

機関番号：12602
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590557
 研究課題名（和文） 白血病幹細胞の病態におけるNotchの役割の解明とその阻害薬の感受性検査法の開発
 研究課題名（英文） Role of Notch in the pathophysiology of leukemia stem cells and drug sensitivity tests for Notch inhibitors
 研究代表者
 東田 修二（TOHDA SHUJI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
 研究者番号：80251510

研究成果の概要（和文）：白血病を効果的に治療するには、白血病幹細胞の病態の理解が必要である。Notch シグナルは白血病幹細胞の自己複製の制御に重要である。本研究でNotch リガンドが白血病細胞のNotch 蛋白を活性化し、細胞増殖をきたす分子機序を明らかにした。さらにNotch シグナルを阻害するガンマセクレターゼ阻害薬が、白血病細胞の増殖を抑制することを示し、その効果を予測する検査法の基礎を開発した。

研究成果の概要（英文）：In order to treat leukemia effectively, we have to understand the pathophysiology of leukemia stem cells. Notch signaling is important for the regulation of self-renewal of leukemia stem cells. We found the molecular mechanism how the Notch ligand stimulation activates the Notch signaling and how it leads to cell growth. Moreover, we found that gamma-secretase inhibitors, which inhibit Notch signaling, suppress the growth of leukemia cells. We developed the methods to predict its effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学、白血病、幹細胞、Notch、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

白血病を治癒させるには、白血病幹細胞の分子病態を理解し、この幹細胞を制御する必要がある。これまでの我々の研究成果により、白血病幹細胞の自己複製能にはNotch シグナルが関与することがわかっている。本研究はこの知見を分子レベルで発展させ、Notch を標的とした新たな分子標的治療へつなげ、さらには、その薬剤感受性検査法を開発しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点にある。

- (1) 白血病幹細胞におけるNotch シグナルの役割を明らかにする。特に、Notch シグナルの活性化に伴う、細胞内蛋白の活性化や遺伝子発現の変化を複合的に理解する。
- (2) 薬剤などによるNotch シグナルの阻害が、白血病幹細胞の自己複製能を抑制できるかを明らかにする。
- (3) 抑制できるのであれば、白血病の新たな

分子標的治療になりうるので、この有効性を予測する薬剤感受性検査法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞の培養系に Notch リガンド蛋白を添加し、液体培養とコロニー形成法を組み合わせた方法により、自己複製能への効果を評価する。Notch リガンド刺激による、細胞内での Notch 蛋白の活性化、NF- κ B 経路の活性化、増殖や分化に関わる遺伝子発現の変化を解析する。

(2) 白血病細胞の培養系に Notch シグナルを阻害する薬剤や NOTCH 遺伝子に対する siRNA を添加して、細胞増殖や自己複製能への効果を調べる。効果がある場合には、この時に生じる蛋白活性化の変化や遺伝子発現の変化を調べる。

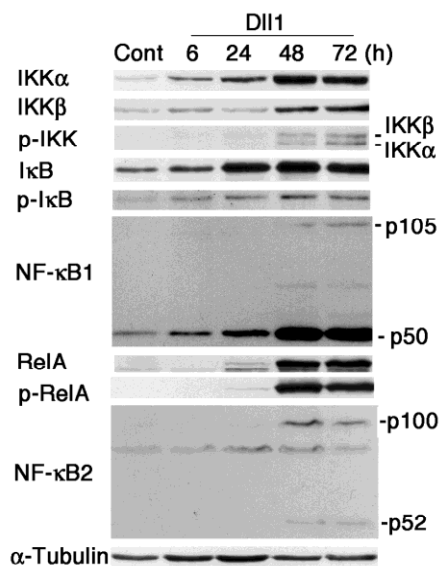
(3) 上記の結果をもとに、どのような方法を用いれば、白血病細胞に対する Notch 阻害薬の効果を予測する薬剤感受性検査となりうるかを検討する。

4. 研究成果

(1) Notch 活性化に伴う蛋白活性化や遺伝子発現の変化

白血病細胞を Notch リガンド蛋白で刺激すると、1 時間後から Notch 蛋白が分子内部で切断され、徐々に活性化することがわかった。この後、増殖、分化、細胞周期、stemness に関わる遺伝子の mRNA の発現量に変化することを見出した。一部の細胞では、Notch リガンド刺激により、NF- κ B 経路が活性化することがわかった。

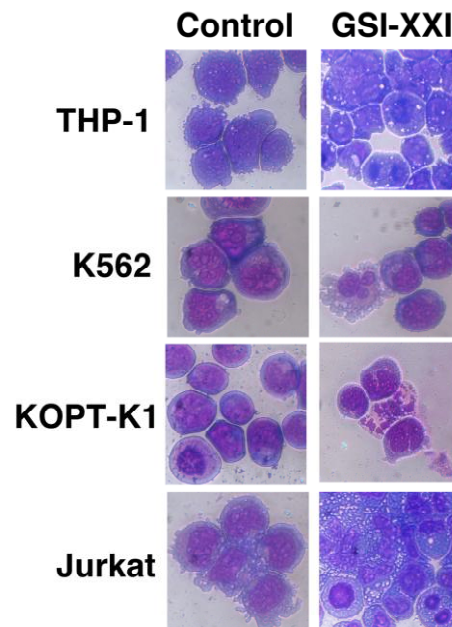
図 1 : 白血病細胞株 THP1 における Notch リガンド D111 刺激後の NF- κ B 経路の活性化



(2) Notch 阻害薬の白血病細胞増殖に対する効果

Notch 蛋白の分子内部での切断を阻害する作用を持つガンマセクレターゼ阻害薬を白血病細胞の培養系に添加すると、細胞増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。しかし、一部の細胞では、逆に増殖が促進することを見出した。このような逆の効果を示す細胞では、ガンマセクレターゼ阻害薬を添加後の NF- κ B 経路の構成分子の遺伝子発現の変化に違いがみられた。一部の赤白血病細胞株は、ガンマセクレターゼ阻害薬を添加することにより、芽球がより赤芽球様に分化することを見出した。

図 2 : ガンマセクレターゼ阻害薬 (GSI-XXI) の種々白血病細胞株の増殖やアポトーシス誘導に対する作用



(3) 薬剤感受性検査

ガンマセクレターゼ阻害薬の白血病細胞増殖に対する効果は、細胞によって多様であり、将来の臨床応用にあたっては、事前の薬剤感受性検査を行う必要がある。96 穴培養プレートで白血病細胞を培養し、種々の濃度のガンマセクレターゼ阻害薬を添加して、数日後に WST-1 アッセイを行うことによって、その効果を判定することができた。

(4) 白血病幹細胞における Wnt シグナルと Hedgehog シグナルの役割

Notch リガンド蛋白のほかにも、Wnt3A 蛋

白や Sonic hedgehog 蛋白も、一部の白血病幹細胞の自己複製能を促進することを見出した。さらに、Wnt シグナル阻害薬や Hedgehog シグナル阻害薬も白血病細胞の増殖を抑制することを報告した。

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 13 件)

- ①Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effects of Combination of Notch Inhibitor plus Hedgehog Inhibitor or Wnt Inhibitor on Growth of Leukemia Cells. *Anticancer Res.* 2011;31:893-896.
- ②Kawaguchi-Ihara N, Okuhashi Y, Itoh M, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the Self-renewal Capacity of Human Leukemia Cells by Sonic Hedgehog Protein. *Anticancer Res.* 2011;31:781-784.
- ③Okuhashi Y, Nara N, Tohda S. Effects of gamma-secretase inhibitors on the growth of leukemia cells. *Anticancer Res.* 2010;30:495-498.
- ④Ishigaki T, Sasaki K, Watanabe K, Nakamura N, Toyota S, Kobayashi H, Tohda S. Amplification of IGH/CCND1 fusion gene in a primary plasma cell leukemia case. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;201:62-65.
- ⑤Okuhashi Y, Itoh M, Arai A, Nara N, Tohda S. Gamma-secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. *Anticancer Res.* 2010;30:4071-4074.
- ⑥東田修二. 白血病の分子標的治療のケミカルバイオロジー. *臨床化学* 2010;39:234-237.
- ⑦Kawahara T, Kawaguchi-Ihara N, Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Cyclopamine and quercetin suppress the growth of leukemia and lymphoma cells.

Anticancer Res. 2009;29:4629-4632.

⑧Fu L, Katsube K, Tohda S. Transition of cleaved Notch1 and gene expression changes in myeloblastic leukemia cells stimulated with notch ligands. *Anticancer Res.* 2009 ;29:3967-3970

⑨Itoh M, Fu L, Tohda S. NF-kappaB activation induced by Notch ligand stimulation in acute myeloid leukemia cells. *Oncol Rep.* 2009 ;22:631-634.

⑩東田修二. 白血病の病態における Notch の機能解析. *臨床病理* 2009;57:351-356.

⑪Kawaguchi-Ihara N, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the self-renewal capacity of human acute leukemia cells by Wnt3A. *Anticancer Res.* 2008; 28:2701-2704.

⑫Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, Tanaka H, Okado T, Kuwahara M, Tohda S, Sakano S, Sasaki S. Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury. *Kidney Int* 2008;73:1240-1250.

⑬Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M. Negative feedback regulation of colitogenic CD4+ T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1491-1503.

[学会発表] (計 4 件)

- ①奥橋佑基, 石垣知寛, 伊藤真以, 東田修二. 白血病細胞の増殖における Notch シグナルと Wnt, Hedgehog シグナルとの相互作用. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会 2010. 9. 10、東京
- ②東田修二. 白血病の分子標的治療のケミカルバイオロジー. 第 49 回日本臨床化学会

学術集会ワークショップ、2009.9.18、長崎

③奥橋佑基、河原達雄、井原寛子、星百合子、東田修二。Notch シグナル阻害剤による赤白血病細胞の赤芽球分化誘導効果。第56回日本臨床検査医学会総会、2009.8.28、札幌

④東田修二。日本臨床検査医学会学会賞生命科学賞受賞、受賞講演。白血病の病態における Notch の機能解析。第55回日本臨床検査医学会総会、2008.11.28、名古屋

〔図書〕(計2件)

①東田修二。急性白血病、血友病など17項目「内科診断学第2版」福井次矢、奈良信雄編、医学書院;2008. pp968-990.

②東田修二。可溶性 IL-2 レセプター、顆粒球コロニー刺激因子など15項目。「最新臨床検査項目辞典」櫻林郁之介、熊坂一成監修、医歯薬出版;2008. pp606-614.

〔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.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab_graduate-school.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東田 修二 (TOHDA SHUJI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 80251510

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし