

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390248

研究課題名(和文)造血幹細胞ニッチを標的とした新規白血病治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic strategy for leukemia by targeting the hematopoietic stem cell niche.

研究代表者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、線溶制御因子であるPAI-1が骨髄ニッチに発現し、造血抑制因子として機能することを見いだした。そして、新規PAI-1阻害剤により造血再生が促進することを明らかにした。本研究課題では、(1)がん幹細胞にPAI-1が高発現していること、(2)PAI-1高発現がん細胞は治療抵抗性であること、(3)がん特異的な分子標的薬にPAI-1阻害剤を併用すると顕著な抗腫瘍効果を発揮することを見いだした。すなわち、がん幹細胞の治療抵抗性獲得にPAI-1が重要な役割を担っていることが示唆され、PAI-1活性の阻害はがん治療において有効性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have reported that plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a negative regulator of the fibrinolytic pathway, expressed in the BM niche and negatively regulated the hematopoietic regeneration in the BM microenvironment. Pharmacological inhibition of PAI-1 activity significantly improved hematopoietic recovery after hematopoietic stem cell transplantation. In this study, we demonstrated several evidences about the relationship leukemia and PAI-1. First, leukemia stem cells highly expressed the PAI-1. Second, PAI-1-expressing leukemia showed resistance to anti-tumor therapy. Finally, co-administration of leukemia-specific molecular target drug and PAI-1 inhibitor facilitated anti-tumor effects. Our results indicate that the inhibition of PAI-1 activity could be a therapeutic approach to eliminate the therapy-resistant leukemia stem cells.

研究分野：血液腫瘍内科学

キーワード：白血病幹細胞 白血病ニッチ PAI-1

## 1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞研究により、幹細胞制御における周辺微小環境(ニッチ)の重要性が明らかとなってきた。造血幹細胞は骨髄内の骨内膜付近に存在し、骨芽細胞やストローマ細胞などのニッチを形成する非造血系の細胞群によりその幹細胞活性が調節されている。我々はこれまで、ニッチを標的とした新規薬剤として PAI-1 阻害薬を開発し造血再生の効率化が実現されることを示してきた。

幹細胞ニッチは、白血病幹細胞の制御においても重要であることが明らかとなった。白血病幹細胞がニッチにとどまることによって、治療抵抗性を獲得し、ひいては白血病再発の大きな要因となる。したがって、白血病の根治を達成するためには、白血病幹細胞とそのニッチを標的とした治療法の開発が重要である。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、PAI-1 阻害剤が白血病幹細胞ニッチに作用し、分子標的薬の効果を増強することによって、白血病幹細胞の完全な排除を達成する可能性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

白血病モデル実験として、マウス細胞株 32D に癌遺伝子である bcr-abl 融合遺伝子を導入した 32D p210 をマウスに移植した急性白血病モデル、あるいは bcr-abl を造血幹細胞に導入した慢性骨髄性白血病モデルを利用した。これらの白血病モデルは、分子標的薬であるイマチニブで治療や再発の過程を解析できる。さらに、白血病幹細胞を細胞表面抗原で同定することが可能であり、治療過程における白血病幹細胞の生体内動態も解析が容易な優れた実験系である。そこで、新規薬剤である PAI-1 阻害薬とイマチニブを併用することにより、治療

抵抗性の白血病幹細胞の効率良い排除を実現できるか否かを、フローサイトメトリーによる白血病幹細胞の同定や生存率、再発率を検討した。

## 4. 研究成果

骨髄に生着した白血病細胞集団から白血病幹細胞を回収し、PAI-1 分子の発現を解析したところ、白血病幹細胞は他の細胞分画に比べて高い PAI-1 の発現が認められた。この発現は、ヒト白血病幹細胞においても確認された。さらに、PAI-1 過剰発現型白血病細胞株は治療抵抗性が高く、その抵抗性は PAI-1 阻害剤で解除された。これらのことから、がんの治療抵抗性獲得に PAI-1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

そこで、がん特異的な分子標的薬に PAI-1 阻害剤を併用しその効果を検討した結果、著しい抗腫瘍効果を発揮することを見いだした。すなわち、白血病細胞を生着させたマウスに分子標的薬(イマチニブ)を連続投与する実験系において、分子標的薬の投与を中断すると、分子標的薬のみを投与した群は、再発し死亡する割合が顕著に増加した。一方、PAI-1 阻害剤を併用投与した群では高い治療効果が確認された。

ニッチについて組織学的な解析を行ったところ、PAI-1 阻害剤併用群では骨髄ニッチに存在する白血病細胞が効率よく排除されていた。したがって、ニッチ因子である PAI-1 は、白血病治療の標的として有用であることが明らかとなった。

分子標的薬の実用化によって、ある種の白血病は外来通院によって寛解期を達成できるようになった。しかし、治療抵抗性の白血病幹細胞がわずかながらも残存することが明らかとなり、再発の危険性を意識しながら高価な薬剤を長期間にわたって服用しなければならぬことから、患者負担は

依然として大きいままである。したがって、白血病幹細胞を標的とした治療法を開発することは、白血病根治のための喫緊な研究課題であり、本研究をモデルケースとした他の白血病や他臓器癌の治療法開発にも寄与する重要な研究課題である。特に、幹細胞ニッチを標的とする PAI-1 阻害剤は、他の癌幹細胞の治療にも有用である可能性が高いことが期待される。

#### 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 25 件)

1. Suzuki K, Ogura M, Abe Y, Suzuki T, Tobinai K, Ando K, Taniwaki M, Maruyama D, Kojima M, Kuroda J, Otani H, Iizuka K. Phase I study of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol.* 有 101(3), 286-294, 2015
2. Nakajima Y, Hattori Y, Ito S, Kawasaki R, Kuwabara H, Machida S, Shirasugi Y, Miyazaki K, Sakai R, Tomita N, Ando K, Higashihara M, Ishiguro Y, Fujisawa S. Acute leukemia during pregnancy: an investigative survey of the past eleven years. *Int J Lab Hematol.* 有 37(2); 174-180, 2015
3. Kojima M, Nakamura N, Yabe M, Tokunaka M, Kikuti YY, Kikuchi T, Murayama H, Moriuchi M, Tsuboi K, Ogawa Y, and Ando K. A case of clonally distinct relapse of Burkitt lymphoma nine years after complete remission. *Int J Hematol.* 有 in press, 2015
4. Tatsumi M, Terauchi T, Ando K, Niitsu, N, Kim, WS, Suh C, Ogura M, Tobinai K. Prognostic Significance of Metabolic Tumor Burden by FDG PET/CT in Patients with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Science.* 有 106(2); 186-193, 2015
5. Amaki J, Onizuka M, Ohmachi K, Aoyama Y, Hara R, Ichiki A, Kawai K, Sato A, Miyamoto M, Toyosaki M, Machida S, Kojima M, Kawada H, Ogawa Y, and Ando K. Single nucleotide polymorphism of cytarabine metabolic genes influence clinical outcome in acute myeloid leukemia patients received high dose cytarabine therapy. *Int J Hematol.* 有 in press, 2015
6. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Noji H, Kitamura K, Eto T, Ando T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama T, Hase M, Li L, Johnson K, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. A rare genetic polymorphism in C5 confers poor response to the anti-C5 monoclonal antibody Eculizumab by eleven Japanese patients with PNH. *New Eng J Med.* 有 370, 632-639, 2014
7. Katakami N, Kunikane H, Takeda K, Takayama K, Sawa T, Saito H, Harada M, Yokota S, Ando K, Saito Y, Yokota I, Ohashi Y, Eguchi K. Prospective study on the incidence of bone metastasis and skeletal-related events in patients with stage IIIB and IV lung cancer—CSP-HOR13. *J Thorac Oncol.* 有 9 ( 2 ); 231-238, 2014

8. Yamakawa N, Okuyama K, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Ogata J, Takakura K, Chanda B, Kurosaki N, Yamamoto H, Ando K, Matsui H, Inaba T, Kotani A. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago 1. *Nucleic Acid Research*. 有 42(8);5289-5301, 2014
9. Negishi N, Ito R, Irie N, Matsuo K, Suzuki D, Yahata T, Nagano K, Aoki K, Ohya K, Hozumi K, Ando K, Tamaoki N, Ito M, Habu S. Effective expansion of engrafted human hematopoietic stem cells in bone marrow of mice expressing human Jagged-1. *Exp Hematol*. 有 4(6); 487-494, 2014
10. Suzuki R, Matsushita H, Kawai H, Matsuzawa H, Tsuboi K, Watanabe S, Kawada H, Ogawa Y, Ando K. Identification of a novel SEPT9-ABL1 fusion gene in a patient with T-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia Research Report*. 有 3,54-57, 2014.
11. Sato A, Nakamura N, Kojima M, Ohmachi K, Esteban JC, Kikuti YY, Numata H, Ohgiya D, Tazume K, Amaki J, Moriuchi M, Miyamoto M, Aoyama Y, Kawai H, Ichiki A, Hara R, Kawada H, Ogawa Y, Ando K. The clinical outcome of Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in rituximab era, *Cancer Science*. 有 105(9);1170-1175, 2014
12. Murayama H, Matsushita H, Ohbayashi Y, Ando K. Erythrophagocytosis by blasts in acute myeloid leukaemia harboring the BCR-ABL1 fusion gene. *Brit. J Haematol*. 有 167(5); 586-588, 2014
13. Kawai H, Matsushita H, Suzuki R, Sheng Y, Lu J, Matsuzawa H, Yahata T, Kaneko M, Tsukamoto H, Kawada H, Ogawa Y, Ando K. Functional analysis of the SEPT9-ABL1 chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. *Leukemia Research*. 有 38(12); 1451-1459, 2014
14. Matsushita H, Yahata T, Sheng Y, Nakamura Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Tanaka M, Hayashi H, Damdinsuren A, Onizuka M, Ito M, Miyachi H, Pandolfi PP, and Ando K. Establishment of a humanized APL model via the transplantation of PML-RARA-transduced human common myeloid progenitors into immunodeficient mice. *PLoS ONE*. 有 9(11); e113295, 2014
15. Kawada H, Sawanobori M, Tsuma-Kaneko M, Wasada I, Miyamoto M, Murayama H, Toyosaki M, Onizuka M, Tsuboi K, Tazume K, Shirasugi Y, Ohmachi K, Ogawa Y, Kobayashi H, Ando K. Phase I clinical trial of intravenous L-ascorbic acid following salvage chemotherapy for relapsed B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Tokai J Exp and Clin Medicine*. 有 39, 111-115, 2014
16. Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, Dan T, Van Ypersele De Strihou C, Miyata T, Ando K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor

- type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells*. 有 Oct 24. doi: 10.1002/stem.1577, 2013
17. Kojima M, Machida S, Miyamoto M, Moriuchi M, Ohbayash Y, Ando K. Deferasirox treatment improved hematopoiesis and led to complete remission in a patient with pure red cell aplasia. *Int J Hematol*. 有 98, 719-22, 2013
  18. Moriya Y, Mizuma A, Uesugi T, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W, Kobayashi H, Kawada H, Ando K, Takagi S, Takizawa S. Phase I study of intravenous low-dose granulocyte-colony stimulating factor in acute and sub-acute ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 有 22, 1088-97, 2013
  19. Ogawa Y, Suzuki K, Sakai A, Iida S, Ogura M, Tobinai K, Matsumoto M, Matsue K, Terui Y, Ohashi K, Ishii M, Mukai H, Ando K, Hotta T. A phase I/II study of VMP (bortezomib-melphalan-prednisolone) for previously untreated patients with multiple myeloma in Japan. *Cancer Sci*. 有 104, 912-919, 2013
  20. Ohmachi K, Niitsu N, Uchida T, Kim SJ, Ando K, Takahashi N, Takahashi N, Uike N, Eom HS, Chae YS, Terauchi T, Tateishi U, Tatsumi M, Kim WS, Tobinai K, Suh C, Ogura M. Multicenter Phase II Study of Bendamustine Plus Rituximab in Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 有 31:2103-2109, 2013
  21. Kantarjian H, Martinelli G, Jabbour E, QuintAas-Cardama A, Ando K, Bay J-O, Wei A, Grvpper S, Papayannidis C, Owen K, Pike L, Schmitt N, Stockman P, Giagounidis A, on behalf of the SPARK-AML1 investigators. Stage I findings of a two-stage Phase II study to assess the efficacy, safety and tolerability of barasertib (AZD1152) compared with low dose cytosine arabinoside in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 有 119, 2611-2619, 2013
  22. Kawada H, Kaneko M, Sawanobori M, Uno T, Matsuzawa H, Nakamura Y, Matsushita H, Ando K. High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 $\alpha$  transcription. *PLOS ONE*. 有 8, e62717, 2013
  23. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, and Harada H. RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood*. 有 121, 3434-3446, 2013
  24. Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K and Morishima Y. Scanning of the immunogenome with microsatellite

markers for non-HLA associations with graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplantation. Immunogenetics. 有 65, 417-427, 2013

25. Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, Ando K, and Nakamura N. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multi-center analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. Leuk. Lymphoma. 有 54, 2149-2154, 2013

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Jagged 1-Notch signal supports human myeloma cell survival. Yukari Muguruma, Takashi Yahata, Mamoru Ito, Kiyoshi Ando, 第76回日本血液学会、2014年10月31日、大阪国際会議場(大阪府、北区)
2. In vivo analysis of PML-RARA in a humanized mouse model. Hiromichi Matsushita, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando, 他7名、56th ASH annual meeting and exposition, 2014年12月7日、サンフランシスコ(アメリカ)
3. 超免疫不全マウスを利用したヒト造血再生の解析、八幡 崇、安藤 潔、第47回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2014年1月31日、私学会館(東京都、千代田区)
4. Functional analysis of SEPT9-ABL1 chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. Hidetsugu Kawai, Hiromichi Matsushita, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando, 他 3 名、55th ASH annual meeting and exposition, 2014年12月7日、ニューオリンズ(アメリカ)

5. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 is a Negative Regulator of Hematopoietic Regeneration. Abd Aziz Ibrahim, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando, Malaysia Japan International Institute of Technology-Japanese University Consortium Joint International Symposium 2013, 2013年11月7日、東海大学(神奈川県、平塚市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称: PAI-1 阻害剤の新規用途  
発明者: 安藤 潔、八幡 崇、宮田 敏男  
権利者: 安藤 潔、八幡 崇、宮田 敏男  
種類: 国際特許  
番号: PCT/JP2014/060760  
出願年月日: 2014年4月15日  
国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号: 70176014