

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860792

研究課題名(和文) CMLのオートクライン・パラクラインによる増殖メカニズムの解明と治療的制御の開発

研究課題名(英文) The mechanism of autocrine and paracrine growth promotion of CML cells

研究代表者

杉谷 未央 (Sugitani, Mio)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：60648749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(CML)の完治はBcr-Abl融合チロシンキナーゼ阻害剤(TKIs)のみでは困難であり、その一因に骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性がある。我々はGalectin-3(Gal-3)がCMLにおける骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性に重要な分子であることを突き止め、更にGal-3過剰発現CML細胞培養上清ではがん細胞の増殖を抑制するSERPINA1が特異的に消失すること、PP2A活性化剤FTY720はGal-3誘導性TKI抵抗性を克服しつること、Gal-3過剰発現CML細胞株ではがん幹細胞や薬剤抵抗性のマーカーであるALDH1の発現が亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tyrosin kinase inhibitors(TKIs) for BCR-ABL have dramatically improved the outcome of chronic myelogenous leukemia(CML). However, the complete elimination of CML clones has been rarely achieved by TKIs due to a variety of protective mechanisms. One reason for TKI resistance is the bone marrow microenvironment(BMME)-mediated drug resistance. We found that BMME-induced galectin-3(Gal-3) in CML plays an important role in drug resistance in previous study. Furthermore, we in this study disclosed the results as follows. The bovine SERPINA1-fetal bovine serum albumin complex was specifically suppressed in conditioned medium from Gal-3-overexpressing cells. Suppression of SERPINA1-albumin complex by Gal-3 overexpression led to paracrine growth promotion of CML cells. The combination of TKI and PP2A activator FTY720 could overcome Gal-3-mediated drug resistance to TKI. ALDH1 known as the marker of cancer stem cell and drug resistance was induced by Gal-3 overexpression in CML cells.

研究分野：慢性骨髄性白血病の骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性

キーワード：慢性骨髄性白血病 Galectin-3 骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性 オートクライン・パラクライン 幹細胞能

### 1. 研究開始当初の背景

近年、造血器悪性腫瘍における疾患特異的な分子異常を標的とした様々な新規分子標的薬が開発され、治療成績は飛躍的に改善した。慢性骨髄性白血病(CML)では、Bcr-Abl融合チロシンキナーゼを分子標的とした特異的阻害剤(TKIs)の開発と臨床導入により、劇的に治療予後は改善された。しかしながら、現有の分子標的治療薬による完治はいまだに困難であり、さらなる分子標的の同定と薬剤の開発は極めて重要な課題である。

悪性腫瘍の治療抵抗性獲得機序には、がん細胞自身の遺伝子変異や分子制御以上などによる「自然耐性」と、腫瘍環境因子によって誘導される「獲得耐性」がある。CMLではAbl kinase domain変異やBcr-Abl過剰発現、Bcr-Abl非依存性の付加的遺伝子異常など「自然耐性」については詳細な分子メカニズムが明らかになり、その克服法もほぼ確立されつつある。一方、腫瘍環境由来「獲得耐性」のメカニズムについての解明は、いまだに十分ではなく、今後に残された研究課題である。

### 2. 研究の目的

Bcr-Abl融合チロシンキナーゼを分子標的とした特異的阻害剤(TKIs)の登場により、CMLの治療成績は劇的に改善した。しかしながら、TKIsのみではCMLの完治はいまだに困難であり、その原因の一つとして、骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性が挙げられる。我々は、Galectin-3(Gal-3)がCMLにおける骨髄腫瘍環境由来治療抵抗性のメカニズムの重要なシグナル媒介分子であることを突き止め、白血病細胞の増殖、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た。この研究課程において、Gal-3は白血病細胞内の抗アポトーシス分子や細胞増殖促進分子の発現・活性を亢進するのみならず、白血病細胞、骨髄間質細胞のオートクライン・パラクライン増殖を誘導する液性因子を産生・分泌することが明らかになった。こうした白血病細胞、ならびに骨髄間質細胞の増殖を促進するpositive feedback機構は既存のTKIsでは制御不能な治療抵抗性獲得メカニズムであると同時に、白血病病態形成の根幹に触れる重要な研究課題といえる。本研究では骨髄腫瘍環境において、Gal-3が制御するCMLのオートクライン・パラクラインによる増殖メカニズムの解明と治療的制御戦略の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) CML細胞のGal-3誘導性オートクライン・パラクライン増殖メカニズムを誘導する液性因子の同定

CML細胞親株(MYL、K562)、Gal-3過剰発現CML細胞株(MYL/G3、K562/G3)の作成

CML細胞親株、ならびにGal-3過剰発現

CML細胞株の培養上清(conditioned medium: CM)の含有成分の検討

- ・液体クロマトグラフィーによるCMの分析
- ・造血サイトカイン・ケモカインアレイによるセミグローバル解析

(2) Gal-3誘導性TKI抵抗性の克服効果の検討

protein phosphatase 2A(PP2A)活性化剤FTY720によるアポトーシス誘導の検討

FTY720とTKI併用によるGal-3誘導性TKI抵抗性の克服効果の検討

(3) Gal-3過剰発現によるCML細胞の形質変化の検討

Gal-3過剰発現CML細胞株は親株に比し、細胞増殖能のみならず、コロニー形成能も亢進していることから、この幹細胞性獲得を促進する分子の同定を行った。

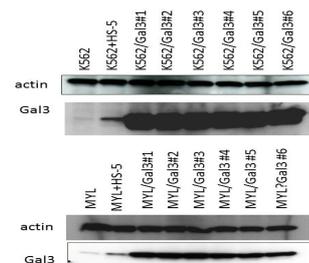
### 4. 研究成果

(1) CML細胞のGal-3誘導性オートクライン・パラクライン増殖メカニズムを誘導する液性因子の同定

CML細胞親株(MYL、K562)、Gal-3過剰発現CML細胞株(MYL/G3、K562/G3)の作成

CML細胞親株(MYL、K562)にGal-3をElectroporation法、もしくはNucleofection法により遺伝子導入を行い、Gal-3過剰発現CML細胞株(MYL/G3、K562/G3)を作成した。(図1)

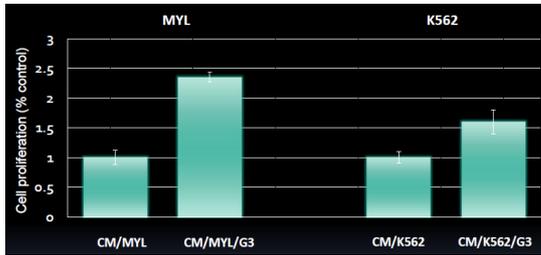
(図1)



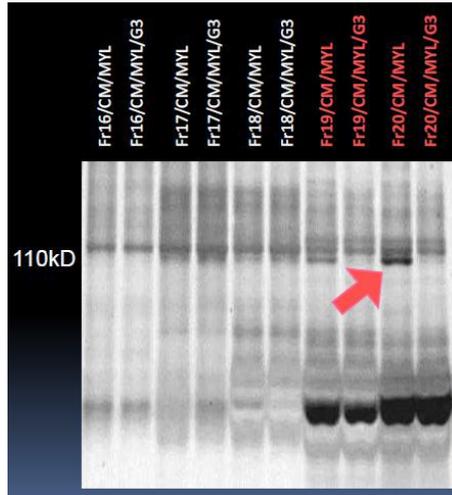
CML細胞親株、ならびにGal-3過剰発現CML細胞株の培養上清(conditioned medium: CM)の含有成分の検討

・液体クロマトグラフィーによるCMの分析  
K562/CMに比しK562/G3/CMが、MYL/CMに比しMYL/G3/CMが、いずれもCML細胞ならびに骨髄間質細胞(BMSC)の増殖を促進することから(図2)、それぞれのCMを液体クロマトグラフィーで分離し、含有成分を検討した。その結果、Gal-3過剰発現CML細胞株のCMは親株のCMに比し、SERPINA1とアルブミンの複合体が特異的に消失していた(図3)。Gal-3はSERPINA1と結合能を有し、SERPINA1はがん細胞の増殖を抑制することが知られていることから、Gal-3過剰発現CML細胞株のCMではGal-3とSERPINA1が結合することにより、SERPINA1とアルブミンの複合体が特異的に消失し、がん細胞の増殖を促進することが

示唆された。

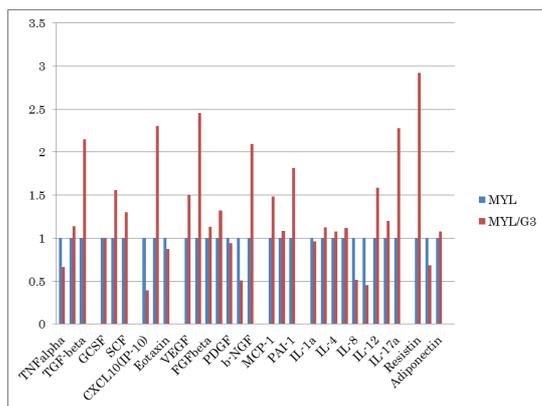


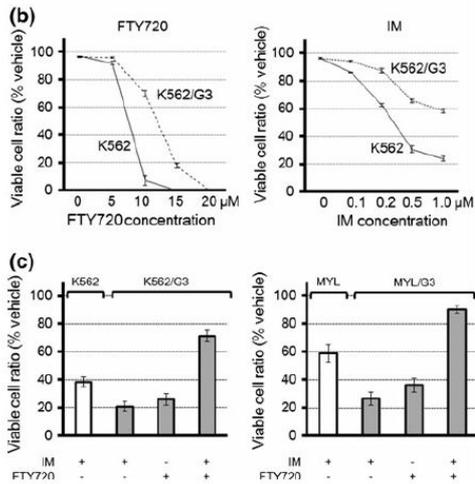
(図 2)



(図 3)

・造血サイトカイン・ケモカインアレイによるセミグローバル解析  
 CML 細胞親株、Gal-3 過剰発現 CML 細胞株の CM を造血サイトカイン蛍光測定アレイで解析したところ、Gal-3 過剰発現 CML 細胞株由来 CM では親株由来 CM と比較し、TGF- $\beta$  が 2 倍以上に増加し、CXCL-10 や IL-10 が半分以下に減少していた。(図 4)

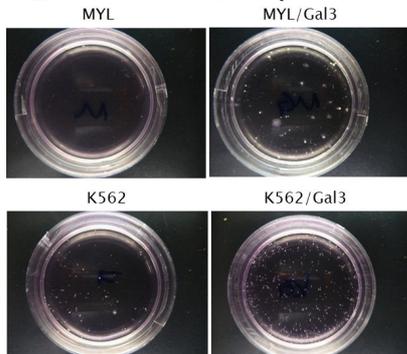




(図7)

### (3) Gal-3 過剰発現による CML 細胞の形質変化の検討

Gal-3 過剰発現 CML 細胞株は親株に比し、細胞増殖能のみならず、コロニー形成能も亢進していることから (図8、未発表データ)



(図8)

この幹細胞性獲得を促進する分子の同定を行った。Gal-3 過剰発現 CML 細胞株では、cancer stem cell や薬剤抵抗性のマーカーである ALDH1 の発現が亢進していた。

### 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4件)

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

Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M.

Phosphoinositide protein kinase PDPK1 is a crucial cell signaling mediator in multiple myeloma.

Cancer Res. 2014 74 7418-7429

査読有

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1420.

Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y,

Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M.

8q24 amplified segments involve novel fusion genes between NSMCE2 and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemias.

J Hematol Oncol. 2014 23 68-72

査読有。

doi: 10.1186/s13045-014-0068-2.

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, Sato K, Taniwaki M.

Suppression of SERPINA1-albumin complex formation by galectin-3 overexpression leads to paracrine growth promotion of chronic myelogenous leukemic cells.

Leukemia Res. 2014 38 103-108.

査読有。

doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.026.

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. 2013 18 1437-1446

査読有。

doi: 10.1007/s10495-013-0882-y.

[学会発表](計5件)

Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Kobayashi S, Nishida k, Maegawa S, Kiyota M, Mizutani S, Shimura Y, Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M.

PVT-1-NSMCE2 fusion gene enhances BCL-XL expression and drug resistance in leukemic cells.

第76回日本血液学会学術集会

2014年10月31日大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Chinen Y, Kuroda J, Shimura Y, Nagoshi H, Kiyota M, Sugitani M, Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M.

Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 is a crucial cell signaling mediator in multiple myeloma.

第76回日本血液学会学術集会

2014年11月1日大阪国際会議場(大阪府大阪市)

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.

54<sup>th</sup> ASH annual meeting

2012年12月10日アトランタ(アメリカ合衆国)

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, Satou 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

2012年10月20日国立京都国際会館(京都府京都市)

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 pathways in CML.

第74回日本血液学会学術集会

2012年10月20日国立京都国際会館(京都府京都市)

〔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:

出願年月日:

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

杉谷 未央 (Yamamoto-Sugitani Mio)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号: 60648749

(2) 研究分担者

谷脇 雅史 (Taniwaki Masafumi)

京都府立医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 80163640

黒田 純也 (Kuroda Junya)

京都府立医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70433258

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: