

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870564

研究課題名(和文) インテグリンを介した白血病残存戦略の解明

研究課題名(英文) Investigation of survival strategy of refractory leukemia via integrin

## 研究代表者

兼田 加珠子(中島加珠子)(Kaneda, Kazuko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：00533209

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)：転写因子EVI1は白血病の原因遺伝子候補であり、EVI1高発現白血病は薬剤耐性を示し予後不良である。本研究では白血病細胞のニッチでの維持に関わる分子機構を明らかにし、ITGA6/B4を標的とした新規治療法開発の基礎研究を進めた。まずプロモーター解析によりEVI1を介した転写制御機構を明らかにした。次にITGA6/B4を介する接着で薬剤耐性が増強し、抗アポトーシス作用を誘導され、細胞周期が静止することを明らかにした。また中和抗体によるシグナル阻害により、ニッチへの結合と薬剤耐性との相関を示した。動物モデルで中和抗体の予備的治療を検討し、抗体が予後不良白血病の治療に有効であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：EVI1 is one of the candidate oncogenes for human acute myeloid leukemia (AML). High EVI1 expression (EVI1high) is a risk factor for AML with poor outcome. We reported that expression of ITGA6 is associated with drug-resistance and increased cell adhesion, resulting in poor prognosis. We found that treating EVI1high leukemia cells with neutralizing antibodies against ITGA6/B4 resulted in an enhanced responsiveness to anti-cancer drugs and a reduction of their cell adhesion ability. The expression of ITGA6/B4 are significantly elevated in cells from relapsed and EVI1high AML cases and EVI1high AML cell lines; therefore, ITGA6/B4 might represent an important therapeutic target for both refractory and EVI1high AML. Neutralizing antibody against ITGA6/B4 might be expected as new drug combined administration with anti-cancer drug. We also clarified the regulation system of ITGA6/B4 via EVI1. This might be useful for development of new drug for EVI1high leukemia with bad prognosis.

研究分野：生化学

キーワード：インテグリン 転写因子 薬剤耐性 白血病

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト急性骨髄性白血病(AML)の全体の約50%は難治性且つ予後不良である。我々はこれまで難治性白血病の中で3番染色体長腕に集中する染色体異常のゲノム解析から転写因子 EVI1 並びにそのファミリーである MEL1/PRDM16 を t(1:3)転座を有する AML より単離し、その機能解析を行ってきた [Morishita K, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992; Mochizuki N, *et al.* Blood 2000]。

近年、化学療法不能性を示す難治性白血病の病態の実態が、白血病幹細胞(LSC)が骨髄幹細胞(HSC)ニッチに入り込み、低酸素、放射線、化学療法に耐性を有する状態、いわゆる「ニッチジャック」であることがわかってきた。このニッチジャックに関わる細胞接着性分子候補として VLA4(インテグリン 4 1)の高発現が有り、化学療法後の残存白血病細胞(MRD)の原因であると報告された [Matsunaga T, *et al.* Nat Med 2003]。しかし、近年米国での大規模グループ研究により、VLA4 の発現亢進の有無による予後の差はないことが報告された [Becker PS, *et al.* Blood 2009]。従って LSC における骨髄ニッチ接着性に関わる新規接着分子を同定し、それを標的とした「LSC 追い出し治療法」が開発できれば、難治性白血病の予後不良を解決できる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

転写因子 EVI1 は白血病の原因遺伝子候補であり、EVI1 高発現白血病は抗がん剤耐性を示し予後不良である。我々は抗がん剤耐性の原因として EVI1 高発現白血病細胞の持つ細胞接着性亢進に着目し、その原因として接着分子インテグリン 6 4 複合体(ITGA6/B4)を同定した。白血病幹細胞において ITGA6/B4 は骨髄ニッチへの接着性を亢進させ、細胞周期を停止し、抗がん剤耐性を増強した。本研究では、ITGA6/B4 に依存した白血病幹細胞の骨髄ニッチでの細胞維持に関わる分子機構を明らかにし、将来的に ITGA6/B4 を標的とした新規治療法を開発するための基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

### 1. EVI1 による ITGA6/B4 の転写制御機構の解明

#### a. ITGA6/B4 のプロモーター解析による EVI1 結合部位の同定

EVI1 高発現白血病においては ITGA6/B4 が有意に高発現している。我々は EVI1 の発現によって ITGA6/B4 の発現が制御される事を明らかにした [Yamakawa N and Kaneda K, *et al.* PLoS One, 2012]。この制御機構を解明する為に、ITGA6 と ITGB4 の数 kb プロモータ

ー上流領域を単離し Luciferase 転写調節系にを利用した調節機構の検討を行った。また、ChIP sequence を行い、より詳細な結合部位の検討を行った。しかしながら、ITGA6 と ITGB4 の promoter 領域には EVI1 結合領域を見いだす事が出来なかった。

#### b. EVI1 と GATA2 の相互作用の解明

そこで、EVI1 による間接的な ITGA6/B4 の発現制御の存在を仮定して探索を行った。その結果、両 promoter 領域には GATA2 の結合部位が複数存在することが明らかとなった。また、免疫沈降法により GATA2 と EVI1 との結合を示唆された。今後、結合領域の変異体を利用したゲルシフトアッセイを行い、結合領域の絞り込みを行う。

## 2. 細胞外マトリクス依存的なシグナル伝達経路の解明

### a. 接着シグナルによる細胞周期の制御の解明

我々は EVI1 高発現白血病細胞において、ラミニン複合体に志向性の細胞接着能を同定し、その後遺伝子発現解析により ITGA6/B4 がその責任遺伝子である可能性を示した [Yamakawa N and Kaneda K, *et al.* PLoS One, 2012]。

さらに接着によるシグナルが細胞周期を止め、抗がん剤耐性を得ている結果を証明する為に、細胞周期のインジケーターである Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)安定発現の白血病細胞株を構築し、接着シグナルによる細胞周期の変化を同定することを目指す。

### b. ラミニンの発現と接着能の検討

骨芽細胞におけるラミニンとフィブロネクチンの局在と、白血病細胞との結合状態の検討を行う。また、ラミニンやフィブロネクチンをコートしたプレートを用い、接着シグナルの相違を細胞周期マーカー遺伝子(p21、p27、p57、Cdk ファミリー)の発現で評価する。

## 3. 細胞接着分子と抗がん剤感受性の関係の解明

### a. 細胞接着分子発現レベルと抗がん剤耐性性の比較

ITGA6、ITGB4 それぞれの発現抑制白血病細胞株を用いて各種細胞外マトリクス (fibronectin、ラミニンをプレートにコートする)、及び骨芽細胞に対する接着能の違いによる細胞増殖、細胞接着性、細胞内情報伝達系、並びに抗がん剤耐性性を検討する。この事により ITGA6/B4 と抗がん剤感受性の関係を明らかにする。また ITGA6/B4 中和抗体による特異的シグナルの遮断を試みる。

### b. EVI1 発現レベルと抗がん剤耐性性の比較

EVI1 発現抑制白血病細胞株及び EVI1 過剰発現白血病細胞株を用いる。この細胞株を用いて a と同様に細胞増殖、細胞接着性、細胞内情報伝達系、並びに抗がん剤耐性を検討する。

#### 4. 細胞接着性と細胞周期との関連及びシグナル伝達経路の解明

##### a. 細胞接着性と細胞周期の関連の解明

3 で作製した Fucci 発現白血病細胞株を用い、白血病細胞を各種マトリクスに結合させ、細胞周期の各 Phase の割合を検討する。

##### b. 細胞周期に関わる接着分子特異的シグナル伝達経路の解明

細胞接着状態と浮遊状態における細胞周期と各種シグナル関連分子の活性化状態（リン酸化、ユビキチン化）を比較し、接着状態に特異的な経路を明らかにする。

##### c. 接着状態における網羅的遺伝子解析

細胞接着状態と浮遊状態における EVI1 高発現並びに低発現細胞株での網羅的遺伝子発現解析、並びに、ChIP sequence による EVI1 標的遺伝子群の相違を検討し、ニッチ接着状態での白血病幹細胞の性質を明らかにする。

#### 5. EVI1 高発現白血病モデルマウスを用いた骨髄ニッチにおける幹細胞と接着能との関連の探索

##### a. 白血病モデルマウスの作成

免疫不全マウスに Fucci 発現 EVI1 高発現細胞株を移植する事により、EVI1 高発現白血病のモデルマウスを作成し、予後の検討を行う。

##### b. ITGA6/B4 の免疫組織染色の検討

a のモデルマウスにおいて、ニッチにおける ITGA6/B4 の発現を免疫組織染色により検討し、Fucci の蛍光と比較する事で、細胞周期との関係を明らかにする。また、ScaleA2 試薬を用い、造血組織を透明化する事で組織への腫瘍細胞の浸潤を三次元的に示す。

#### 4. 研究成果

##### EVI1 による ITGA6/B4 の転写制御機構の解明

EVI1 による ITGA6/B4 転写調節機構及び細胞接着能の制御機構の解明を目指してプロモーター領域の検討を行った結果、ITGA6 及び ITGB4 の上流 2kb に EVI1 または GATA2 が直接結合し、転写活性化に寄与する領域があることが明らかとなった。これら 2 つの分子の協調により発現制御されている可能性が示唆された為、結合様式の検討を行った所、タンパク-タンパク結合であることが示唆された。

これらの転写活性化は、プロモーター断片の変異体を用いた検討に置いて明らかに低下した。また、EVI1 の変異体を用いた検討により、ITGA6 のプロモーター領域において、EVI1 および GATA2 による転写活性化には EVI1 の Zinc Finger モチーフの 7 回リピート部位が重要であることが明らかとなった(図 )。

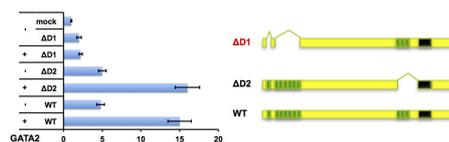


図 ITGA6 のプロモーター解析結果

##### 細胞接着と細胞周期の制御による白血病細胞の生き残り戦略の解明

EVI1 高発現白血病細胞におけるラミニン-ITGA6/B4 依存性接着シグナルによる、抗アポトーシス作用や PI3K/AKT 情報伝達系、FAK-Cdk 情報伝達系の活性化の解析を実施した。その結果、ITGA6/B4 を介した接着により、抗アポトーシス作用が増強されることが明らかとなった。また、抗インテグリン抗体で処理すると、これらの接着シグナルが相殺されることが明らかとなり(図 )、本抗体がラミニン-ITGA6/B4 依存性接着シグナルを遮断することにより、新規治療薬としての有効性を発揮する可能性が明らかとなった。

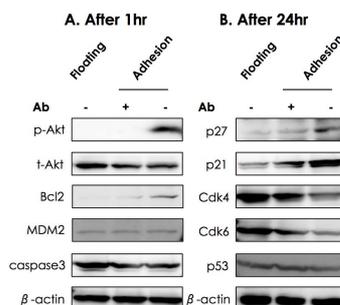


図 接着によるシグナルと抗体の効果

##### 細胞接着と抗がん剤耐性の関連の解明

標的遺伝子群の発現抑制細胞株や Fucci 発現細胞を作成し、細胞増殖及び接着、細胞内情報伝達系を検討し、抗がん剤耐性との関係の検討を目指した。EVI1 発現抑制白血病細胞株においては、コントロール細胞に比べて明らかに接着性の低下と抗がん剤耐性の喪失が認められた(図 )。また、これらの抗がん剤耐性の喪失は抗インテグリン抗体で処理することにより、再現することが出来た。そこで、pTRE-Cell cycle vector 導入細胞を構築し、同様の目的に供する準備を行った。

##### 抗インテグリン抗体投与による予備的治療法の有効性の検討

免疫不全マウスに EVI1 高発現白血病細胞株である UCSD/AML1 及び HNT-34 細胞を移植

し EVI1 高発現白血病のモデルマウスを作成し、予備的治療法の有効性の検討を行った。その結果、抗インテグリン投与群では、有意に臓器への浸潤が抑えられ(図)、予後が伸びることが明らかとなった。さらに、本抗体は既存の抗がん薬の効果を増強することが明らかとなった。

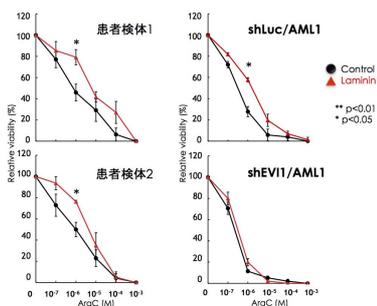


図 EVI1 の発現と抗癌剤耐性との関連

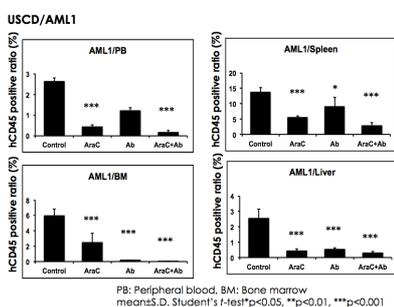


図 マウスにおける抗体療法の予備的検討

マウス骨髄におけるラミニンと ITGA6/B4 の局在の検討

白血病幹細胞と ITGA6/B4 依存性接着との関連性を明らかにすることを目的として、白血病細胞移植後のマウス骨髄において局在を確認した。

コントロール群では、ITGA6/B4 抗体で染色される細胞はほとんど認められなかったが、白血病細胞移植群では明らかに陽性である細胞の存在が認められた(図)。また、それらの細胞はラミニン陽性細胞の近傍に認められたため、*in vivo* においてラミニン-ITGA6/B4 接着が存在することが確認された。

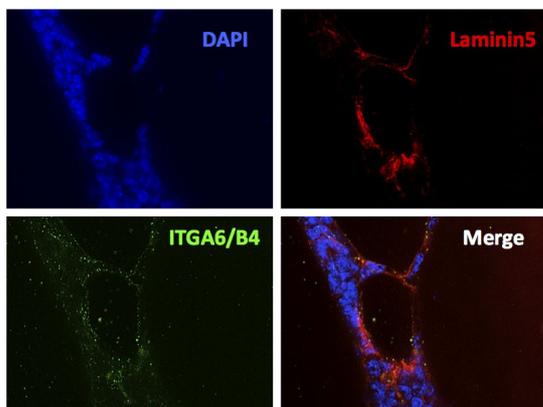


図 モデルマウス骨髄における免疫染色

研究期間内に完了できなかった計画があるものの、概ね予定通り進行することが出来た。また、本研究では、ITGA6/B4 に依存した白血病幹細胞の骨髄ニッチでの細胞維持に関わる分子機構の一端が明らかとなり、ITGA6/B4 を標的とした新規抗体療法が効果的であるという知見を得ることが出来た。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Kaneda-Nakashima K, Suekane A, Kurosawa J, Sudou Y, Furuya A, Morishita K. Improvement therapeutic efficacy by neutralizing antibody of integrinA6/B4 for EVI1<sup>high</sup> AML. 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 (金) - 11 月 2 日 (日) 大阪国際会議場
- (2) Suekane A, Kaneda K, Nawin M, Morishita K. Isolation and characterization of the responsive gene(s) of monosomy 7 with EVI1<sup>high</sup> acute myeloid leukemia. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 (木) - 27 日 (土) パシフィコ横浜
- (3) Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Kurosawa J, Morishita K. Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 2013 年 10 月 3 日 (木)・4 日 (金)・5 日 (土) 第 72 回日本癌学会学術集会 パシフィコ横浜
- (4) Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K. Survival and drug resistance of LSCs Cell by integrin alpha 6 in EVI1<sup>high</sup> AML. 2013 年 10 月 11 日 (金)・12 日 (土)・13 日 (日) 第 75 回日本血液学会学術集会 ロイトン札幌
- (5) Kaneda K, Morishita K. Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. 2013 年 5 月 17 日 (金)・18 日 (土) 第 11 回幹細胞研究会 東京大学伊藤国際学術研究センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称:「ヒトインテグリン A6B4 と特異的に反応する抗体」

発明者:見供克之、甲田克志、黒澤仁、兼田加珠子、森下和広、黒澤良和

権利者：(株)ペルセウスプロテオミクス、  
宮崎大学、藤田保健衛生大学  
種類：特願  
番号：2013-18703  
出願年月日：2013年9月5日  
国内外の別：国際

取得状況(計0件)

〔その他〕  
特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

兼田 加珠子 (KANEDA, Kazuko)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教  
(常勤)  
研究者番号：00533209