

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591137
 研究課題名（和文）活性酸素によるヒト白血球病幹細胞の増殖制御機構の解析と治療への応用
 研究課題名（英文）Regulation of human leukemic stem cell by reactive oxygen species (ROS) and its therapeutic applications in the clinics
 研究代表者
 木崎 昌弘 (KIZAKI MASAHIRO)
 埼玉医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20161432

研究成果の概要：白血病の治療は抗癌剤による化学療法が主体であるが、時として致命的な合併症や副作用が問題となる。近年、白血病に対す分子標的療法が注目されているが、本研究においてはより侵襲の少ない新たな白血病に対する分子標的療法の確立を目的とした研究を展開した。緑茶成分 EGCG は活性酸素 (ROS) を産生し、ミエロペロキシダーゼ (MPO) を介して最終的には DNA 障害活性の強いヒドロキシラジカルを産生することでヒト骨髄性白血病細胞のアポトーシスを誘導した。そこで、白血病の治療を目的として、CD34 陽性 CD38 陰性分画より、ヒト白血球幹細胞 (LSC) を単離し、EGCG によるヒト LSC に対する効果を検討し、白血病に対する新たな分子標的療法確立のための基礎的な検討を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：白血病、幹細胞、活性酸素、転写因子、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

白血病の治療を目指すためには白血病細胞を完全に根絶する必要がある (Total cell kill理論)。そのために、白血病の治療は抗がん剤による化学療法が主体であるが、抗がん剤の白血病細胞への感受性は低く、また多くの抗がん剤は細胞周期依存性に作用するため、静止期に存在すると考えられる白血病幹細胞 (Leukemic stem cell: LSC) に

は作用しない。LSCの概念は1997年、Dickらにより確立された。現状の化学療法による成人急性骨髄性白血病 (AML) における長期生存率は30%以下であり、多くの症例は再発を繰り返す。このことは、抗がん剤は細胞周期に入り急速に増殖する前駆細胞をターゲットにするために、静止期に存在するLSCを効果的に除去できない事を示している。したがって、正常造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell: HSC)

には影響せず、LSCのみを標的とした新たな白血病の治療法の開発は臨床的に急務と言える。そのためには、LSCの生物学的な特性を明らかにしなくてはならないが、これまでの研究によりLSCはHSCと同様にCD34⁺CD38⁻を示す細胞群であることが確認されている。LSCは自己増殖する能力を有し、HSCとは異なった表面抗原を発現していることも知られており、LSCのみに発現し、その増殖制御機構を決定する分子の探索が、LSCをターゲットとした白血病の治療に必須となる。さらに、HSCに関しては自己増殖制御機構に際して骨髄ニッチとの関係が明らかになりつつあり、LSCにおいても細胞自体の解析に加え、それらを取り巻く微小環境からの解析も望まれている。中でも、酸化ストレスが骨髄微小環境に及ぼす影響が注目されており、HSCの自己複製能の維持には活性酸素(ROS)による制御が必須であり、酸化ストレスによってHSCの静止期維持や自己複製能が障害されることが知られている。

以上のような現状を鑑みると、現状の白血病に対する化学療法には限界があり、治癒を目指した治療法の開発にはLSCを標的にした、しかも生体侵襲の少ない新たな概念の治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、これまでにわれわれが見出してきた ROS 産生能を有する種々の生理活性物質の HSC と LSC の増殖制御、アポトーシス誘導の相違を明らかにし、より LSC に選択性を持った ROS による LSC のアポトーシス誘導機構を明らかにする。さらに、われわれがすでに構築しているマウス白血病モデル及び新規免疫不全マウスに LSC を移植することにより作製する白血病モデルを用い、*in vivo*での ROS による LSC をターゲットにした治療法の可能性について明らかにする。これらの解析を通して、本研究は ROS を介した侵襲が少なく、LSC の生物学的特性に基づいたより根源的な白血病に対する新たな治療法を開発する基盤的な研究を進展させることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトLSCの同定とその生物学的特性を明らかにするために、種々の骨髄性白血病細胞株およびAML患者検体を用いて、CD34⁺CD38⁻分画を分離する系を確立し、既存のマーカーを用いて最も幹細胞としての活性を有する細胞群を同定する。さらに、われわれがすでに明らかにしているROS産生能を有する生理活性物質を用いて、その感受性を明らかにするとともに、さらに詳細なヒトLSCの生物学的特

性を検討する。以上を目的とし、以下の方法にて研究を遂行した。

- (1) ヒトLSCの同定とマウスへの生着能の検討
- (2) ヒトLSCのROSに対する感受性の検討
- (3) ROSにより誘導される転写因子の同定
- (4) ヒトLSC自己増殖におけるNF- κ Bシグナル伝達経路の関与に関する検討
- (5) ヒトLSC分画を新規免疫不全マウス(NOGマウス)に移植。ヒト白血病マウスモデルの作製。
- (6) *In vivo*におけるROS産生能を有する生理活性物質の効果の検討。
- (7) *In vivo*における候補化合物の血中濃度、尿中濃度の測定によりPK, PD解析を行う。また、各臓器における組織内濃度等の検討により詳細な体内動態を解析し、臨床試験実施の際の基礎的検討を行う。
- (8) 臨床試験を実施する際に必要な surrogate markerの検討。
- (9) これらの研究成果を総括し、LSCをターゲットにする新たな治療薬の候補となる生理活性物質を用いて、今後臨床試験を実施する際に必要な白血病症例の eligibilityや投与方法、投与量、end pointなどを具体的に検討する。

4. 研究成果

(1) 平成19年度

活性酸素(ROS)の白血病細胞に対する増殖制御機構について検討した。ROS産生能を有する緑茶成分カテキン誘導体EGCGは、活性酸素の産生を介して、白血病細胞のアポトーシスを誘導した。種々の白血病細胞を用いた検討により、EGCGは骨髄性白血病に感受性が高く、この際ミエロペロキシダーゼ(MPO)が重要な意義を有することが明らかになった。すなわち、MPO陰性K562細胞に完全長のMPO cDNAを導入し、MPO過剰発現株を樹立するとEGCGへの感受性を獲得した。また、MPO活性を欠如した dominant negative導入株では、EGCGの作用はキャンセルされた。ROSによる白血病細胞のアポトーシス誘導におけるMPOの意義について検討した所、骨髄性白血病細胞に発現するMPOは、EGCGにより産生される過酸化水素を強力なDNA障害活性を有するヒドロキシラジカルに変換することで、直接白血病細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。

(2) 平成20年度

EGCGによるROS産生と白血病細胞のアポトーシス誘導に関してさらに検討したところ、ROSは白血病細胞のDNA障害を直接惹起

するのみならず、セカンドメッセンジャーとして Fas を誘導することが明らかになった。さらに、急性骨髄性白血病 (AML) 患者細胞における MPO 活性と予後の相関を臨床的に検討したところ、AML 症例においては MPO 活性と予後は相関し、MPO 高発現症例では抗がん剤により ROS 産生が亢進し、化学療法に対する感受性が増強することが明らかになった。さらに、白血病患者骨髄細胞より CD34⁺CD38⁻ 分画を分離精製し、幹細胞としての特性を確認するとともに、この分画における細胞は EGCG に対して感受性を有し、濃度依存的にアポトーシス誘導を介して増殖が抑制された。

したがって、EGCG のように ROS 産生能を有する生理活性物質は LSC を標的にした新たな治療薬になる可能性を有する事が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Sagawa M, Nakazato T, Uchida H, Ikeda Y, Kizaki M: Cantharidine, a derivative of blister beetles, induces apoptosis in human multiple myeloma cells via inhibition of JAK/STAT pathway. *Cancer Sci.* 99:1820-1826, 2008. 査読有り

Uchida H, Inokuchi K, Watanabe R, Tokuhira M, Kizaki M: New therapeutic approaches to acute myeloid leukemia (AML). *Exp Opin Drug Dis.* 3:689-706, 2008. 査読有り

Kizaki M, Hashimoto Y: New tubulin-polymerization inhibitor derived from thalidomide: implications for anti-myeloma effect. *Curr Med Chem.* 15:754-765, 2008. 査読有り

Kizaki M: Biological significance of myeloperoxidase (MPO) on green tea component, EGCG-induced apoptosis: its therapeutic potential for myeloid leukemia. *Target Oncol.* 3: 45-50, 2008. 査読有り

Iguchi T, Noguchi-Yachide T, Hashimoto Y, Nakazato T, Sagawa M, Ikeda Y, Kizaki M: Novel tubulin-polymerization inhibitor derived thalidomide directly induces apoptosis of human multiple myeloma cells: possible anti-myeloma mechanism of thalidomide. *Int J Mol Med.* 21:163-168, 2008. 査読有り

Sato M, Sagawa M, Nakazato T, Ikeda Y, Kizaki M: A natural peptide, dolastatin 15, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 30:1453-1459, 2007. 査読有り

Nakazato T, Sagawa M, Yamato K, Xian M, Yamato T, Suematsu M, Ikeda Y, Kizaki M: Myeloperoxidase is a key regulator of oxidative stress-mediated apoptosis of myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 13:5436-5445, 2007. 査読有り

Iguchi T, Miyakawa Y, Saio K, Nakanishi M, Saya H, Ikeda Y, Kizaki M: Zoledronate induced S phase arrest accompanied by the DNA damage and the activation of ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 31:285-291, 2007. 査読有り

Xian M, Ito K, Nakazato T, Shimizu T, Chen C-K, Yamato K, Murakami A, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M: Zerumbone, a bioactive sesquiterpene, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of NB4 promyelocytic leukemic cells via a Fas/CD95- and mitochondria-mediated pathway. *Cancer Sci.* 98:118-126, 2007. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

木崎昌弘: 多発性骨髄腫に対する新たな分子標的療法の開発。腫瘍別シンポジウム 3 造血器腫瘍における分子・細胞療法の開発 第 67 回日本癌学会総会、平成 20 年 10 月、名古屋

Chizuka A, Uchida H, Xian MJ, Shimizu T, Ikeda Y, Kizaki M: A novel putative mechanism of anti-myeloma activity targeted against heat shock protein 27 by derivative of artemisinin, artesinate. 49th Annual Meeting of American Society of Hematolog. 平成 19 年 12 月、米国、Atlanta

佐川森彦、中谷綾、仲里朝周、内田秀夫、武藤章弘、池田康夫、木崎昌弘: IL-6 シグナル伝達経路阻害による金製剤 auranofin の多発性骨髄腫に対するアポトーシス誘導。第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会、平成 19 年 10 月、横浜

Sadahira K, Sagawa M, Uchida H, Ikeda Y, and Kizaki M: Gossypol induces apoptosis in myeloma cells by modulating phosphorylation of Bcl-2. 第 66 回日本癌学会、平成 19 年 10 月、横浜

Kizaki M: Oxidative stress-induced apoptosis in myeloid leukemia: biological significance of myeloperoxidase (MPO) and its implications for prognosis. Korean Society of Hematology The Fourth AML/MDS Working Party Symposium. 平成 19 年 9 月、Busan, Korea

〔図書〕(計 7 件)

木崎昌弘(編集):医療スタッフのための
白血病ハンドブック。中外医学社、東京、
2009. 総ページ数 236

木崎昌弘:急性リンパ性白血病。山口徹、
北原光夫、福井次夫(総編集)今日の治療
指針 2009年版。医学書院、東京。
pp498-501, 2009.

木崎昌弘:分子標的療法。村松正実(編集
代表) 分子細胞生物学辞典(第2版)、
東京化学同人、東京、pp803, 2008.

木崎昌弘:分化誘導療法。村松正実(編集
代表) 分子細胞生物学辞典(第2版)、
東京化学同人、東京、pp800-801, 2008.

木崎昌弘:急性骨髄性白血病。山口徹、北
原光夫、福井次夫(総編集)今日の治療指
針 2007年版。医学書院、東京、pp469-473,
2007.

木崎昌弘:造血器腫瘍の分類。押味和夫
(編) カラーテキスト血液学、中外医学社、
東京、pp304-311, 2007.

木崎昌弘:急性白血病。押味和夫(編)カ
ラーテキスト血液学、中外医学社、東京、
pp312- 329, 2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

木崎 昌弘(KIZAKI MASAHIRO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号:20161432