

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月5日現在

機関番号：16201  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591042  
 研究課題名（和文）AMLの低酸素環境下抗癌剤耐性の機序解明と低酸素選択的薬剤による根治療法の開発  
 研究課題名（英文）Elucidation of chemoresistance in hypoxic condition and a development of radical treatment in AML cells by hypoxia specific inhibitory drugs  
 研究代表者  
 松永 卓也（MATSUNAGA TAKUYA）  
 香川大学・医学部・教授  
 研究者番号：70260768

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病(AML)における抗癌剤治療後の再発の主因とされている「骨髄微小残存病変」の一因としてAML細胞の「低酸素環境下における抗癌剤耐性」を提唱するとともに、通常の抗癌剤に「低酸素選択的薬剤」を単独で追加、あるいは「低酸素選択的薬剤」と「細胞接着依存性抗癌剤耐性（Cell adhesion mediated-drug resistance (CAM-DR) 阻害剤」を併用して追加する新しい根治療法を開発した。

研究成果の概要（英文）：It was demonstrated that the chemoresistance in hypoxic condition might be a cause of minimal residual disease in bone marrow after chemotherapy in AML. We developed a radical treatment of AML with (i)combination of anticancer drugs and hypoxia specific inhibitory drug, or (ii)combination of anticancer drugs, hypoxia specific inhibitory drug and CAM-DR inhibitory drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	900,000	270,000	1,170,000
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：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学、抗癌剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病（AML）は抗癌剤感受性が高く、寛解導入療法により約80%の症例が

完全寛解となるが、再発が多く5年無病生存率は20-30%と予後不良である。AMLの抗癌剤治療後の再発の主因は、骨髄微小残存病変

(骨髄MRD)である。申請者は、AML細胞は骨髄ストローマ細胞と接着する事で抗癌剤耐性となり骨髄MRDの原因となるという仮説を立て、平成13年度の特領域研究(C)による研究助成でそれを実証した。即ち、(1)AML細胞はVLA-4を介してストローマ細胞の細胞外マトリックス(フィブロネクチン(FN))と接着するとPI3k/AKTシグナルの活性化を介したBcl-2の発現増強によりアポトーシスから回避する事、(2)VLA-4陰性患者群の長期生存率がVLA-4陽性患者群よりも有意に高い事、(3)免疫不全マウスを用いて作製したヒトAML骨髄MRDモデルに抗VLA-4抗体と抗癌剤を併用投与すると、抗癌剤単独投与では達成不能な治癒が得られる事、を明らかにした(Nature Medicine 2003, 9, 1158-1165)。更に、申請者は平成15年度保険医療分野における基礎研究推進事業研究プロジェクトによる研究助成で、上記の抗ヒトVLA-4マウス抗体からヒト化キメラ抗VLA-4抗体を作製することに成功し、同抗体を抗癌剤と併用投与するとヒトAML骨髄MRDモデルマウスのMRDを根絶できる事を明らかにした。更に、申請者は平成17年度の特領域研究(がん治療)による研究助成で、VLA-4活性化阻害剤であるFNIII14ペプチドを抗癌剤と併用投与すると、ヒトAML骨髄MRDモデルマウスのMRDを根絶可能な事を明らかにした(Leukemia 2008, 22, 353-360)。更に申請者は、平成18年度の特領域研究(がん治療)による研究助成で、患者AML細胞をNOD/SCIDマウスに移植して、「診断時AMLモデル」、「治療後骨髄MRDモデル」、「再発モデル」を作製し、抗癌剤・VLA-4阻害剤併用療法の有効性を明らかにした。

固形癌は血管新生を伴い、新生血管からの酸素の補給は、癌の発育・進展にとって不可欠である。しかし、癌組織の血流は一様では

なく、血管構築異常や間質圧上昇のために血流不全を生じ、低酸素領域が存在する。その際、低酸素状態に陥った癌細胞の多くは死滅するが、一部は低酸素環境に適応して生き残り、より悪性度の高い癌細胞へ性質を変換し、転移能の亢進や抗癌剤抵抗性を獲得する。抗癌剤治療後の骨髄MRDである白血病(幹)細胞が存在すると考えられている骨内膜近傍のニッチ(Ishikawa F et al. Nat Biotechnol 11, 1315-1321, 2007)は、低酸素環境にあると報告されている(Parmar K et al. Proc Natl Acad Sci USA 104, 5431-5436; Suda T et al. Cancer Sci 7, 1166-1172, 2009)。即ち、AMLでは抗癌剤治療後の骨髄MRDをもたらすメカニズムとして、上記のストローマ細胞とAML細胞の接着に起因する抗癌剤耐性(CAM-DR)に加えて、低酸素環境下における抗癌剤耐性の存在が推測される。

固形癌ではHIF-1・(Hypoxia-inducible factor-1・)が低酸素状態に特有な遺伝子発現調節のkey factorである事が知られている(Oliver S et al. J Natl Cancer Inst 96, 2004; McMahon S et al. J Biol Chem 280, 2005; Munoz-Najar UM et al. Oncogene 2523, 2006; Zhong H et al. Cancer Res 60, 2000; Semenza GL et al. Biochem Pharmacol 64, 2002)。例えば、胃癌細胞株では、低酸素環境で誘導されるHIF-1・・の発現亢進によりBcl-2/Bax比上昇、p-gp(MDR1)及びMRP1の発現増強がもたらされる結果、抗癌剤耐性となる事が報告されている(Liu L et al. Cancer Sci 99, 121-128, 2008)。

Preliminaryな実験データではあるが、申請者は、AML細胞株であるK562(急性赤芽球性白血病)およびMeg-01(急性巨核芽球性白血病)を酸素濃度1%の低酸素環境下で培養すると、酸素濃度20%の正常酸素環境

下で培養した場合には認められない HIF-1 $\cdot$  の発現が認められ、その発現は培養開始 8 時間後にピークに達する事を見出している。更に申請者は、K562 と Meg-01 を酸素濃度 1% 及び 20% の条件下で 8 時間培養した後に、抗癌剤である daunorubicin (DNR) あるいは cytosine arabinoside (Ara-C) を添加して 3 日間培養した後に MTT-assay で生細胞を算定する方法で IC50 を算出したところ、1% 酸素濃度で培養した白血病細胞は、20% 酸素濃度で培養した白血病細胞に比べて IC50 が 3-10 倍高値を示すこと、即ち抗癌剤耐性を獲得する事を見出している。これまで固形癌の細胞株においては、低酸素環境下における抗癌剤耐性の報告が数多くなされている。例えば、精巣胚細胞腫瘍における cisplatin, etoposide (VP-16), bleomycin, mitomycin-C 耐性 (Koch et al. Br J Cancer 89, 2003), 膵臓癌における gemcitabine 耐性 (Yokoi et al. Clin Cancer Res 10, 2003), 胃癌における vincristine, 5-FU, cyclophosphamide, VP-16, doxorubicin (ADR) 耐性 (Cancer Sci 99, 2008), 大腸癌における VP-16, oxaliplatin 耐性 (Molecular and Cellular Biology 24, 2004), 乳癌における DNR, ADR, VP-16, mitoxantrone (MIT) 耐性 (Mol Cancer Ther 7, 2008) 等である。しかし、急性白血病をはじめとする造血器悪性腫瘍においては、低酸素環境下の抗癌剤耐性については報告されておらず、更に患者由来の新鮮白血病細胞を用いた報告もなされていない。つまり、本研究は極めて新奇性が高いと考えられる。更に、低酸素環境下では正常酸素環境下に比べて、腫瘍細胞および白血球 (リンパ球, 好中球, 単核球) においてインテグリン等の接着分子が活性化されることで、間質細胞への接着性が亢進する事が報告されている (Koike T et al. Proc Natl Acad

Sci USA 101, 2004; Ginis I et al. J Cell Physiol 157, 1993; Arnould T et al. Am J Physiol 264, 1993)。従って、急性白血病細胞が低酸素環境下で骨髄ストローマや骨芽細胞に接着し易くなる可能性が考えられるが、これまで報告はなされていない。更に、低酸素環境下では、正常酸素環境下に比べて CAM-DR が増強するという報告もなされていない。

## 2. 研究の目的

AML における抗癌剤治療後の再発の主因とされている「骨髄微小残存病変」の一因として白血病細胞の「低酸素環境下における抗癌剤耐性」を提唱するとともに、通常の抗癌剤に「低酸素選択的薬剤」を単独で追加、あるいは「低酸素選択的薬剤」と「細胞接着依存性抗癌剤耐性 (Cell adhesion mediated-drug resistance (CAM-DR)) 阻害剤」を併用して追加する新しい根治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の 7 項目の実験系によって構成される。即ち、(i) AML 細胞株と患者由来新鮮 AML 細胞を低酸素環境下で培養すると抗癌剤耐性となる事の確認, (ii) 低酸素環境下での抗癌剤耐性が HIF-1 $\cdot$  発現亢進に起因する事の確認, (iii) HIF-1 $\cdot$  発現亢進により最終的に抗癌剤耐性をもたらす責任分子の解析, (iv) 通常の抗癌剤 (DNR, Ara-C 等) に低酸素選択的薬剤である

Tirapazamine, Rakicidin A, PR-104A 等を追加添加し、低酸素環境下の抗癌剤耐性が解除されるか否かの検討, (v) 低酸素環境下で AML 細胞の CAM-DR が増強するか否かの検討, (vi) 低酸素下での CAM-DR の克服法の検討, (vii) 低酸素環境下で AML 細胞株を長期間培養して低酸素環境に適応した細胞株を、免疫不全マウスに移植して、正常酸素環境下

で維持している親細胞株に比べて、骨髄への生着効率が良好な事、即ち白血病幹細胞の性質を有しているか否かの検討、である。

#### 4. 研究成果

(1) AML 細胞株 ( K562, U937, Meg-01, CHRF-288, SET-2) を 1% 酸素濃度環境あるいは 20% 酸素濃度環境で抗癌剤 ( Daunorubicin, Idarubicin, Cytosine arabinoside (AraC)) を添加して培養すると、1% 酸素濃度環境で培養した場合の方が、20% 酸素濃度環境で培養した場合と比較して IC50 が 3 ~ 10 倍高値を示すことを MTT-assay で明らかにした。

(2) AML 患者由来の新鮮白血病細胞 (患者 5 例) を用いて同じ実験をした場合も、上記 AML 細胞株と同様に 1% 酸素濃度環境では、20% 酸素濃度環境と比較して抗癌剤耐性になることを MTT-assay で明らかにした。

(3) 上記の AML 細胞株及び患者白血病細胞を 1% 酸素濃度環境で培養すると、すべての白血病細胞において HIF-1 $\cdot\cdot$  の発現が亢進することを Western-blot で明らかにした。

(4) 選択的 HIF-1 $\cdot\cdot$  阻害剤である Rotenone と上記抗癌剤を組み合わせ添加して培養したところ、1% 酸素濃度環境下での抗癌剤耐性が解除されることを明らかにした。

(5) 上記の AML 細胞株及び患者白血病細胞を 1% 酸素濃度環境で培養すると、すべての白血病細胞で Bcl-2 の発現が亢進することを Western-blot で明らかにした。

(6) Bcl-2 に対する siRNA を上記の AML 細胞株に導入し、上記抗癌剤を添加して培養したところ、1% 酸素濃度環境下での抗癌剤耐性が解除されることを明らかにした。

(7) 上記の AML 細胞株及び AML 患者由来の新鮮白血病細胞 (患者 5 例) に対して、上記抗癌剤と低酸素選択的薬剤である Tirapazamine を併用添加して培養したところ、全ての AML 細胞で 1% 酸素濃度と 20% 酸素濃度における IC50 が同等となる事を明らかにした。即ち、Tirapazamine は低酸素環境下での抗癌剤耐性を解除する事を明らかにした。

(8) 上記の AML 細胞株及び患者由来 AML 細胞を 1% 酸素濃度あるいは 20% 酸素濃度の培養環境で FN コーティングプレートあるいは BSA コーティングプレートで培養すると、全ての AML 細胞において FN プレートの IC50 が BSA プレートのそれに比べて高値を示す事を明らかにした。更に、FN プレートに限定すると 1% 酸素濃度の方が 20% 酸素濃度に比べて IC50 が高値を示す事、この実験系に Tirapazamine を添加す

ると IC50 は同等となる事を明らかにした。更に、この現象は FN プレートの代わりに健常人ボランティア由来の骨髄ストローマ細胞を張り付けたプレートを用いた場合にも認められた。即ち、低酸素下では CAM-DR が増強する事を明らかにした。

(9) FN プレートあるいは健常人ボランティア由来骨髄ストローマ細胞を張り

付けたプレート (ストローマプレート) を用いて、抗癌剤を添加して低酸素環境下で培養すると、それぞれのコントロールプレートと比較して IC50 が 3-10 倍高値を示すことを明らかにした。次に、この培養系に VLA-4 阻害剤 (抗 VLA-4 抗体あるいは FNIII ペプチド) を添加して培養すると、FN プレートあるいはストローマプレートを用いて、それぞれのコントロールプレートと比較して抗癌剤の IC50 が同等になる事を明らかにした。つまり、低酸素環境下で CAM-DR 増強をもたらす接着分子が VLA-4 であること明らかにした。

#### 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 1 件)

Matsunaga T, Imataki O, Torii E, Kameda T, Shide K, Shimoda H, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Yamamoto S, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Dobashi H, Bandoh S, Ohnishi H, Fukai F, Shimoda K. Elevated HIF-1 $\cdot\cdot$  expression of acute myelogenous leukemia stem cells in the endosteal hypoxic zone may be a cause of minimal residual disease in bone marrow after chemotherapy. *Leuk Res* 36, e122-124, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 卓也 (MATSUNAGA TAKUYA)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70260768

(2) 研究分担者

下田 和哉 (SHIMODA KAZUYA)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90311844