

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860796

研究課題名(和文) 生体内に残存するCML幹細胞の同定と特性解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of CML stem cell during TKI treatment

研究代表者

平瀬 主税 (HIRASE, Chikara)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30548590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TKIは慢性期CMLの予後を改善したが、奏功を得ている殆どの症例がTKI中止により再発することから、CML幹細胞(LSCs)に対する新たな戦略が求められている。申請者らは、新規のLSCs表面分子としてCD120a、CD225、CD284を同定した。これらは、治療効果の評価や病勢のモニタリングに有用であるだけでなく、TNF- α -CD120a-NF- κ BシグナルがLSCsの増殖に作用することから、LSCsを根絶する上での標的となる可能性が示唆された。一方、個々のLSCsではmir-203プロモーターのエピジェネティックな状態が異なり、その結果として不均一なBcr/Ablの発現がもたらされていた。

研究成果の概要(英文)：TKIs have dramatically improved clinical outcomes of the patients with CML-CP. However, even if these patients maintained deep molecular responses, discontinuation of TKI results in early relapse in most cases. Therefore, new therapeutic strategies to eradicate CML stem cells (LSCs) are required to cure CML. We previously identified CD120a, CD225, and CD284 as novel surface molecules on LSCs. Our examination of clinical samples revealed that the detection of these molecules on CD34+CD38- cells might be helpful to evaluate therapeutic effects and to monitor condition changes in CML patients. Also, because TNF- α -CD120a-NF- κ B signaling promoted LSC proliferation, targeting these molecules may represent an attractive therapeutic approach to eradicate CML stem cells. On the other hands, expression analysis of miRNA which control the level of Abl indicated that epigenetic state of mir-203 promoter was diverse, thereby inducing various expression levels of Bcr/Abl in individual LSCs.

研究分野：血液内科学

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 微小残存病変 miRNA

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病(CML)の治療において、チロシンキナーゼ阻害剤(TKIs)は、その予後を劇的に改善した。しかしながら、bcr-ablが検出感度以下まで減少した分子遺伝学的大寛解(MMR)症例ですら、TKIs内服中止によりその多くが再発してくることから、TKIs抵抗性のCML幹細胞を標的とした新たな治療薬の開発が求められている。

2. 研究の目的

申請者らは、生体内の未分化なCML細胞特異的に発現する分子(CD120a, CD225, CD284)を同定した。本研究では、これらの分子のCML幹細胞マーカーとしての有用性を検証し、新たな微小残存病変(MRD)の評価法や抗体治療薬など臨床応用へと展開するための基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 未分化CML細胞特異的に発現する分子を用いたMRD検出

計22例における骨髓有核細胞中のCD34+38-かつCD225+120a+細胞(CML幹細胞)の頻度を継時的に解析した。single cell PCR法を用いてbcr-ablの発現量、ablの発現に作用するmiRNAの発現量を解析した。

2) 未分化CML細胞特異抗原陽性細胞の特性解析

初発時に採取したCD34+38-かつCD225+120a+細胞、CD225-120a-細胞をTNFで刺激し、NF- κ Bの活性化変化をFACSにて解析した。

4. 研究成果

本年度は、申請者らが見出した未分化なCML細胞特異的に発現する分子(CD120a, CD225, CD294, CD320)を用いたMRD検出、および未分化CML細胞特異抗原の生理作用について検討を行った。計22例における骨

髄有核細胞中のCD34+38-かつCD225+120a+細胞(CML幹細胞)の頻度を継時的に解析した。いずれの症例においても治療に伴いその頻度は減少すること、ある一定の頻度を保ったまま推移する症例があること、また臨床上同じ分子遺伝学的寛解を得ている症例においても、確実に細胞集団として検出できる症例と、できない症例があることが明らかとなった。今後より多くの症例で同様の検討を行う必要はあるが、このようなkineticsを通して、CML特異抗原の発現がTKIに対する長期的な反応を予測できるマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、CD120aは、TNF

受容体として知られているが、CML幹細胞における作用については明らかではない。初発時に採取したCD34+38-かつCD225+120a+細胞、CD225-120a-細胞をTNFで刺激した場合、CD225+120a+細胞において有意にNF-

κ Bの活性化が誘導された。プロテアソーム阻害剤によりNF- κ Bの活性を抑制すると、CD225+120a+細胞に著明な細胞死が誘導されたことから、未分化なCML細胞では、TNF- α -CD120a-NF- κ Bを介した生存シグナルが機能していると推測された。また、未分化CML細胞におけるbcr-ablの発現量をsingle cellで解析した結果、大部分が治療前と比較してMMR到達時には約1/10程度に減少していたが、初発時と同程度の発現を認める症例や、bcr-ablだけでなく内部コントロールablの検出されない症例が認められた。後者に関し、ablの発現に作用するmiRNAの発現変化を解析した結果、mir203, 30a, 27b, 10aの発現が初発時には未分化CML細胞特異的に抑制され、寛解期に回復していた。さらに、各miRNAのプロモーター領域のメチル化状態をTKI投与前後で比較した結果、ablが検出できた症例、できなかった症例いずれも、初発時にはmir203のプロモーターはメチル化されていたのに対し、MMR時では、ablを検出できなかった症例でのみ脱メチル化され

ていた。以上の結果、臨床上同じ寛解状態を得ている症例においても、CML 幹細胞の状態はかなり異なると考えられた。

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9件)

Morita Y, Hirase C, Matsumura I (15名中5番目) HIV-negative Primary Bone Marrow Hodgkin Lymphoma Manifesting with a High Fever Associated with Hemophagocytosis as the Initial Symptom: A Case Report and Review of the Previous Literature, Internal Medicine, 査読有、54巻、2015、1393-6、

DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3770.

田中宏和、平瀬主税、松村 到

CML 幹細胞のチロシンキナーゼ阻害剤耐性機序と治癒を目指した新たな治療標的、臨床血液、査読有、56巻2号、2015、139-149、
DOI: 10.11406/rinketsu.56.139.

金井良高、平瀬主税、谷口康博(11名中5番目) Trib1 and Trib2 inhibit granulocytic differentiation by suppressing Akt pathway, Acta Med Kinki Univ, 査読有、Vol39No.1、2014、29-37、
<http://kurepo.lib.kindai.ac.jp>

平瀬主税、田中宏和、松村到

慢性骨髄性白血病における ELN2013、血液内科、査読有、第68巻3号、2014、399-404
<http://www.kahyo.com>

宮武淳一、平瀬主税、松村到

慢性骨髄性白血病、臨床腫瘍ブラクティス、査読有、Vol10 No.1、2014、43-48

平瀬主税、松村 到、慢性骨髄性白血病、臨床と研究、査読有、第90巻第11号、2013年、48-56、

平瀬主税、田中宏和、松村到

慢性骨髄性白血病、日本臨床、査読有、23巻、2013、67-72

田中宏和、平瀬主税、松村到

慢性好酸球性白血病、非特定型、日本臨床、査読有、23巻、2013、80-82

Oiso N, Hirase C, Morita Y (10名中2番目)

Localized giant haematoma and subsequent widespread purpura as a sign of acquired haemophilia A, Australasian Journal of Dermatology, 査読有、Vol54, Issue3, 2013、e67-e69、

DOI:10.1111/j.1440-0960.2012.00907

[学会発表](計26件)

末田早苗、平瀬主税、福井綾彩乃、森田康慶、辰巳陽一、芦田隆司、松村到、寒冷疑集症を契機に診断された

diffuse large B cell lymphoma(DLBCL)の1例、第210回 日本内科学会近畿地方会、2015年11月28日、「神戸国際会議場(神戸市)」

角谷宏明、芹澤憲太郎、平瀬主税(10名中5番目)、骨原発ホジキンリンパ腫の1例、第210回 日本内科学会近畿地方会、2015年11月28日、「神戸国際会議場(神戸市)」

藤本昂、頼晋也、平瀬主税(9名中4番目)、CLLの経過中に発症した

Hodgkin variant of Richter syndromeの一例、第104回近畿血液学地方会、2015年11月7日、京都

芹澤憲太郎、角谷宏明、平瀬主税(14名中9番目)、Analysis of MECP regimen with relapsed or refractory malignant lymphoma in our institution、第77回日本血液学会学

術集会、2015年10月16日、「石川県立音楽堂（金沢市）」

Ashida T, Iwata Y, Hirase C (19人中6名)、Antithymocyte globulin in second-line treatment of

steroid-refractory acute GVHD、第77回日本血液学会学術集会、2015年10月、「石川県立音楽堂（金沢市）」
芦田隆司、福井彩乃、平瀬主税 (17名中6番目)、臍帯血移植における前処置の比較-全身放射線照射と抗胸腺グロブリン、第63回日本輸血細胞治療学会、2015年5月28、「京王プラザホテル（新宿区）」

口分田貴裕、岩田 吉生、平瀬主税 (18名中12番目)、若年劇症型再生不良性貧血に対する臍帯血移植に成功した一例、第37回日本造血細胞移植学会学術総会、2015年3月7日、「神戸ポートピアホテル(神戸市)」

芹澤憲太郎、森田泰慶、平瀬主税 (15名中10番目)、同種造血幹細胞移植前処置におけるフルダラビン併用下での静注ブスルファン使用量の後方視的解析、第37回日本造血細胞移植学会学術総会、2015年3月7日、「神戸ポートピアホテル（神戸市）」

芦田隆司、岩田 吉生、平瀬主税 (20名中10番目)、KDIGO基準を用いた非進行期造血器疾患患者に対する造血幹細胞移植後の急性腎障害に関する検討、第37回日本造血細胞移植学会学術総会、2015年3月7日、「神戸国際会議場（神戸市）」

宮武淳一、岩田 吉生、平瀬主税 (18名中13番目)、同種造血幹細胞移植患者に対するフルコナゾールとイトラコナゾールによる侵襲性アスペルギローシス予防効果の比較：D-index scoreを用いた後方視的解析、第37回日本造

血細胞移植学会学術総会、2015年3月6日、「神戸ポートピアホテル（神戸市）」

池田守、芹澤憲太郎、平瀬主税 (10名中5番目)、同種造血幹細胞移植後、二次生着不全に対してドナーリンパ球輸注が有効であった1例、第206回日本内科学会近畿地方会、2014年12月6日、「メルパルク京都（京都市）」

源周治、平瀬主税、金井良高 (6名中2番目)、分子遺伝学的寛解中の慢性骨髄性白血病に合併したびまん性第細胞型B細胞リンパ腫の1例、第206回日本内科学会近畿地方会、2014年12月6日、「メルパルク京都（京都市）」

平瀬主税、慢性骨髄性白血病・骨髄増殖性腫瘍、NPO法人 血液情報広場つばさフォーラム in Osaka、2014年11月29日、「TKP 大阪本町ビジネスセンター（大阪市）」

Serizawa K, Morita Y, Hirase C (12名中7番目)、Analysis of conditioning regimen for ASCT with relapsed or refractory malignant lymphoma、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（大阪市）」

Taniguchi T, Serizawa K, Hirase C (13名中8番目)、A case of Mogamulizunab treatment for refractory ATLL to DLI following allo-SCT、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（大阪市）」

芦田隆司、芹澤憲太郎、平瀬主税 (20名中10番目)、造血幹細胞移植後

の真菌感染症に対する低用量アムホテ
リシンBリポーム製剤の安全性および有
用性に関する検討、第36回日本造血細
胞移植学会総会、2014年3月7日、沖縄
コンベンションセンター（宜野湾市）

芹澤 憲太郎、森田 泰慶、平瀬主税（15
名中9番目）、当院における同種造血幹
細胞移植時のダブトマイシンの有用性
と安全性、第36回日本造血細胞移植学
会総会、2014年3月7日、沖縄コンベン
ションセンター（宜野湾市）

谷口貴英、芹澤憲太郎、森田泰慶、平瀬主
税、田中宏和、嶋田高広、宮武 淳一、
辰巳陽一、芦田隆司、松村到、高齢者 B-cell
lymphoma, unclassifiable with features
intermediate between diffuse
large B-cell lymphoma and lymphoma に対
して自家造血細胞移植で長期生存が得ら
れている1例、第202回日本内科学会近畿
地方会、2013年12月14日、「大阪国際交
流センター（大阪市）」

福井彩乃、平瀬主税、江本正克（10名中2
番目）、T cell/histiocyte-rich large
B-cell lymphoma (THRLBCL) の一例、第202
回日本内科学会近畿地方会、2013年12月
14日、大阪国際交流センター（大阪市）

Kanai Y, Shimada T, Hirase C (11名中
5番目)、Trib1 and Trib2 block myeloid
differentiation by suppressing AKT
phosphorylation、第75回日本血液学会
学術集会、2013年10月11日、「ロイト
ン札幌（札幌市）」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平瀬 主税 (HIRASE, Chikara)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：30548590