

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390272

研究課題名(和文) 抗アポトーシス遺伝子 MCL-1 の白血病幹細胞化における役割

研究課題名(英文) FLT3-ITD upregulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation

研究代表者

宮本 敏浩 (TOSHIHIRO MIYAMOTO)

九州大学・大学病院・血液腫瘍内科・講師

研究者番号：70343324

研究成果の概要(和文)：抗アポトーシス蛋白 BCL-2 ファミリーの1つである MCL-1 は造血系に特異的に機能し、MCL-1 が造血幹細胞の生存維持に重要な役割を担っている。我々は MCL-1 の急性骨髄性白血病(AML)発症に関する役割について検討した。AML 幹細胞分画で MCL-1 が高発現しており、AML 幹細胞の生存を保証していると考えられた。さらに MCL-1 の発現を制御する伝達経路が破綻する FLT3 遺伝子変異を、AML 幹細胞が獲得すると、正常の FLT3 シグナルと異なった STAT5 を介した活性化経路を通して、MCL-1 発現を刺激し、より細胞生存を強化させることが示された。この経路を直接標的とすることで FLT3-ITD AML 幹細胞の根絶に有効であることが示された。MCL-1 が正常および白血病幹細胞を制御する分子メカニズムを詳細に解析することで、MCL-1 を標的とした新たな治療法の開発に繋げることが可能である。

研究成果の概要(英文)：MCL-1 is an essential survival factor for hematopoiesis. We show that this FLT3-dependent stem cell maintenance system plays a critical role in survival of leukemic stem cells (LSCs) in acute myeloid leukemia (AML). The CD34⁺CD38⁻ LSC fraction expresses high levels of FLT3 as well as MCL-1, as compared even to normal HSCs. Treatment with FLT3 ligand induced further MCL-1 upregulation in LSCs in all AML cases tested. Interestingly, the group of samples expressing highest levels of MCL-1 constituted AML with FLT3-internal tandem duplications (ITD). In FLT3-ITD AML cell lines, cells expressed a high level of MCL-1, and an inhibition of MCL-1 induced their apoptotic cell death. A tyrosine kinase inhibitor suppressed MCL-1 expression, and induced apoptosis that was reversed by the enforced MCL-1 expression. Transduction of FLT3-ITD into HSCs strongly activated MCL-1 expression through its STAT5 docking domains. This effect was completely abrogated when STAT5 activation is blocked. Acquisition of FLT3-ITD ensures LSC survival by upregulating MCL-1 via constitutive STAT5 activation that is independent of wild-type FLT3 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学分野

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：急性骨髄性白血病, 白血病幹細胞, MCL-1, FLT-3, アポトーシス

- 研究開始当初の背景
 - マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常造血幹細胞および各分化系統・分化段階の前駆細胞の純化法を開発した。これによりヒト白血病細胞におけるより詳細な表明解析が可能となった。
 - 高効率にヒト造血免疫系を再現可能な高度免疫不全 NOG マウス異種移植システムを構築した。これによりヒト白血病モデルマウスの作製が可能となった。
 - マイクロアレイや sRNAi ライブラリーセットを用いて網羅的遺伝子検索の結果、正常造血幹細胞(HSC)に MCL-1 が高発現することを見出した。MCL-1 は造血系においては BCL-2 ファミリーの中で最も重要な生存蛋白であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

- AML 幹細胞に発現する表面抗原に関して、機能的分子である FLT3 や TIM-3 等を用いて、より詳細に解析する。
- AML の病態形成に及ぼす MCL-1 の役割を解析する。
- FLT3 から MCL-1 活性化に至るシグナル経路を明らかにする。
- AML 幹細胞に発現する MCL-1 を直接標的とした新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常ヒト HSC, 骨髄系, リンパ系前駆細胞の純化方法を確立している。この手法を応用して、AML 臨床検体から白血病幹細胞分画の表面抗原を詳細に検討する。
- AML 臨床検体から、各分化段階の細胞分画を純化し、MCL-1 の発現量を比較定量する。
- FLT3- internal tandem duplication (ITD)変異細胞株を用いて、FLT3 または MCL-1 抑制による細胞生存や増殖への影響を検討する。また FLT3 下流のシグナル伝達経路を解明する。
- FLT3-ITD や FLT3-ITD mutant を作成し、純化した前駆細胞群に遺伝子導入し、MCL-1 の発現変化を検討する。

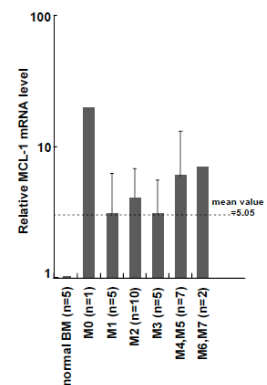
4. 研究成果

- 白血病幹細胞に発現する表面抗原解析
ヒト HSC および AML 幹細胞は CD34⁺CD38⁻Lin⁻ の同一分画内に存在する。詳細に表面抗原を解析したところ、HSC では CD90(Thy-1)の発現を認めるが、LSC では発現を認めなかった。また HSC のフェノタイプは CD45RA⁺IL3R^{dim} だが、AML 幹細胞では CD45RA⁺で IL3R^{high} であり、顆粒球単球

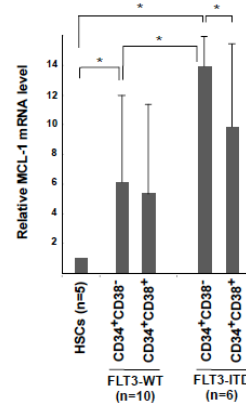
系共通前駆細胞(GMP)と同様の表面抗原の表現パターンであった。大多数の AML 症例で FLT3 が高発現し、AML における細胞増殖や生存に深く関与している。そこで AML 幹細胞における FLT3 の発現を解析したところ、すべての症例で FLT3 が高発現し、正常 HSC と比較し、その発現が高いことが明らかとなった。このことは白血病幹細胞の段階から FLT3 が発現し、AML の発症や維持に関与していると考えられた。

(2) AML 幹細胞は MCL-1 を高発現する

正常および AML 骨髄における MCL-1 の発現を mRNA, 蛋白レベルで解析した。正常骨髄と比較し、病型に関わらずすべての AML で MCL-1 が高発現していた (右図)。またヒト正常 HSC や骨髄球系前駆細胞で、



FLT3 シグナルが MCL-1 の発現を誘導し、その生存をサポートしていることを報告した。従ってその遺伝子変異により恒常的に FLT3 シグナルが活性化している FLT3-ITD 陽性 AML で、MCL-1 の発現が高いことが想定された。FLT3-ITD 変異 AML 症例では wild-type(wt)と比較して mRNA レベルで約 2 倍、蛋白レベルで約 3 倍 MCL-1 が高発現していることが明らかとなった。また正常造血において、MCL-1 は HSC で発現が高く、前駆細胞に分化するに従い MCL-1 の発現が減少する。AML においても最も未分化な幹細胞が濃縮される CD34⁺CD38⁻Lin⁻分画では、正常 HSC と比較し、FLT3-wt では約 6 倍、FLT3-ITD では約 14 倍と MCL-1 が高発現していた (右図)。細胞内を MCL-1 抗体で染色し、LSC における MCL-1 の発現を解析したが、同様の結果であった。AML 幹細胞で MCL-1 が高発現し、FLT3-ITD により顕著に発現が高くなることが明らかとなった。

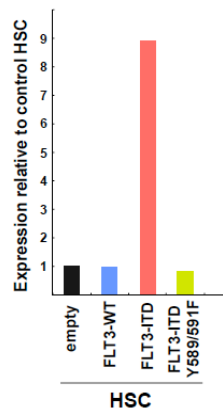


(3) FLT3 変異 AML における MCL-1 の機能解析

FLT3-ITD 変異細胞株 MV4-11 では、他の細胞株と比較して有意に MCL-1 が高発現していた。そこで MV4-11 に FLT3 阻害剤 PKC-412 を加えたところ、濃度・時間依存的に MCL-1 の発現が減少し、アポトーシス死する細胞が増加した。次に MV4-11 に MCL-1 shRNA を導入することで MCL-1 の発現を抑制したところ、mRNA レベルで 60%、蛋白レベルで 40% の MCL-1 の発現抑制効果が認められ、アポトーシスに陥る細胞が約 2 倍に増加した。次に MV4-11 に MCL-1 を過剰発現させて PKC-412 添加下に培養したところ、MCL-1 過剰発現させた細胞ではアポトーシス死が有意に減少した。以上から FLT3-ITD AML では、MCL-1 が白血病細胞の生存を支持することが明らかとなった。

(4) FLT3-ITD は MCL-1 の発現を誘導する

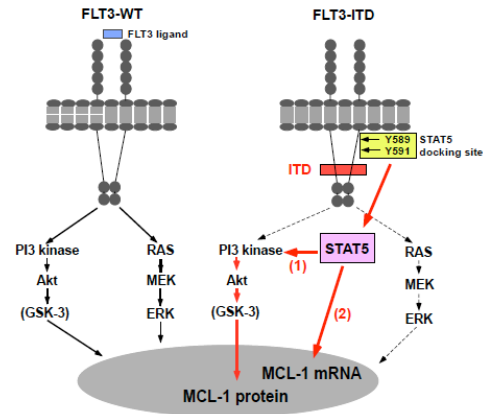
マウス HSC を純化してレトロウイルスで FLT3-ITD と STAT5 docking site を欠如した FLT3-ITD mutant を遺伝子導入し、MCL-1 の発現変化を検討した。FLT3-ITD ではコントロールや FLT3-wt と比較して、約 9 倍の mRNA の発現増加を認めた (右図)。STAT5 docking domain を欠如した FLT3-ITD mutant では、MCL-1 の発現が誘導されず、MCL-1 の発現には STAT5 の関与が重要であることが示唆された。



(5) MCL-1 発現における STAT5 の役割

次に MV4-11 に STAT5 siRNA を導入し、MCL-1 の発現変化を解析した。MCL-1 の発現が mRNA レベルで 25%、蛋白レベルで 10% に抑制された。また Akt のリン酸化が抑制されたことから、STAT5 は PI3-K の上流に位置していると考えられた。FLT3-wt や FLT3-ITD のシグナル伝達経路には PI3-K/Akt, RAS/MEK/ERK などの関与が想定されている。そこで様々なシグナル伝達阻害剤を MV4-11 の培養系に加え MCL-1 の発現変化を解析した。PI3-K の阻害剤である LY294002 を加えた場合、mRNA レベルでは MCL-1 の発現に変化を認めないものの、蛋白レベルで MCL-1 の発現が著明に抑制された。このことは PI3-K 経路において MCL-1 の発現が蛋白レベルで制御されていること

を示している。以上から FLT3-ITD シグナルが MCL-1 の発現を誘導する経路として、STAT5 が直接 MCL-1 の mRNA の発現を誘導する経路と PI3-K を活性化し蛋白レベルで MCL-1 の発現を制御する経路の 2 つが考えられた (下図)。



このように AML 幹細胞分画で MCL-1 が高発現し、AML 幹細胞の生存を保証していると考えられる。AML 幹細胞が FLT3-ITD を獲得すると、正常の FLT3 シグナルと異なり、STAT5 を介した活性化経路を通して、MCL-1 発現を刺激し、より細胞生存を強化させることが示唆される。この経路を直接標的とした治療が、FLT3-ITD AML 幹細胞の根絶に有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7:708-717, 2010
2. Mori Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. High incidence of HHV6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-1602, 2010.
3. Numata A, Miyamoto T, Akashi K, et al. Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. *Bone Marrow Transplant* 45:311-316, 2010.
4. Oku S, Miyamoto T, Akashi K, et al. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-344, 2010

5. Mori Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. High incidence of false-positive Aspergillus galactomannan test in multiple myeloma. **Am J Hematol** 85:449-51, 2010
6. Mori Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of Phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. **J Exp Med** 206:183-193,2009
7. Yoshimoto G, Miyamoto T, Akashi K, et al. FLT3-ITD upregulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. **Blood** 114:5034-43,2009
8. Miyamoto T, Akashi K. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. **J Immunol** 182:1490-9, 2009
9. Kohno K, Miyamoto T, Akashi K, et al. Infectious complications in patients receiving autologous CD34-selected hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune diseases. **Transplant Infect Dis** 11:318-323, 2009
10. Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K, et al. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/monocyte progenitor stages to maintain cell survival. **J Immunol**, 180:7358-7367,2008

[学会発表] (計6件)

1. 宮本敏浩: CLL の幹細胞 (シンポジウム). 第 50 回日本リンパ網内系学会 (2010. 6. 18 新潟)
2. Miyamoto T: Human leukemia stem cells (シンポジウム). 第 69 回 日本癌学会 学術総会 (2010. 9. 22 大阪)
3. 赤司浩一: 白血病幹細胞を考える (特別講演). 第 72 回日本血液学会総会 (2010. 9. 24 横浜).
4. 宮本敏浩: 急性骨髄性白血病に対する自家移植の位置付け (シンポジウム). 第 71 回日本血液学会総会 (2009. 10. 23 京都).
5. 宮本敏浩, 長藤宏司. 自家造血幹細胞移植の Update: 自己免疫疾患 (シンポジウム). 第 31 回日本造血細胞移植学会総会 (2009. 2. 6 札幌)
6. 赤司浩一: Stem cells in hematological malignancies (シンポジウム). 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009. 10. 1 横浜)

[図書] (計3件)

1. 宮本敏浩, 赤司浩一: 血液診療エキスパー

ト白血病. 白血病幹細胞. 中外医学社 pp312-316, 2009

2. 宮本敏浩, 長藤宏司: 血液診療エキスパー ト白血病. AMLにおける自家移植. 中外医学社 pp317-321, 2009
3. 宮本敏浩, 赤司浩一: 血液疾患 最新の治療. 白血病幹細胞に対する治療. 南江堂 pp32-36, 2010

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lnai.med.kyushu-u.ac.jp/>

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/idenshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本敏浩 (TOSHIHIRO MIYAMOTO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 70343324

(2) 研究分担者

赤司浩一 (KOICHI AKASHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 80380385

(3) 連携研究者

なし