

研究種目：若手（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19790660
 研究課題名（和文） Notchシグナル阻害剤による造血器腫瘍の新規分子標的療法の開発
 研究課題名（英文）Development of Notch signaling inhibitor for hematological malignancies
 研究代表者
 増田 茂夫（MASUDA SHIGEO）
 自治医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10396749

研究成果の概要： Notch シグナル阻害剤としての γ -セクレターゼ阻害剤(GSI)がT-ALL(T細胞性急性リンパ性白血病)の皮下腫瘍モデルで奏功した。また GSI による腫瘍血管への効果を観察した。同モデルで想定されるメカニズムとしては、GSIにより(1)白血病細胞内在性のNotchシグナル抑制(cell autonomous な直接的効果)のほか、(2)腫瘍間質の微小環境におけるNotchシグナル抑制(cell non-autonomous な間接的効果)が挙げられた。特に後者はNotchシグナル抑制に伴う腫瘍血管の機能破綻の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：癌・分子標的療法・白血病・動物モデル・薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

1991年Ellisenらにより初めてヒト白血病とNotchシグナルの関連が報告された(Cell, 1991)。すなわち白血病の有する染色体転座の結果、Notchシグナルの恒常的活性化が観察され、これが白血病の病因である可能性が示唆された。このことは1996年Pearらによ

り動物実験で確認された(JEM, 1996)。マウス骨髄移植の系で検証され、恒常的活性化型Notch1を骨髄細胞に導入後移植した結果、高率にT細胞性白血病の発症をみた。

我々はこれまでに一貫して活性化型Notch1による腫瘍化のメカニズムにつき解析を行ってきた(Cancer Sci., 2005)。ひとつの機

序として活性型 Notch1 による TGF- β シグナルの抑制・破綻のモデルを提唱した。転写のコアクチベーターである p300 を介した TGF- β シグナルの抑制の結果、その細胞増殖抑制作用を喪失し腫瘍化へ導かれるというものである。このように Notch シグナルは 癌抑制経路である TGF- β シグナルを攪乱することで腫瘍化に寄与する機構を有することが判明した。

次に我々は亢進した Notch1 シグナルを抑制することにより抗腫瘍効果を得られるかを検証してきた。Notch は 1 回膜貫通型受容体であるがそのシグナルは隣接する細胞からのリガンド刺激により伝達され Notch 受容体はその transmembrane 部位で切断を受ける。細胞内領域は核へ移行、標的遺伝子の転写を活性化する。Notch シグナルをブロックする最も有効な方法として低分子化合物による切断阻害が挙げられる。同切断を司る酵素プレセニリンの γ -セクレターゼ活性を抑える「 γ -セクレターゼ阻害剤 (γ -secretase inhibitor; GSI)」により効果的な Notch シグナル阻害が可能である。

我々はこの GSI (Notch シグナル阻害剤) による *in vitro* での抗腫瘍効果をまず検証した。ヒト急性リンパ性白血病 (T-ALL) 細胞株のスクリーニングの結果、GSI 単剤で顕著なアポトーシス誘導促進を呈する細胞株 (HPB-ALL など) の存在を見出した。その後判明した学術情報によると、ヒト T-ALL の 50% 超の臨床症例 (小児) において Notch1 遺伝子の活性型変異が見い出されたという (Science, 2004)。我々も成人症例を含めある一定の頻度での同変異を見出し追報してきた (Leukemia, 2005)。またその活性化機序からも GSI 奏功性を十分に説明すると考えられた。以上を通してヒト T-ALL の新たな entity として Notch1 活性型腫瘍を提唱でき

る可能性が示唆されてきたと思われる。

2. 研究の目的

我々は T-ALL 細胞株に対する *in vitro* 反応性の結果をふまえ、GSI (Notch シグナル阻害剤) による *in vivo* 抗腫瘍効果とその作用機序を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト臨床症例と同様な Notch1 活性型変異を有し、*in vitro* での GSI 奏功性を備えるようなヒト T-ALL 細胞株 (DND-41, ALL-SIL, TALL-1, HPB-ALL など) を用いた Xenograft モデルを確立した。すなわち SCID マウスに同細胞株を皮下接種し、腫瘍増大後、GSI を連日経口投与した。腫瘍退縮のメカニズムの検証として、1 つは腫瘍の直接のアポトーシス作用、もう 1 つは腫瘍血管抑制作用が想定され、後者に対しては時系列サンプリングした腫瘍組織の CD31 免疫染色による血管内皮細胞の定量評価を行った。

4. 研究成果

上述のモデルで想定されるメカニズムとしては、GSI により (1) 白血病細胞内在性の Notch シグナル抑制 (cell autonomous な直接的効果) のほか、(2) 腫瘍間質の微小環境における Notch シグナル抑制 (cell non-autonomous な間接的効果) が挙げられる。今回、腫瘍縮小へ至るこのメカニズムを検証するために aN1 によるレスキュー実験を施行した。すなわち、 γ -secretase に依存しない aN1 を T-ALL 細胞株 (DND-41) に導入することにより安定株 (DND-41/aN1) を作製し、*in vitro* の GSI 感受性を調べたところ GSI 耐性の獲得が確認され、これにより先述の (1) の作用がキャンセルされると考えられた。次に Xenograft モデルによる *in vivo* 抗腫瘍効果

を検討したところ、DND-41/aN1 を用いた皮下腫瘍は GSI により部分的な増殖抑制を受けることが観察された。すなわちこの部分的抑制効果は先述の(2)に由来するものと考えられ、Notch シグナル抑制に伴う腫瘍血管の機能破綻の可能性が示唆された。またコントロール群との差異が先述の(1)に該当し、これがいわゆる白血病モデルでの真の GSI 効果に相当すると推測された。以上より、Notch シグナル阻害剤(GSI)はその抗腫瘍効果において高い有用性を備えるが、これは複数の機序を有するためであることが示唆された。

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7件)

1. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional natural killer cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of interleukin-15. *J Immunol*, 182(10): 6168-6178, 2009. 査読有り
2. Masuda S, Obara Y, Ageyama N, Shibata H, Ikeda T, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y. Co-Transplantation of MSC Improves the Engraftment of HSC after Auto-iBMT in Non-Human Primates. *Blood*. 112(11): 2321a, 2008. 査読有り
3. Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K,

Yamanaka S, Hanazono Y. ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant.* in press. 査読有り

4. Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, Ikeda T, Muramatsu S, Hanazono Y. Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of non-human primate ES cells into immunodeficient mice. *Cell Transplant.* 17(9): 1095-1102, 2008. 査読有り

5. Kishi Y, Inoue M, Tanaka Y, Shibata H, Masuda S, Ikeda T, Hasegawa M, Hanazono Y. Knockout Serum Replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells. *Cloning Stem Cells.* 10(3): 307-312, 2008. 査読有り

6. Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Masuda S, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. *Stem Cells Dev.* 17(2): 367-381, 2008. 査読有り

7. Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(1): 70-78, 2008. 査読有り

[学会発表] (計8件)

1. Masuda S, Co-transplantation of MSC

improves the engraftment of HSC after auto-iBMT in non-human primates. 第50回 米国血液学会総会 (ASH), 2008年12月7日 (San Francisco, USA)

2. 増田 茂夫, 霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進効果, 第70回 日本血液学会総会, 2008年10月11日 (京都・国立京都国際会館)

3. S Chiba, K Kumano, S Masuda, 第1回 The Notch and Cancer conference, 2008年10月5日~8日 (Athens, Greece)

4. 増田 茂夫, 霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進効果, 第7回 自治医科大学シンポジウム, 2008年8月30日 (栃木・自治医大)

5. 増田 茂夫, Notch シグナル亢進による白血病発症機構に基づいた in vivo 抗腫瘍効果の解析, 第6回 幹細胞シンポジウム, 2008年5月17日 (東京・学術総合センター)

6. 増田 茂夫, サルの血液をもつヒツジの作製: キメラ率向上をめざして移植ルートの検討, 第11回 日本異種移植研究会, 2008年2月23日 (大阪・国立循環器病センター)

7. 増田 茂夫, サルの血液をもつヒツジの作製: サルの血液をもつヒツジの作製: キメラ率向上をめざして前処置法の検討, 第11回 日本異種移植研究会, 2008年2月23日 (大阪・国立循環器病センター)

8. 増田 茂夫, The molecular mechanism of Notch-induced transformation and therapeutic potential of its inhibitor. 日本癌学会総会, 2007年10月3-5日 (横浜・パシフィコ横浜)

[図書] (計3件)

1. 増田茂夫, 先端医学社, 分子細胞治療 (「HOXB4発現レトロウイルスベクターを用いた幹細胞遺伝子治療において大型動物では

高率に白血病を発症する」), Vol.7, No.4; 382-383, 2008.

2. 増田茂夫, 文光堂, Medical Practice 新・図解救急・応急処置ガイド Vol.25, 臨時増刊号(「血小板減少症」), 953-954, 2008.

3. 増田茂夫, 科学評論社, 血液・腫瘍科 (「Notchシグナルと腫瘍血管新生」), Vol.55, No.2; 251-258, 2007.

[その他]

ホームページ等

<http://gantoku3.umin.jp/topics/masuda.html>

(科学研究費補助金「特定領域研究」がん研究に係わる特定領域研究ホームページ; 「Notchシグナル阻害剤による抗腫瘍効果(増田茂夫)」)

http://netplus.nikkei.co.jp/ssbiz/_techno/_te090414.html

http://www.oishasan.co.jp/oisha/topics/rireki/09_02_06.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 茂夫 (MASUDA SHIGEO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10396749

