

平成 26 年 4 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591403

研究課題名(和文) 白血病における骨髄微小環境誘導性ガレクチン-3の機能解析と新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Molecular and cellular effects of tumor microenvironment-specific Galectin-3 in leukemia

研究代表者

黒田 純也 (Kuroda, Junya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70433258

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)：骨髄環境特異的に慢性骨髄性白血病(CML)細胞に発現が誘導されるGalectin-3(Gal-3)の分子細胞生物学的効果と制御法について研究した。Gal-3発現はERK, AKT活性化の誘導、細胞外環境におけるSERPINA1-アルブミン複合体の抑制によってCML細胞の細胞増殖を亢進したほか、分子標的薬や抗癌剤によるアポトーシス誘導をMCL-1発現亢進により抑制した。また、Gal-3発現は骨髄内でのCML細胞の安定的棲息を促進した。こうしたメカニズムの克服には既存の分子標的薬にくわえ、Protein phosphatase 2A活性化薬の併用が有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We in this study investigated the molecular and biologic effects of galectin-3 (Gal-3) which is specifically induced by tumor-microenvironment in leukemic cells of chronic myelogenous leukemia (CML). Gal-3 promoted cell proliferation of leukemic cells via the activation of ERK and AKT as well as the inhibition of extracellular SERPINA1-albumin complex. Gal-3 also induced the expression of anti-apoptotic MCL-1 and caused the resistance to molecular targeted agents and genotoxic agents in CML cells. Interestingly, Gal-3 expression promoted the lodgment of leukemic cells in bone marrow in vivo. Finally, our study revealed that the combinatory use of protein phosphatase-2 activator in addition to the currently utilized molecular targeted agents, such as imatinib or dasatinib, was effective in overcoming those series of leukemia-promoting effects of Gal-3,

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：ガレクチン-3 慢性骨髄性白血病 骨髄腫瘍環境 分子標的

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML) では、その原因分子異常である Bcr-Abl チロシンキナーゼ (TK) に対する特異的阻害剤である TK 阻害剤 (TKI) の開発によって治療成績は目覚ましい改善を遂げた。しかしながら、CML では TKI によって病状コントロールによる長期生存が得られるようになったものの完治は困難である。

白血病における骨髄微小腫瘍環境による分子制御を治療標的とする薬物療法の開発研究は近年、注目が集まる研究課題である。これまでに諸家により ICAM-1 や VLA-4 などの接着因子、TGF- β 、SDF-1 や RANKL などのケモカインやサイトカインなどが誘因となる治療抵抗性獲得が報告されてきた。われわれも骨髄内において白血病細胞が高度の低酸素条件下で生育・増殖しており、低酸素条件下では CML 細胞は幹細胞様形質を獲得すること、TKI や既存抗がん剤に対して低感受性になること、Glyoxalase-I などの解糖系関連酵素が新たな分子標的となりうることなどを明らかにしてきた (Takeuchi M, *Cell Death Differ* 2010)。しかしながら、従前の多くの研究は腫瘍環境構成因子そのものの白血病病態形成における機能の解析と治療標的化を明確にする一方で、腫瘍環境によって支配される白血病細胞内のシグナル制御の網羅的・系統的解析による分子標的探索研究は十分とはいえず、その解明は重要な研究課題である。

2. 研究の目的

最近、われわれは骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell; BMSC)、細胞外マトリクス (Extracellular matrix; ECM) との相互作用によって白血病細胞内に誘導される遺伝子・分子制御変化の網羅的検討を行い、Galectin-3 (Gal-3) の発現が白血病細胞内で誘導されることを見出した。Galectin-3 発現は近年、甲状腺癌、肝臓癌、大腸癌、前立腺

癌など固形癌での腫瘍増殖、アポトーシス抵抗性、転移促進、治療予後悪化などとの関連が注目されているが、白血病における機能は明らかでない。本研究では白血病における Gal-3 の細胞増殖、治療抵抗性、細胞遊走など病態形成における機能を明らかにし、その制御法開発による新規分子標的治療法の確立を目指すこととした。

3. 研究の方法

以下について、順次、研究を遂行した。

3.1. 白血病細胞株を用いた *in vitro* の Gal-3 の機能解析

Gal-3 遺伝子導入、RNA 干渉による Gal-3 遺伝子発現抑制が白血病細胞の細胞増殖、細胞遊走、細胞周期、化学療法剤感受性に与える Gal-3 機能を検討

3.2. 患者白血病細胞の骨髄中での Gal-3 発現と病型、化学療法剤感受性、治療反応の検討

3.3. 白血病マウスモデルによる Gal-3 の *in vivo* 病態形成における機能の検討

Gal-3 遺伝子導入白血病細胞株、Gal-3 遺伝子抑制白血病細胞株らを免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) に移植し、生着、臓器浸潤、治療感受性について検討

3.4. Gal-3 誘導性治療抵抗性の克服戦略

4. 研究成果

4.1. CML 細胞における骨髄環境特異的 Gal-3 発現誘導

まず初めに、*in vitro* 骨髄微小環境擬似モデルとして培養プレート底面を擬似 ECM であるフィブロネクチンでコーティング、擬似 BMSC として不死化ヒト BMSC 由来細胞株 HS-5 でシートし、これらの条件での培養によって CML 由来細胞株 (K562、MYL) に生じる分子制御の変化を遺伝子発現マイクロアレイにより網羅的に検討した。両条件に共通の変化として 284 遺伝子における 2 倍以上の発現上昇、215 遺伝子における 0.5 倍以下への発現低下が誘導された。さらにシグナルパスウェイ解析によって、RAS/MAPK 経路や AKT 経路の活性化を

導く Gal-3 が、擬似骨髄微小環境モデルにおいて特異的に CML 細胞に発現誘導されることが判明した。重要なことに患者骨髄由来 CML 細胞を検討したところ、いずれの CML 細胞も骨髄内において実際に Gal-3 を発現していることも明らかになった。興味深いことに患者 CML 細胞においては、より病初期の慢性期 CML 細胞においては Gal-3 発現が普遍的であるのに対し、病状進行期、すわなち、フィラデルフィア染色体異常にくわえ、種々の付加的遺伝子異常が加わりクローン性進展をおこし、分子病態・臨床病態ともにより激化した後の移行期、急性転化期においては、CML 細胞における Gal-3 発現は減弱していることも明らかになった。

4.2. Gal-3 高発現による CML 細胞の形質変化、薬剤抵抗性獲得と分子効果

CML 細胞における Gal-3 の機能を明らかにすべく、CML 細胞株への遺伝子導入による Gal-3 強制発現を行い、その効果を検討することとした。*In vitro*において、Gal-3 を安定的に過剰発現した CML 細胞株亜株は親株に比して細胞増殖能やコロニー形成能が亢進し、TKIs や doxorubicin、etoposide、cytarabine、vincristine など各種の抗がん剤によるアポトーシス誘導に対して部分的ながら抵抗性を示した。また、HS-5 の培養上清には G-CSF、GM-CSF、M-CSF、Kit ligand、MIP-1 α 、IL-6、IL-8、IL-11 など各種の造血サイトカインが含まれるが、Gal-3 過剰発現 CML 細胞株は親株に比して、HS-5 培養上清に対する走化性が亢進していることが明らかになった。同時に Gal-3 過剰発現によって CML 細胞における AKT、ERK のより高度の活性化が認められた。また、アポトーシス抵抗性 BCL-2 ファミリー分子である MCL-1 の発現誘導が認められ、アポトーシス抵抗性亢進の一因と考えられた。一方、CML 細胞を TKI に暴露しても Gal-3 の発現に変化はなく、Gal-3 と BCR-ABL は独立、

かつ、補完的に AKT、ERK など共通の下流シグナルを活性化し、CML 細胞の生存、増殖を促進することが示された。

4.3. CML 細胞の Gal-3 高発現によるオートクライン、パラクライン細胞増殖促進効果とメカニズム

Gal-3 過剰発現 CML 細胞の培養上清は親株の培養上清に比べ、CML 細胞、ならびに BMSC の増殖を促進した。Gal-3 過剰発現 CML 細胞由来培養上清、ならびに親株由来培養上清をそれぞれ液体クロマトグラフィーによって分離し、上清成分の相違を検討したところ、Gal-3 過剰発現 CML 細胞由来培養上清では親株由来培養上清に存在する 110KDa 分子が減少・消失しており、これを含む画分において細胞増殖能が有意に低減していることが明らかになった。さらにアミノ酸配列解析によって、同分子は元来、培養液中に含まれる SERPINA1 とアルブミンの複合体であることが判明した。SERPINA1 は炎症性蛋白のひとつであり、各種のがん細胞の増殖を抑制すること、また、Gal-3 は SERPINA1 との結合能を有することが知られている。こうした効果により、Gal-3 は CML 細胞、ならびに周辺 BMSC の増殖をオートクライン、パラクラインに促進しているものと想定される。

4.4. Gal-3 過剰発現による CML 細胞の骨髄棲息の促進

In vivo 骨髄環境における Gal-3 の機能を検討するため、Gal-3 過剰発現 CML 細胞、親株 CML 細胞をそれぞれ免疫不全(NOD/SCID)マウスに移植し、生着、ならびに生体内の進展様式について検討した。いずれの細胞を移植したマウスにおいても、移植後数日より末梢血中に CML 細胞の出現を認めたと、移植後 20 日前後を境に親株細胞移植マウスでは末梢血より白血病細胞が消失し、30 日後ごろより腹腔内など骨髄外臓器における CML 細胞の多発腫瘍形成を認め、50 日目までに多臓器浸潤

により移植マウスは全て死亡した。この際、親株移植マウスでは CML 細胞を骨髄に認めなかった。一方、Gal-3 過剰発現 CML 細胞移植マウスでは、移植後 20 日後も末梢血に CML 細胞は出現を続け、殆どのマウスが観察期間 (80 日)を通じて生存し続けた。これらのマウスでは Gal-3 過剰発現 CML 細胞は骨髄内、ならびに骨髄から連続性に周辺臓器に直接浸潤してはいるものの、骨髄外臓器への遠隔転移を認めなかった。CML 細胞における Gal-3 の発現は CML 細胞の骨髄生着のみならず、骨髄での棲息維持を促進すると考えられる。

4.5. CML 細胞の Gal-3 高発現による TKI 抵抗性の克服戦略

Gal-3 の直接阻害による効果を検討すべくフラクション化シトラスペクチン (Fractionated citrus pectin (FCP)) の効果を検討した。FCP はシトラスペクチンの構造変化体であり、Gal-3 と結合し、その作用を阻害する作用を有することが知られている。実際、TKI と FCP の併用は期待通り Gal-3 導性 TKI 抵抗性を克服した。しかしながら、FCP を *in vivo* で用いることは困難であるうえ、現有の薬剤には Gal-3 阻害効果を有するものは存在しない。そこで、次に Gal-3 誘導性 TKI 抵抗性を克服する現有の薬剤を探索することとした。従前、われわれは TKI の BCR-ABL 阻害による CML 細胞のアポトーシス誘導においては、8 種存在するアポトーシス誘導性 BH3-only protein (BIM、BAD、BID、PUMA、BIK、HRK、NOXA、BMF) のうち、BIM の誘導が必須であり、くわえて BAD、BMF の補助的・協調的効果が必要であることを明らかにしてきた。Gal-3 により発現亢進する MCL-1 は、TKI により発現誘導された BIM や BMF に結合し、これらによるアポトーシス誘導作用を中和、相殺してしまうため、細胞死誘導効果が減弱すると想定される。そこで、BCR-ABL 阻害による CML 細胞の細胞死誘導に必須の BIM

を BCR-ABL 非依存的に誘導しつつ、くわえて BIM 以外の BH-3 only protein を誘導・活性化しうる薬剤を探索することとした。多種の薬剤のスクリーニングを行うなか、protein phosphatase 2A (PP2A) 活性化剤である FTY720 が BCR-ABL 非依存的に BIM ならびに BID を誘導・活性化することで CML 細胞にアポトーシスを誘導しうること、ABL KD 変異による TKI 抵抗性を克服しうること、ならびに TKI との併用により Gal-3 による TKI 感受性低下を克服しうることを見出した。FTY720 は多発性硬化症に対する免疫抑制剤として、現在、すでに日常診療に活用されている薬剤である。既存薬の新たな活用法が見出されたものと期待できる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計7件)

Kuroda J, Taniwaki M. Principles and current topics concerning management of tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myelogenous leukemia. *Transl Med* 2011, S2-001

Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:17468-17473, 2011

Kuroda J, Yamamoto M, Sasaki N, Taniwaki M. Multifaceted Mechanisms for Cell Survival in Chronic Myelogenous Leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*, 13:69-79, 2013

Kuroda J. Editorial. The Innovative Decade of Molecular Targeted Therapy.

Transl Med 2012, S2-e001
Kiyota M, Kuroda J, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Nakayama R, Nagoshi H, Mizutani S, Chinen Y, Sasaki N, Sakamoto N, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. FTY720 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells via dual activation of BIM and BID and overcomes various types of resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Apoptosis*, 18:1437-46, 2013

Nakayama R, Kuroda J, Taniyama N, Yamamoto-Sugitani M, Wada S, Kiyota M, Mizutani S, Chinen Y, Matsumoto Y, Nagoshi H, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M. Suppression of SERPINA1-albumin complex formation by galectin-3 overexpression leads to paracrine growth promotion of chronic myelogenous leukemic cells. *Leukemia Res*, 38:103-108, 2014.

黒田純也、山本未央、谷脇雅史. 慢性骨髄性白血病の細胞死の抑制. *血液内科*. 62(2), 159-165, 2011

〔学会発表〕(計7件)

黒田純也. 慢性骨髄性白血病に対するチロシンキナーゼ阻害剤治療. 第98回近畿血液学地方会. 平成24年12月1日
Nakayama R, Kuroda J, Taniyama N, Wada S, Sugitani M, Shimura Y, Nagoshi H, Mizutani S, Chinen Y, Sakamoto N, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Sato K, Taniwaki M. Galectin-3 protects CML leukemic cells by antagonizing SERPINA1-albumin complex. 第74回日本血液学会学術集会. 平成24年10月19-21日

Kiyota M, Kuroda J, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Nakayama R, Nagoshi H,

Mizutani S, Chinen Y, Sakamoto N, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. FTY720 induces apoptosis via both Bim-mediated intrinsic and extrinsic pathway in CML. 第74回日本血液学会学術集会. 平成24年10月19-21日

Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Leukemia microenvironment-specific galectin-3 expression promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. The 3rd JSH International Symposium 2012. 平成24年5月26-27日

Kiyota M, Kuroda J, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Nakayama R, Nagoshi H, Mizutani S, Chinen Y, Sakamoto N, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taki T, Taniwaki M. Fingolimod (FTY720) Overcomes the Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors Via Dual Activation of BIM and BID in Chronic Myelogenous Leukemia The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition 平成24年12月8-10日

Kuroda J, Yamamoto M, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Leukemia Microenvironment-Specific Galectin-3 Expression of Leukemic Cells Promotes Malignant Niche Formation and Bone Marrow Lodgment of Leukemic Cells in

Chronic Myelogenous Leukemia. The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting and Exposition 平成 23 年 12 月 11 日

Yamamoto M, Kuroda J, Kobayashi T, Sasaki N, Nagoshi H, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Horiike S, Ashihara E, Akaji K, Taniwaki M. Galectin-3 Is the Molecular Target for Overcoming Multidrug Resistance Due to the Cell Protection by Bone Marrow Leukemia Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia. The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting and Exposition 平成 23 年 12 月 11 日

〔図書〕(計 2 件)

黒田純也. 慢性骨髄性白血病に対するチロシンキナーゼ阻害剤治療-知っておきたい基礎知識- BLOOD MASTER Vol.8 「慢性骨髄性白血病」(前川 平 編)、大日本住友製薬、3-21、2011

黒田純也. 慢性骨髄性白血病の薬剤耐性機構. Annual Review 血液 2013, 中外医学社、99-108, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田純也 (KURODA, Junya)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70433258