia blast crisis or Ph+ acute lymphoblastic leukemia into NOD/SCID/IL-2R γ null mice. Engrafted cells were almost identical to the original leukemia cells. CD34+CD38⁻CD19+, CD34+38+CD19+, and CD34⁻CD38+CD19+ fractions could self-renew and transfer the leukemia, whereas the CD34⁻CD38+CD19+ fraction did not stably propagate in NOD/SCID mice. These findings suggest that leukemia-repopulating cells in transformed Ph+ leukemia are included in a lineage-committed but multilayered fraction, and that CD34+ leukemia cells potentially emerge from CD34⁻ populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、幹細胞、化学療法、耐性、造血ニッチ

1. 研究開始当初の背景

近年多くの腫瘍が癌幹細胞を含んでいることが報告されている。その最も初期の発見が Bonnet らによる白血病幹細胞(LSC)である。彼らは急性骨髄性白血病(AML)患者から採取した細胞のうち CD34 陽性 CD38 陰性分画が免疫不全マウスに生着し、この分画内に LSC が含まれることを提唱した。移植マウスより分離した LSC は二次移植が可能であることから自己複製能力を持つことが判明した。LSC と HSC には自己複製、多能性、高度な増殖能力など共通点が多いが、両者の差異については判明していることは少ない。

2. 研究の目的

・ヒト白血病細胞を NOG や NOD/SCID などの免疫不全マウスに移植することにより、生体内で生着した白血病細胞に対する阻害剤の評価系を効率的に樹立する。このため、サイトカインや免疫抑制剤などの併用を行い、至的異種移植系を確立する。

・この異種移植系を用いて、阻害剤投与後の残存腫瘍の病理学的な解析から、ヒト白血病の生着・増殖・残存に関わる場所の特定と、マウスニッシュとヒト白血病の異種間分子相互作用について解析する。さらに、腫瘍が残存するに至った原因となる分子基盤を解析し、その分子を標的とした薬剤の検討を行うとともに、阻害剤との併用効果について検討し、より効率的な治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) NOG マウスに経尾静脈的にヒト白血病細胞を移植し、経時的にヒト白血病細胞の増殖と浸潤について、CD45 を細胞マーカーとした FACS および免疫染色で検討した。移植可能な分画を、分化マーカーや SP 分画にて同定し、またその生着部位を免疫染色や共焦点レーザー顕微鏡で特定した。

(2) 既に移植と継代に成功した白血病については、移植ヒト白血病細胞の骨髄ニッチにホーミングに関しては、抗体や小分子化合物で阻害実験を行い、白血病細胞における分化ヒエラルキーの存在を確認した。白血病幹細胞の維持に関するニッチからのシグナルを解析するため、ホーミング前後あるいはニッチへの接着細胞と非接着細胞における発現プロファイルあるいは免疫染色の違いを解析した。化学療法後に残存する白血病については、骨髄から回収し、薬剤排出能や幹細胞としての性格について解析した。急性骨髄性白血病 M0 から樹立した NOG マウスに継代可能な細胞株 TRL01 は、マウス骨髄間質細胞株との接着において増加可能である。この細胞株においても Hoechst33343 に透過性のある集団とない集団に分かれるので、ニッチ依存性との関わりについて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト白血病細胞、CBCD34+細胞の NOG マウスへのホーミング

AML、CML/BC、preB-ALL、T-ALL 合計 20 数例では大半が骨端部の骨芽細胞内面に接するように生着し、AML の一部では血管内皮細胞の外側に接するように生着した。これは移植の度に安定して観察され、白血病細胞のホーミングニッチと考えられた。またこれは白血病幹細胞分画 CD34+CD38⁻でも同様であった。

(2) Cytosine -1-b-D-arabinofuranoside (Ara C)による化学療法後の残存白血病部位の同定

AML M0 細胞 MAS を Ara C とともに NOG マウスに移植したところ、骨端部の骨芽細胞ニッチ、血管ニッチの双方に残存白血病が見られた。一方骨幹部においては血管ニッチのみに残存白血病が見られた。白血病細胞株 MOLM13 も同様の挙動を示した。

(3) Ph 染色体陽性白血病細胞の NOG マウスへの移植

CML/BC, Ph+ALL 各 3 症例からの白血病細胞中の CD34+CD38⁻、CD34+CD38⁺、CD34-CD38⁺分画を移植した。AML においては CD34+CD38⁻の分画のみが NOG マウスに生着する事が過去に報告されているが、今回我々が行った実験においてはいずれの分画も NOG マウスに生着し、白血病を発症する事が観測された。また、CD34, CD38 の発現パターンも移植する分画によらず再現される事が確認された。これらの結果から CML/BC, Ph+ALL では AML, CML/CP と異なり CD34+細胞と CD34-細胞は相互移行することが明らかになった。場合は NOG マウスに白血病を発症したが、CD34-CD38⁻分画では発症が見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件) (全て査読有)

1. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol*. 84:229-38,2010.
2. Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed

- cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD/SCID/IL-2R gammac mice. *Cancer Sci.* 2009. [Epub ahead of print]
3. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood.* 114:1607-17,2009.
 4. Minami Y, Naoe T. Circumventing resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Gan To Kagaku Ryoho.* 36(4):544-7,2009.
 5. Abe A, Minami Y, Hayakawa F, Kitamura K, Nomura Y, Murata M, Katsumi A, Kiyoi H, Jamieson CH, Wang JY, Naoe T. Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia after imatinib therapy. *Int J Hematol.* 88:471-5,2008.
 6. Minami Y, Stuart SA, Ikawa T, Jiang Y, Banno A, Hunton IC, Young DJ, Naoe T. Murre C, Jamieson CH, Wang JY. BCR-ABL-transformed GMP as myeloid leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17967-72,2008.
 7. Tanizaki R, Katsumi A, Kiyoi H, Kunishima S, Iwasaki T, Ishikawa Y, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Kojima T, Kaibuchi K, Kojima S, Naoe T. Mutational analysis of SOS1 gene in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 88:460-2,2008.
 8. Iwasaki T, Katsumi A, Kiyoi H, Tanizaki R, Ishikawa Y, Ozeki K, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Amano M, Kojima T, Kaibuchi K, Naoe T. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 81:454-60,2008.
 9. Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *Eur J Haematol.* 79:25-31,2007.
 10. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia.* 21:136-42,2007.

[学会発表] (計 13 件)

1. Treatment with mTOR Inhibitor, Everolimus (RAD001) Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent or T315I-Mutated Cells. Minami Y, Minami M, Kuwatsuka Y, Tanizaki R, Nomura Y, Abe A, Kiyoi H, Naoe T. The 51st ASH Annual Meeting and Exposition (December 5-8, 2009), New Orleans, LA.
2. Treatment with Bortezomib Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent Cells. Kuwatsuka Y, Minami Y, Tanizaki R, Minami M, Abe A, Nomura Y, Kiyoi H, Naoe T. The 51st ASH Annual Meeting and Exposition (December 5-8, 2009), New Orleans, LA.
3. FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through $\alpha 4\beta 1$ Integrin and Pyk2 Signaling. Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Naoe T. The 51st ASH Annual Meeting and Exposition (December 5-8, 2009), New Orleans, LA.
4. Transformation of E2A-deficient pluripotent progenitors by BCR-ABL generates imatinib-resistant leukemic stem cells Minami Y, Abe A, Ikawa T, Stuart S, Jamieson CHM, Naoe T, Wang JYJ 50th ASH meeting, (December 6-9, 2008), San Francisco, USA
5. Hsp90 inhibitor, 17-AAG overcome resistance of FLT3-inhibitor in MOLM13N676K Y Minami, Y Nomura, A Abe, R Tanizaki, Y Shiotsu, S Akinaga, H Kiyoi and T Naoe. 50th ASH meeting, (December 6-9, 2008) , San Francisco, USA
6. Evaluation of BCR-ABL-positive leukemia stem cells: strategies for overcoming the resistance to imatinib Y Minami Gordon Research Conferences, Stem Cells & Cancer (Selected plenary speech & poster presentation),LesDiablerets,(September 13-18, 2009). Switzerland,
7. 慢性骨髓性白血病幹前駆細胞に対するイマチニブの効果：マウス多能性造血細胞モデル及び治療後残存腫瘍解析．南陽介、安部明弘、伊川友活、Scott Stuart, 早川文彦、北村邦朗、野村由佳、Catriona Jamieson, Jean Wang, 直江知樹. 第70回日本血液学会総会. 2008年10月10-12日、京都国際会議場.
8. Philadelphia 染色体陽性急性リンパ芽球形白血病由来 Imatinib 耐性株の樹立とその耐性化機序の解析．西岡百子、安部明弘、今釜静香、谷崎亮平、勝見章、南陽介、早川文彦、山本一仁、直江知樹.

第70回日本血液学会総会. 2008年10月10-12日、京都国際会議場.

9. FLT3/ITD regulates leukemia cell adhesion through $\alpha 4\beta 1$ integrin and Pyk2 signaling. 勝見章、清井仁、安部明弘、谷崎亮平、松下正、小嶋哲人、直江知樹. 第71回日本血液学会学術総会. 2009年10月23-25日、京都国際会議場.
10. Evaluation of residual leukemia stem cells in chronic myeloid leukemia with imatinib therapy. 南陽介 安部明弘 銚塚八千代 早川文彦 谷崎亮平 勝見章 清井仁 直江知樹 第67回日本癌学会総会 (ワークショップ)、名古屋、2008年10月28-30日
11. Evaluation of BCR-ABL-positive leukemia stem cells with imatinib-therapy and apoptosis induced by bortezomib-treatment. 南陽介 安部明弘 銚塚八千代 野村由佳 谷崎亮平 直江知樹 第7回幹細胞シンポジウム (一般演題)、東京、2009年5月15-16日
12. Ph 陽性白血病幹細胞におけるイマチニブ耐性とボルテゾミブによる克服の可能性 南陽介 銚塚八千代 谷崎亮平 野村由佳 安部明弘 清井仁 直江知樹 第18回日本アポトーシス研究会 (一般口演)、長崎、2009年8月18-20日
13. Ph 陽性白血病幹細胞におけるイマチニブ耐性とボルテゾミブによる克服の可能性 南陽介 銚塚八千代 谷崎亮平 安部明弘 直江知樹 第68回日本癌学会総会 (一般口演)、横浜、2009年10月1-3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

直江知樹 (Naoe Tomoki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50217634

(2) 研究分担者

勝見章 (Katsumi Akira)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

特任講師

研究者番号：80378025