

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(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590361

研究課題名(和文)新規分子標的薬による新しい骨髄再生法の確立

研究課題名(英文)Establishment of hematopoietic regeneration by the novel molecular targeting drug

研究代表者

八幡 崇 (YAHATA, Takashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10398753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の制御法の確立は、造血幹細胞移植の効率化や、白血病などの悪性血液疾患の根治療法の実現に向けた重要な課題である。研究代表者らは、線維素溶解系に着目した研究を行い、放射線照射などの移植前処置によって骨髄ニッチからPAI-1が産生されることを見いだした。そして、PAI-1欠損マウスを利用した解析により、PAI-1が造血再生の抑制因子であることを明らかにした。さらに、PAI-1活性を特異的に阻害する低分子化合物を移植時に投与することにより造血再生が促進されるだけでなく、長期間にわたって幹細胞活性が維持されるという理想的な再生医療法を提示することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation depends on the rapid recovery and sustained life-long hematopoiesis. The activation of the fibrinolytic pathway promotes hematopoietic regeneration; however, the role of PAI-1 has not yet been elucidated. We herein demonstrate that BM stromal cells produce PAI-1 in response to myeloablation, which negatively regulates the hematopoietic regeneration. Genetic disruption of the PAI-1 gene, or pharmacological inhibition of PAI-1 activity, significantly improved the myeloablation-related mortality and promoted rapid hematopoietic recovery through the induction of hematopoiesis-promoting factors. The PAI-1 inhibitor not only accelerated the expansion of the donor HSCs during the early stage of regeneration, but also supported long-term hematopoiesis. Our results indicate that the inhibition of PAI-1 activity could be a therapeutic approach to facilitate the rapid recovery and sustained hematopoiesis.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 造血再生 PAI-1

1. 研究開始当初の背景

難治性血液疾患に施行される造血幹細胞移植は、化学療法に不応となった患者にとっては最後の治療手段であり、その成否は患者の予後や生存率を大きく左右するものである。臍帯血中に含まれる造血幹細胞は、成人骨髄に比べて幹細胞活性が非常に高いことから、骨髄に代わる新しい幹細胞供給源として移植医療に利用されている。しかし、移植例の蓄積により、臍帯血造血幹細胞移植は移植後の造血回復が遅く、正常値に達するまでの期間が長いために、患者が免疫不全状態に陥りやすく、感染症や白血病再発の危険に常に曝され続けることになる可能性が高いことが明らかとなった。この移植初期において患者状態の制御が困難なことが、臍帯血移植の克服すべき最大の課題である。したがって、より安全で成功率の高い臍帯血移植法を確立するためには、移植初期における造血回復を可能な限り効率よく迅速に達成させ、造血系の恒常性を長期間にわたって維持する方法の確立が重要である。

幹細胞の分化・増殖は、幹細胞を取り巻く周囲の環境要因によって制御されている。造血幹細胞は骨髄内の骨内膜付近に存在し、ニッチと呼ばれる特殊な場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。造血幹細胞移植は、宿主となる患者に放射線照射や化学療法剤を投与することによって宿主造血環境を破壊した後に施行するものである。この移植の前処置によって骨髄環境においては様々な生体反応が惹起される。例えば、線維素溶解系（線溶系）因子の一つである tissue-type plasminogen activator (t-PA) が、骨髄障害直後のニッチ領域において強く誘導され、造血再生を促進することが明らかになったことから、造血再生における線溶系の役割が注目されている。

2. 研究の目的

我々が開発した低分子化合物 (TM5275) は、線溶系を負に制御する plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) 活性を抑制する、すなわち、造血再生促進因子である t-PA の活性を高い状態で維持することを実現した新規薬剤であることから、移植宿主への本剤の投与は造血再生促進効果が期待される。そこで本研究は、tPA の阻害分子である PAI-1 の造血再生における役割を明確にし、PAI-1 阻害薬を用いた造血再生効果の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

野生型 C57BL/6 マウス、PAI-1 欠損マウス、または tPA 欠損マウスに致死量放射線を照射後、野生型マウスより採取した骨髄細胞を静脈内に移植した。生理食塩水、組み換え型 tPA 製剤、あるいは PAI-1 阻害薬を移植当日から 1 日 1 回、5 日間にわたって連続投与した。造血再生について、移植後の 1～3 週間を『造血回復期』、15 週間以降を『造血維持期』として解析した。造血回復期には、血漿と骨髄細胞を採取し、ELISA 法およびフローサイトメトリーを利用して各種造血再生因子の発現と造血幹細胞の増幅を解析した。また、造血維持期に回収した骨髄細胞については、造血幹細胞の増幅を解析することと同時に、再度別の個体に 2 次移植を行うことによって造血幹細胞の自己複製能を評価した。

4. 研究成果

致死量放射線 (9 Gy) をマウス照射すると、線溶系因子である plasmin、tPA、およびその阻害因子である PAI-1 の発現が亢進した。注目すべきことに、これら線溶系因子群の発現は血漿よりも骨髄液で顕著な産生量を示した。このことは、骨髄における線溶系因子は造血再生において重要な役割を果たしていることを示唆する。組織学的な解析により、線溶系因子の発現は造血ニッチ細胞である骨芽細胞や血管内皮細胞といった骨

髄ストローマ細胞において顕著であった。初代培養マウス骨髄ストローマ細胞に放射線を照射すると線溶系因子を産生することから、放射線などの骨髄障害により骨髄ストローマ細胞が直接線溶系因子を発現することが明らかとなった。重要な点は、放射線照射により造血ニッチにおいて造血促進因子である tPA の発現が増強するだけでなく、同時にその阻害因子である PAI-1 の発現も亢進してしまうことが明らかとなった。この事実から、造血再生の効率化には PAI-1 活性を抑制することが重要であることが示唆された。

次に、造血再生における PAI-1 分子の役割を明確にするために、移植の宿主として PAI-1 欠損マウスを利用した検討を行った。その結果、野生型マウスと比較して、PAI-1 欠損マウスの方が移植後の造血再生能が高いことを見いだした。すなわち、骨髄障害における PAI-1 分子の発現増強は造血再生を抑制するということが明らかになった。したがって、PAI-1 活性を阻害することは、造血再生の効率化に有効であることが推測された。

そこで、低分子 PAI-1 阻害剤を用いた造血再生反応の効果を検討した。PAI-1 阻害薬を投与することによって、tPA を起点とした一連の線溶系が効率よく活性化され、メタロプロテアーゼの活性化による造血細胞増殖因子 (cKitL など) の産生が増強し、造血再生反応が亢進することを明らかにした。さらに、tPA 欠損マウスにおいては PAI-1 阻害薬の効果が発揮されないことから、PAI-1 阻害薬の投与によって誘導される一連の反応は tPA 主導であるということが明確になった。

全身致死量放射線照射や抗がん剤の連続投与は、急性の造血不全を誘導し、速やかに造血系を回復できない個体は死亡する。PAI-1 阻害剤投与群は致死量放射線や抗がん剤 (5-FU) によって誘導される個体死に対して高い生存率を示した。このことは骨髄障害

からの回復能が増強されたことを示唆する。そこで、PAI-1 阻害剤の投与が造血系の早期回復を達成するか否かをさらに明確にするために、骨髄移植後に末梢血を経時的に回収し、白血球と血小板の量を解析した。その結果、PAI-1 阻害剤投与群は、白血球や血小板の早期回復が認められた。すなわち、造血幹細胞移植後の PAI-1 活性の阻害は、骨髄抑制からの早期回復を促進するということが明らかとなった。

PAI-1 阻害剤による造血回復の増強は、造血幹細胞レベルで作用していることが推測される。そこで、PAI-1 阻害が造血幹細胞細胞の増殖期への誘導を促進していることを確認するために、Ki67 を指標とした解析を行った。その結果、PAI-1 阻害薬により、造血幹細胞の Ki67 陽性の割合が増強していることから、盛んに増殖を行っていることが確認された。さらに、組織学的な解析においても、PAI-1 阻害剤投与群の方がニッチ領域に存在する PCNA 陽性の造血幹細胞細胞の割合が高いことから、PAI-1 活性の抑制は造血幹細胞の増殖を誘導すると同時にニッチ細胞との相互作用を促進することを明らかにした。このことは、造血幹細胞が幹細胞活性を維持したまま増幅していることを示唆する。

そこで、PAI-1 阻害薬の投与による自己複製能に及ぼす影響を評価するために、移植後の 15 週目に 2 次移植を行った結果、PAI-1 活性を阻害することによって、自己複製能の増強による造血再生能の亢進が確認された。さらに、移植細胞数を段階的に減らしていった場合の生着率も高いことから、PAI-1 阻害剤は長期造血維持能を保持した造血幹細胞を増幅する作用があることを明らかにした。

本研究により、(1) 移植前処置によってニッチから産生される PAI-1 分子は、造血再生を負に制御していることを明確にした。そして、(2) PAI-1 阻害薬を用いて PAI-1 活性を抑制することによって、t-PA 主導の造血因

子の発現上昇による造血再生の迅速化のみならず、長期間にわたる造血系の恒常性の維持が達成された。

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6件)

1. Matsushita H, Yahata T, Sheng Y, Nakamura Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Tanaka M, Hayashi H, Sato T, Damdinsuren A, Onizuka M, Ito M, Miyachi H, Pandolfi PP, Ando K. Establishment of a humanized APL model via the transplantation of PML-RARA-transduced human common myeloid progenitors into immunodeficient mice. PLoS One. 2014 Nov 4;9(11):e111082. doi: 10.1371/journal.pone.0111082.(査読有り)
2. Kawai H, Matsushita H, Suzuki R, Sheng Y, Lu J, Matsuzawa H, Yahata T, Tsuma-Kaneko M, Tsukamoto H, Kawada H, Ogawa Y, Ando K. Functional analysis of the SEPT9-ABL1 chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. Leuk Res. 2014 Dec;38(12):1451-9. doi: 10.1016/j.leukres.2014.08.015. (査読有り)
3. Negishi N, Suzuki D, Ito R, Irie N, Matsuo K, 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 Jagged1. Exp Hematol. 2014 Jun;42(6):487-94.e1. doi:

10.1016/j.exphem.2014.02.001. (査読有り)

4. 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. 2014 Apr;32(4):946-58. doi: 10.1002/stem.1577. (査読有り)
5. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, Harada H. RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. Blood. 2013 Apr 25;121(17):3434-46. doi: 10.1182/blood-2012-06-434423. (査読有り)
6. Inoue S, Sato T, Suzuki-Utsunomiya K, Komori Y, Hozumi K, Chiba T, Yahata T, Nakai K, Inokuchi S. Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice. Shock. 2013 Mar;39(3):311-6. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182845445. (査読有り)

[学会発表](計4件)

1. 八幡 崇、超免疫不全マウスを利用したヒト造血再生の解析、第47回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2014年1月31日、アルカディア市ヶ谷(東京都千代田区)
2. 八幡 崇、ニッチ因子を標的とした新規造血促進薬の開発、第23回日本サイトメトリー学会、2013年6月22日、日本医科大学橋桜会館(東京都文京区)
3. 八幡 崇、免疫不全マウスを用いたヒト造血幹細胞老化メカニズムの解析、第46回日本無菌生物ノートバイオロジー

- 学会、2013年1月25日、フォーラム246（神奈川県伊勢原市）
4. 八幡 崇、Non-telomeric stem cell aging in hematopoietic regeneration、第74回日本血液学会、2012年10月19日、国立京都国際会館（京都府左京区）

〔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：同上
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

八幡 崇 (YAHATA, Takashi)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10398753

(2) 連携研究者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014

宮田 敏男 (MIYATA, Toshio)
東北大学・医学系・教授
研究者番号：10222332

アブドゥル アジズ (IBRAHIM, Abd Aziz)
東海大学・医学部・研究員
研究者番号：50738789