

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591368

研究課題名(和文)新規白血球表面抗原LR11の白血病および正常造血における役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of the function of LR11 on normal leukocytes and leukemia cells

研究代表者

武内 正博 (Takeuchi, Masahiro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50466702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：LR11はこれまで動脈硬化やアルツハイマー病などとの関連が報告されている分子であるが、我々はLR11が白血病細胞においても高発現する事を明らかとした。このため、白血病細胞においてどのような機能を持つのか以下の解析を行った。

レンチウイルスによるLR11のノックダウンにより接着能や遊走能の低下を認めた。また過剰発現系では接着能および遊走能の亢進を認めた。細胞株を低酸素環境に置くことによってLR11の発現が亢進することが判明し、HIF-1が関与することを明らかにした。また、LR11をノックダウンした細胞株を免疫不全マウスに移植したところ、コントロール群に比べ、明らかに生存期間の延長を認めていた。

研究成果の概要(英文)：We have identified and characterized a regulator of uPAR function, LR11 (also called SorLA or SORL1), in vascular smooth muscle cells (SMCs). Both LR11 mRNA and cell surface protein levels are elevated in immature leukemic cells, in turn leading to increased levels of sLR11 in acute leukemias. Thus, we analyzed the function of LR11 on normal hematopoietic cells and leukemia cells.

Results: K562 cells express very low levels of LR11 protein, but there was no difference in cell growth between mock transfected cells and LR11-overexpressing (LR11-ox) K562 cells in vitro. The percent of leukemia cells in PB of the mice transplanted with LR11-ox K562 cells on 4 weeks after transplantation were significantly higher than those of mice transplanted with mock cells. All the recipient mice transplanted with control U937 cells were died of leukemia by 3 weeks after transplantation, whereas the survival of mice transplanted with LR11-KD U937 cells were prolonged significantly.

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 白血病 ニッチ 低酸素 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

LR11(SORL1)は LDL 受容体ファミリー遺伝子で、研究分担者である武城らによって同定された。LR11 は動脈硬化巢の未(脱)分化平滑筋細胞に特異的に発現する分子であり (Bujo et al. Circulation 2002)、放出可溶性受容体が、オート(パラ)クラインに細胞膜ウロキナーゼ受容体 (urokinase-type plasminogen activator receptor ;uPAR ;CD87) と結合し細胞接着・遊走を亢進する(Bujo et al. Circ Res 2004)。LR11 ノックアウトマウスは血管傷害後の内膜肥厚が著しく抑制され、ノックアウトマウスの細胞では uPAR の細胞表面での発現低下ならびに integrin の発現低下が起きることが示されている。(Bujo et al. J Clin Invest 2008)。臨床成績から血中可溶性 LR11 濃度は血管肥厚(頸動脈内膜中膜肥厚度)を規定する独立因子となり、4 分位比較により LR11 高値例は低値例に比べて血管肥厚リスクが約 8 倍増大する(Bujo et al. J Clin Invest 2008)ことなどがすでに知られている。さらにアルツハイマー病においても患者髄液中の LR11 濃度が上昇していることが判明しており、動脈硬化以外の疾患においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。このことから LR11 に関する研究は平成 22 年度の厚生労働科学研究費補助金(臨床応用基盤研究事業)に採択された(研究代表者:武城英明、分担研究者:中世古知昭 他。タイトル:バイオマーカー可溶性 LR11 による病的未分化細胞疾患の新規診断と標的治療の開発)。

ここで、骨髄中の CD34(+) CD38(-)分画と CD34(+) CD38(+)分画とを比較し、より未熟な細胞の含まれる CD34(+) CD38(-)分画において高発現する分子の一つとして LR11 が挙げられていること (Experimental Hematology 28 (2000) 1286-1296) LR11 が平滑筋細胞においては未熟な細胞で発現を認めていることから造血器悪性腫瘍のなかでも未熟な細胞が増殖する急性白血病を中心に解析を行なった。その結果、LR11 が急性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病の白血病芽球や正常造血幹細胞、単球において発現することを我々は見出した。このため、LR11 は正常な造血細胞や白血病細胞においても何らかの機能を持っているのではないかと考え研究を開始した。

2. 研究の目的

LR11 が白血病や正常造血においてどのような役割を担っているのかを解明することを目的とする。特に、白血病幹細胞と LR11 の関係に着目し研究を行なう。将来的に、難治疾患である急性白血病の治療成績向上につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 正常造血における LR11 の役割を解明するため、LR11 ノックアウトマウスの造血細胞の解析を行なう。

(2) 白血病細胞における LR11 の役割を解明するため、以下の解析を行なう

白血病細胞株を用いた解析 (LR11 ノックダウン、過剰発現 接着、遊走、抗がん剤抵抗性など)

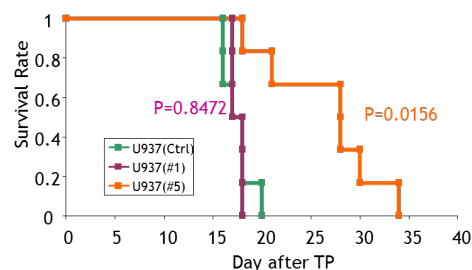
LR11 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞を用いた白血病マウスモデルの解析 (リプレティングアッセイ、移植モデル)

4. 研究成果

(1) LR11 ノックアウトマウスと WT マウスの造血細胞分画をフローサイトメトリーにて評価したが両者に明らかな差を認めなかった。

(2) 白血病細胞株を用いた検討: レンチウイルスによる LR11 のノックダウンにより接着能や遊走能の低下を認めた。また過剰発現系では接着能および遊走能の亢進を認めた。細胞株を低酸素環境に置くことによって LR11 の発現が亢進することが判明し、これに HIF-1 が関与することを明らかに出来た (Nishii et al. J Biol Chem. 2013 Apr 26;288(17):11877-86.)

また、LR11 をノックダウンした細胞株(U937)を免疫不全マウスに移植したところ、コントロール群に比べ、明らかに生存期間の延長を認めていることが分かった。



この際、LR11 ノックダウンをした細胞とコントロール細胞とで細胞増殖に差がなかったことから、移植後の生着に差があるのではないかと考え、追加検討を行った。U937を用いたマウス移植モデルにおける生着の検討の結果、LR11 をノックダウンすることによって、骨髄および脾臓への生着細胞の頻度が低下することが分かった。これらの結果からは LR11 が接着や遊走に関与し、それが移植後の生着に関わっている可能性が考えられた。

(2012 年米国血液学会総会および 2013 年日本血液学会学術集會にて発表)

さらに、MLL-AF9 を用いたマウス白血病モデルにおいても LR11 ノックアウトマウス由来の細胞を用いた場合とコントロール群とで差が起こるか解析を行っている。(未発表データ)

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)

Keigo Nishii, Chiaki Nakaseko, Meizi Jiang, Naomi Shimizu, Masahiro Takeuchi,

Wolfgang Johann Schneider, and Hideaki Bujo.

The soluble form of LR11 is a regulator of hypoxia-induced, uPAR-mediated adhesion of immature hematological cells.

J Biol Chem. 2013 Apr 26;288(17):11877-86.

〔学会発表〕(計 8 件)

西居圭吾、中世古知昭、武内正博、清水直美、大和田千桂子、塚本祥吉、川口岳晴、姜美子、岩間厚志、武城英明
第75回日本血液学会総会 2013年10月11日

LR11 plays critical roles in leukemogenesis of AML by regulating cell adhesion and homing ability

西居圭吾、武内正博、中世古知昭、武城英明 ほか

54th ASH annual meeting and exposition (米国血液学会年次総会) 2012年12月9日
LR11 Plays a Critical Role in Leukemogenesis of Acute Myeloid Leukemia by Regulating Adhesion and Homing Ability to Bone Marrow

西居圭吾、武内正博、中世古知昭、武城英明 ほか

第74回日本血液学会総会 2012年10月20日
LR11 regulates the hypoxia-induced hematopoietic immature cell adhesion.

川口岳晴、大和田千桂子、酒井紫緒、竹田勇輔、清水直美、武内正博、堺田恵美子、田久保耕平、海老沼宏幸、深町勇、東守洋、田丸淳一、横手幸太郎、武城英明、中世古知昭

53rd ASH annual meeting and exposition (米国血液学会年次総会) 2012年12月10日
Serum soluble LR11 is a promising novel biomarker for B cell lymphoma.

川口岳晴、大和田千桂子、酒井紫緒、竹田勇輔、清水直美、武内正博、堺田恵美子、田久保耕平、海老沼宏幸、深町勇、東守洋、田丸淳一、横手幸太郎、武城英明、中世古知昭

第73回日本血液学会学術集会 2011年10月15日

Serum soluble LR11 is a promising novel biomarker for malignant lymphoma.

塚本祥吉、武内正博、杉田泰雅、山崎敦子、川口岳晴、酒井紫緒、竹田勇輔、大和田千桂子、清水直美、堺田恵美子、西居圭吾、姜美子、横手幸太郎、武城英明、中世古知昭
第73回日本血液学会学術集会 2011年10月15日

可溶性LR11はCD87・CD11b複合体を介して単球系THP-1細胞を活性化する

清水直美、中世古知昭、酒井紫緒、塚本祥吉、川口岳晴、竹田勇輔、大和田千桂子、武内正博、堺田恵美子、井関徹、西居圭吾、姜美子、横手幸太郎、武城英明
第73回日本血液学会学術集会 2011年10月15日

可溶性LR11は白血病細胞株HL-60の新たな走化性因子であり、G-CSFによる遊走能を増強する

清水直美、中世古知昭、武内正博、大和田千桂子、塚本祥吉、川口岳晴、西居圭吾、姜美子、横手幸太郎、深町勇、武城英明
53rd ASH annual meeting and exposition (米国血液学会年次総会) 2011年12月12日
Soluble LR11/SorLA, a Potential Circulating Marker Indicating the G-CSF-Induced Mobilization of Hematopoietic Stem Cells, Is a Modulator of G-CSF-Mediated Migration of HL-60 Cells

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内正博 (Takeuchi Masahiro)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50466702

(2) 研究分担者

大和田千桂子 (Ohwada Chikako)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80436352

武城 英明 (Bujo Hideaki)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：80291300

中世古 知昭 (Nakaseko Chiaki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：30323398

(3)連携研究者

岩間 厚志 (Iwama Atsushi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70244126