

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02950

研究課題名(和文) 腫瘍細胞と骨髄微小環境の相互作用を標的とする新規造血器腫瘍制御法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies targeting the interaction between tumor cells and their unique microenvironments for hematological malignancies

研究代表者

国崎 祐哉 (Kunisaki, Yuya)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80737099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：微小環境の変化が造血器腫瘍動態に与える影響の解析と腫瘍-微小環境相互作用を標的とした新たな抗腫瘍薬の開発を目的に、以下示す2つを目的として研究を行った。(1)加齢と造血器腫瘍骨髄における微小環境変化の比較を行なった。間葉系幹前駆細胞や血管内皮細胞集団のRNAシーケンスを行い双方で有意に上昇を認めた因子を特定することができた。(2)微小環境-腫瘍細胞相互作用を標的とした抗腫瘍薬スクリーニングを行なった。腫瘍細胞の持つ概日リズムを修飾する化合物のスクリーニングを行うことで、微小環境-腫瘍細胞相互作用を標的とした抗腫瘍薬の探索を行い、数種類の化合物を候補として同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規シングルセルシーケンスであるDrop-seqと3次元イメージングという2つの新技術を組み合わせた解析により細胞間の相互作用の理解し、間葉系幹細胞をその機能により分類することができた本研究成果は、骨修復や骨病変を来す病態のより深い理解、ひいては効率的な骨再生や新たな骨病変治療薬の開発にも繋がると期待される。更に、加齢に伴う「ニッチ」と幹細胞相互作用の変化を解明し、その知見をヒト造血器腫瘍に応用することで、微小環境を標的とした新たな造血器腫瘍治療法の開発へも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Functions of hematopoietic stem cells (HSCs) required for the hematopoietic homeostasis are tightly regulated by their unique microenvironments (niches) in bone marrow.

Previous studies have revealed that bone marrow mesenchymal stem cells are an essential player to keep HSCs quiescent that is a key behavior of stem cells to protect them from being exhausted and malignant transformation by exogenous insults. This study reveals the contribution of bone marrow microenvironments altered with aging to the pathogenesis, clonal evolution and leukemic transformation in myelodysplastic syndrome (MDS).

Leukemia stem cells are regulated by circadian clock genes whose regulator is a therapeutic target for leukemia. Previously, by performing a screen for small compounds that inhibited the circadian clock, we found a CK2 inhibitor, G0289 exhibiting inhibitory effects on leukemia cell lines in vitro.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 造血微小環境 加齢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は生涯にわたって自己複製を行うことにより、血液細胞の供給、幹細胞自身の維持を行っている。造血幹細胞の機能は、骨髄内の特殊な環境(造血幹細胞ニッチ)により制御を受けている。造血幹細胞ニッチの構成細胞の1つである間葉系幹細胞は血管を包囲する形で「pericyte」として存在し、多分化能、組織再生能を持つことに加えて、造血幹細胞の維持に必須の因子を多く産生し、造血幹細胞と間葉系幹細胞の相互作用が骨髄造血を維持するために非常に重要であることが明らかとなっている。また、「pericyte」は、胎児肝においても幹細胞増殖を支持するとともに、出生後も tip cell として血管構築を先導するなど造血発生や血管新生においても重要な役割を果たしている。このように、組織微小環境の構造や機能は、複雑かつ多彩であり、微小環境を構成する細胞間の相互作用についても十分な理解は得られていない。更に、加齢にともなう造血機能の低下の原因として、骨髄微小環境の加齢に伴う機能的変化という外的要因が目ざされている。また、「ニッチ」の変化が造血細胞の悪性形質転換を誘導、促進する可能性も示されており、その機序も、増殖プールサイズの増加、遺伝子不安定化による遺伝子変異の集積、クローン造血の誘導など非常に複雑である。マウスモデルを用いた実験で、細胞傷害や加齢は、「ニッチ」を構成する間葉系細胞に炎症性変化を起こすことで、造血器腫瘍発症の母地(造血幹前駆細胞の悪性形質転換やクローン選択を促進する「変異原性微小環境」)を形成する可能性が示唆されている。逆に、白血病細胞が造血幹細胞ニッチを質的に変化させることで、白血病細胞に有利な機能を持つ骨髄微小環境(白血病ニッチ)を形成することも示されている。骨髄間葉系幹細胞は、遺伝子改変マウスなどのレポーターや表面マーカーで標識、分離されるが、その発生起源や分化段階において不均一性を持つ細胞群であり、この不均一性の解析による機能的な細分化が造血システムを制御する微小環境の理解には不可欠である。骨髄微小環境を構成する細胞は非常に多彩であるが、細胞の希少性より詳細な解析は行われておらず、その機能的な細分化は重要な課題である。

### 2. 研究の目的

(1) 骨髄「pericyte」機能異常モデルマウスを用いて、微小環境異常が正常造血に与える影響を明らかにする。骨髄「pericyte」の異常が、血管内皮細胞に与える影響を、3次元イメージングによる骨髄血管構造の観察及び、Drop-seq を用いたシングルセル遺伝子プロファイリングにより同定し、ニッチの構成細胞である「pericyte」と血管内皮細胞との相互作用が正常造血をどの様に支持しているかを明らかにする。

(2) 微小環境の変化が造血器腫瘍動態に与える影響の解析と腫瘍-微小環境相互作用を標的とした新たな抗腫瘍薬を開発する。造血器腫瘍モデルマウスを用いて、目的(1)で同定した「pericyte」と血管内皮細胞との相互作用がどの様に変化するかを詳細に解析することにより、腫瘍動態に影響を与える因子を特定し、微小環境の修飾による造血器腫瘍制御法を開発する。更に、微小環境の概日リズムが正常造血機能を制御する、また白血病細胞が概日リズム遺伝子の制御を強く受けている、という2つの特性を踏まえ、概日リズムスクリーニングにより抗白血病作用を持つ化合物を同定している。本課題ではこの新規化合物が、新規ヒト白血病治療薬の開発のためのシーズとなるかの検証を行う。

### 3. 研究の方法

(1)モデルマウスにおける骨髄微小環境構成細胞(血管、骨形成、造血幹細胞)を解析する

加齢に伴い骨髄間葉系幹細胞においてテロメア保護分子 POT1a の発現の著明な低下が認められ

た。POT1a は、シェルタリン複合体の構成分子として、テロメアにおける DNA 損傷反応を防止する一本鎖 DNA 結合タンパク質である。この POT1a を間葉系幹細胞から欠損させるマウス(NG2-cre/POT1a<sup>flox/flox</sup>)を作製し、間葉系幹前駆細胞「pericyte」の機能異常が骨髄血管の構造や機能にどのような影響を及ぼすかを、3次元イメージングを用いた骨髄血管構造変化の観察や血管内皮細胞の遺伝子プロファイリングにより詳細に分析し、血管周囲間葉系幹前駆細胞と血管内皮細胞との相互作用を明らかにする。

(2) 加齢と造血器腫瘍骨髄における微小環境変化の比較より共通因子を同定する。

予備実験として、7週齢と120週齢の高齢マウス骨髄や骨髄増殖性疾患類似病態を示す血球特異的 Ragnase-1 欠損マウスから既知のマーカーでソートした間葉系幹前駆細胞や血管内皮細胞集団の RNA シーケンスを行い双方で有意に上昇を認めた因子を特定する。

(3) 微小環境-腫瘍細胞相互作用を標的とした抗腫瘍薬スクリーニングを行う

提案者は、以前の研究において、各臓器(細胞微小環境)は、アドレナリン作動神経を介して日内変動を示しており、造血幹細胞を含む血液細胞(免疫担当細胞)の体内動態や分布も微小環境の持つ概日リズムの影響を強く受けていることを示した。近年、白血病細胞においても概日リズム制御遺伝子の重要性を示す研究結果が報告されている。そこで、腫瘍細胞の持つ概日リズムを修飾する化合物のスクリーニングを行うことで、微小環境-腫瘍細胞相互作用を標的とした抗腫瘍薬の探索を行った。名古屋大学 トランスフォーマティブ生命科学研究所 廣田毅先生との共同研究において、小分子化合物ライブラリーの概日リズムスクリーニングによりカゼインキナーゼ II の活性を特異的に阻害する化合物 G0289 を同定し、白血病細胞株に対して増殖抑制効果を示すことを発表している。G0289 の生体内安定性を評価し、より安定した形に改変した誘導体を合成を試み、白血病細胞株に対して増殖抑制効果を示すこと及び白血病モデルマウス(C1498 マウス白血病細胞株移入モデル)において生存延長効果を示すかどうかを確認する。

#### 4. 研究成果

(1)モデルマウスにおける骨髄微小環境構成細胞(血管、骨形成、造血幹細胞)を解析する

これまでの研究より加齢因子候補として同定された POT1a を間葉系幹細胞から欠損させるマウス(NG2-cre/POT1a<sup>flox/flox</sup>)を作製したところ、骨形成不全を認めた。NG2-cre/POT1a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄より間葉系幹細胞分離ソートし、RNA シーケンスにより遺伝子発現解析を行ったところ、GO 解析により骨や骨格形成に関わる遺伝子群の発現低下が認められた。更に、NG2-cre/POT1a<sup>flox/flox</sup> マウスでは、末梢血、骨髄において B 細胞の減少を認め、B 細胞系細胞の減少、骨髄球系の増加といった骨髄球系に偏った造血、骨形成不全を認めるなど、老化における変化と類似した表現系を示した。更に、骨髄組織の3次元イメージングによる血管構造の詳細な計測、解析を行い、高齢マウス骨髄において、骨髄洞は増加しているというように、血管構造が再構築されているという結果が得られた。今後の研究では、NG2-cre/POT1a<sup>flox/flox</sup> マウスを間葉系ニッチの老化モデルとして用いて、細動脈、骨髄洞血管内皮細胞の遺伝子プロファイリングを行うことで、間葉系ニッチ異常をトリガーとして起こる血管内皮機能の変化を経時的に解析し、骨髄微小環境の老化を規定する因子を明らかにする。POT1a 欠損骨髄間葉系幹細胞では、酸化的リン酸化の障害を認めた。ミトコンドリア DNA の維持に必須のミトコンドリア転写因子 A(mitochondrial transcription factor A:TFAM)を過剰発現させたマウスは、心不全の発症や肥満が抑制され、TFAM は、老化を抑制する働きを持つ可能性が示されている。更に、TFAM 高発現マウス脂肪組織由来の間葉系幹細胞が産生する細胞外小胞(Extracellular vesicles; EVs)が、autocrine かつ/もしくは paracrine 機構で、ミトコンドリアの活性化を介して、褐色脂肪細胞への分化を誘導し、抗肥満・抗老化効果を示すことも報告し、この EVs が抗老化物質を含む可能

性が示されているため、TFAM 高発現マウス由来の骨髄間葉系幹細胞の EVs に含有されるタンパク質を同定することで、抗老化物質の探索を行なった。TFAM 高発現間葉系幹細胞の培養上清から Minimate™ EVO TFF システムを用いて EVs の精製・濃縮を行い、定量的プロテオミクス技術 (Evosep one/Q-Exactiv システム) を用いて高深度・高感度の網羅的タンパク質プロファイリングを行った結果、TFAM 高発現細胞由来の EVs を特徴づけるタンパク質が同定され、ネットワーク解析、GO 解析により、アクチン細胞骨格に関わるタンパク質が多く含まれていることが明らかとなった。

(2) 加齢と造血器腫瘍骨髄における微小環境変化の比較より共通因子を同定する。

急性骨髄性白血病(AML)による骨髄微小環境変化について解析するため、MLL-AF9 遺伝子導入による白血病モデルマウスの骨髄血管構造を観察したところ、対照マウス骨髄と比較してより密な骨髄洞構造が見られた。更に、間葉系幹前駆細胞もしくは骨芽細胞を蛍光標識するマウスに、AML を発症させることにより、AML 骨髄では NG2-cre かつ Collagen1.1-cre で標識される間葉系細胞分画が増加することを見出している。AML マウスより間葉系幹前駆細胞を分離し、qPCR 解析を行ったところ、Angpt1、Angpt2 といった血管修飾に関わる因子の発現に有意な変化が認められ、AML を支持する骨髄微小環境における間葉系幹前駆細胞「pericyte」と血管内皮細胞との相互作用の存在が示唆された。

(3) 微小環境-腫瘍細胞相互作用を標的とした抗腫瘍薬スクリーニングを行う

造血幹細胞を含む血液細胞(免疫担当細胞)の体内動態は、微小環境の持つ概日リズムの影響を強く受けている。この概日リズムは自律神経により支配されており、骨髄の加齢変化としてアドレナリン作動神経の減少、それに伴う間葉系幹ニッチ細胞の機能低下が報告されている。これまでの研究で、概日リズムスクリーニングによる抗白血病効果を示す化合物の探索を行なった結果、カゼインキナーゼ II の活性を特異的に阻害する化合物 G0289 を同定し、生体内でより安定した形に改変した誘導体の合成にも成功し、白血病モデルマウスにおいて有意に生存延長効果を示すことを確認することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyawaki Kohta, Kato Koji, Sugio Takeshi, Sasaki Kensuke, Miyoshi Hiroaki, Semba Yuichiro, Kikushige Yoshikane, Mori Yasuo, Kunisaki Yuya, Iwasaki Hiromi, Miyamoto Toshihiro, Kuo Frank C., Aster Jon C., Ohshima Koichi, Maeda Takahiro, Akashi Koichi	4. 巻 6
2. 論文標題 A germinal center-associated microenvironmental signature reflects malignant phenotype and outcome of DLBCL	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2388 ~ 2402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021004618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yasuo, Harada Takuya, Yoshimoto Goichi, Shima Takahiro, Numata Akihiko, Jinnouchi Fumiaki, Yamauchi Takuji, Kikushige Yoshikane, Kunisaki Yuya, Kato Koji, Takenaka Katsuto, Akashi Koichi, Miyamoto Toshihiro	4. 巻 116
2. 論文標題 Risk factors for late cytomegalovirus infection after completing letermovir prophylaxis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03348-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Kochi Yu, Semba Yuichiro, Ohishi Maki, Irifune Hidetoshi, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Sugio Takeshi, Sakoda Teppei, Miyawaki Kohta, Kato Koji, Soga Tomoyoshi, Akashi Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Human acute leukemia utilizes branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008242	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakoda Teppei, Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Irifune Hidetoshi, Harada Takuya, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Kato Koji, Akashi Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 TIM-3 signaling hijacks the canonical Wnt/ -catenin pathway to maintain cancer stemness in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008405	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Henzan Tomoko, Yamauchi Takuji, Yamanaka Ikumi, Sakoda Teppei, Semba Yuichiro, Hayashi Masayasu, Kikushige Yoshikane, Mishima Hiroyuki, Ishimura Masataka, Koga Yuhki, Miyamoto Toshihiro, Ohga Shouichi, Akashi Koichi, Maeda Takahiro, Kunisaki Yuya	4. 巻 114
2. 論文標題 Granulocyte collection by polymorphonuclear cell-targeting apheresis with medium-molecular-weight hydroxyethyl starch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 691 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03207-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Ikumi, Yamauchi Takuji, Henzan Tomoko, Sakoda Teppei, Miyamoto Kyoko, Mishima Hiroyuki, Ono Hiroaki, Koga Yuhki, Nakashima Yasuhiro, Kato Koji, Miyamoto Toshihiro, Mizuno Shinichi, Ogawa Yoshihiro, Ohga Shouichi, Akashi Koichi, Maeda Takahiro, Kunisaki Yuya	4. 巻 114
2. 論文標題 Optimization of lymphapheresis for manufacturing autologous CAR-T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 449 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03191-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Kiwamu, Kikushige Yoshikane, Ishihara Daisuke, Yamamoto Shunsuke, Kawano Gentaro, Tochigi Taro, Miyamoto Toshihiro, Sakoda Teppei, Christoforou Andy, Kunisaki Yuya, Fukata Mitsuhiro, Kato Koji, Ito Takumi, Handa Hiroshi, Akashi Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Thrombospondin-1 is an endogenous substrate of cereblon responsible for immunomodulatory drug-induced thromboembolism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 785 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2023010080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Song Xiaoyu, Nihashi Yuma, Yamamoto Masamichi, Setoyama Daiki, Kunisaki Yuya, Kida Yasuyuki S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Exploring the Role of Desmoplastic Physical Stroma in Pancreatic Cancer Progression Using a Three-Dimensional Collagen Matrix Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering10121437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Kentaro, Kunisaki Yuya, Hosokawa Kentaro, Gotoh Kazuhito, Yao Hisayuki, Yuta Ryosuke, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Kikushige Yoshikane, Stumpf Patrick S., MacArthur Ben D., Kang Dongchon, Akashi Koichi, Ohga Shouichi, Arai Fumio	4. 巻 6
2. 論文標題 POT1a deficiency in mesenchymal niches perturbs B-lymphopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05374-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Irifune Hidetoshi, Kochi Yu, Miyamoto Toshihiro, Sakoda Teppei, Kato Koji, Kunisaki Yuya, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 114
2. 論文標題 <scp>GPAM</scp> mediated lysophosphatidic acid synthesis regulates mitochondrial dynamics in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3247 ~ 3258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15835	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Kenta, Hamazaki Nobuhiko, Hamada Norio, Nagamatsu Go, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Nosaka Yoshiaki, Ishikura Yukiko, Kitajima Tomoya S., Semba Yuichiro, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Akashi Koichi, Saitou Mitinori, Kato Kiyoko, Hayashi Katsuhiko	4. 巻 615
2. 論文標題 Generation of functional oocytes from male mice in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 900 ~ 906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05834-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakoda Teppei, Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Irifune Hidetoshi, Harada Takuya, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Kato Koji, Akashi Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 TIM-3 signaling hijacks the canonical Wnt/ -catenin pathway to maintain cancer stemness in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2053 ~ 2065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008405	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Kochi Yu, Semba Yuichiro, Ohishi Maki, Irifune Hidetoshi, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Sugio Takeshi, Sakoda Teppei, Miyawaki Kohta, Kato Koji, Soga Tomoyoshi, Akashi Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Human acute leukemia uses branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3592 ~ 3603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008242	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------