

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890022

研究課題名(和文)線維素溶解系を標的とした新しい白血病治療法の確立

研究課題名(英文)Establishment of new method for leukemia therapy by targeting fibrinolytic pathway

研究代表者

アブドゥル アジズ (ABD, Aziz)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：50738789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：外来性PAI-1は、骨髄ニッチからSDF-1a、G-CSFやTGF- β 等のケモカイン産生を制御する。一方、内在性PAI-1はHSC自身のFurin活性とMT1-MMP活性の両方を負に制御し、HSCの運動性を抑制している。内在性PAI-1は定常状態におけるTGF- β によるHSCの運動性の制御に重要な役割を果たしていることを明確にした。また、白血病細胞において、PAI-1の抑制がMT1-MMP発現を亢進し、抗がん剤に対する感受性が亢進することからMT1-MMPが重要な役割を果たしていることが明確にした。これらの結果から内在性PAI-1活性の抑制がLSCの運動性を制御することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Extracellular Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1) regulates production of chemokines such as SDF-1a, G-CSF and TGF- β in bone marrow niche. On the other hand, intracellular PAI-1 in hematopoietic stem cell (HSC) down-regulates both Furin activity and MT1-MMP expression and regulates HSC motility. Intracellular PAI-1 plays an important role in HSC motility through TGF- β signal pathway. In addition, inhibition of PAI-1 in leukemic cell, enhances motility of leukemic stem cell (LSC) by increase MT1-MMP expression, and finally induces sensitivity of anti-leukemia therapy. Our findings revealed that intracellular PAI-1 maintains resistivity of LSC in the niche. Inhibition of PAI-1 with anti-leukemic agent is new therapy strategy that targeting LSC.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 がん幹細胞 白血病 線維素溶解系 分子標的薬 完全寛解

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞はその周辺微小環境を構成するニッチ細胞と相互作用することにより、細胞周期が静止期に留まることによって維持されている。抗がん剤は細胞周期依存的に殺作用を示すものであるため、休止期がん幹細胞は治療抵抗性となり残存する。このことが、がんが再発する根本的な原因となる。したがって、がんの根治を達成するためには、がん幹細胞をニッチから離脱させ、静止期から増殖期に誘導させる方法の確立が重要である。近年、造血微小環境における線維素溶解系（線溶系）の重要性が注目されている。骨髄内で組織型プラスミノゲンアクチベーター（tPA）が活性化されると、活性型 tPA がメタロプロテアーゼ（MMP）を活性化する。MMP は幹細胞とニッチ細胞をつなぎ合わせているアンカー分子群を切断するため、幹細胞はニッチから離脱し、静止期から増殖期に入る。したがって、がんの化学療法において、tPA を効率よく誘導する薬剤を開発し併用することが、休止期がん幹細胞を標的としたより効果的な治療戦略となることが期待される。Plasminogen Activator Inhibitor type-1（PAI-1）は tPA 活性を負に制御する分子である。宮田ら（東北大学）は、PAI-1 の活性部位に特異的に結合し、その酵素活性を阻害する新規分子標的薬を開発した。申請者は、骨髄移植後の個体にこの PAI-1 阻害剤を投与することにより、tPA 主導の線溶系が活性化され、静止期造血幹細胞（HSC）をニッチから離脱させ、増殖期に効率よく誘導することによって骨髄再生反応を促進させることに成功した。

慢性骨髄性白血病（CML）は、HSC を発症起源とする典型的な幹細胞性疾患であり、細胞周期制御やニッチとの相互作用など正常 HSC と共通する性状を多く有する血液腫瘍である。その発症機序として、HSC の 9 番染色体にあった ABL 遺伝子が転座して 22 番染色体上の BCR 遺伝子と結合することにより BCR-ABL 融合遺伝子が形成されチロシンキナーゼが常に活性化された状態になり、異常な増殖シグナルが亢進するため CML 細胞となることが明らかとなっている。近年開発されたイマチニブはこの BCR-ABL 融合遺伝子産物を標的とした分子標的薬であり、CML のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害し著明な治療効果を発揮する。しかし、盛んに増殖する CML 細胞の中の一部に、ニッチ細胞と相互作用し休止期に留まる CML 幹細胞が存在し、治療抵抗性を示すことから寛解期にまで治療に成功した例であっても再発を引き起こすことが明らかとなった。イマチニブは BCR-ABL 融合遺伝子を有する CML 細胞に特異的に殺細胞作用を示す抗がん剤である。したがって、『線溶系の制御による休止期幹細胞の増殖期誘導効果』をがん幹細胞に応用することが可能となれば、がん幹細胞の完全な排除が実現することが期待される。

2. 研究の目的

我々は、PAI-1 が造血抑制因子であり、新規に開発した PAI-1 阻害剤により移植後の造血回復が促進することを明らかにし、臨床試験を実施する

に至った。さらに、がん特異的な分子標的薬に PAI-1 阻害剤を併用すると、著しい抗腫瘍効果を発揮することを見いだした。がんの根治（完全寛解）にはがん幹細胞を標的とした治療法の開発が重要である。そこで本研究は、がん幹細胞とその周辺ニッチ細胞に着目して PAI-1 分子の役割を解明することにより PAI-1 阻害剤の抗腫瘍作用の機序を明確にし、PAI-1 阻害剤のがん治療への適応拡大を目指すことを目的とした。がん特異的な分子標的薬と PAI-1 阻害剤の併用治療法が確立されれば、がん幹細胞の完全な排除だけでなく、造血系の効率良い再生の両方を同時に達成する理想的な治療手段となることが期待される。

HSC や白血病幹細胞（LSC）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。これまで我々は、HSC は移植による再生反応によってストレスを受け、幹細胞活性が低下してしまうことを明らかにした。このことは、生着不全や白血病再発の原因となるため、移植医療の大きな障害の一つとなっている。そこで、幹細胞活性の低下を改善するために、線溶系に着目した研究を行い、PAI-1 が HSC の抑制因子であることを見いだした。さらに、PAI-1 活性を阻害することにより造血再生が促進され、幹細胞活性が維持されるという理想的な移植法を提示することに成功した。この成果をもとに、PAI-1 阻害剤の効果を検討するための第一相試験が終了し、現在第二相試験が進行中である。

我々は、以上の研究の過程で以下に挙げる 2 つの興味深い実験事実を得た。（1）PAI-1 分子は、移植した HSC が造血の場である骨髄に辿り着くこと（ホーミング）や、必要に応じて HSC が骨髄から末梢循環血中に動員されること（動員）を制御している。（2）白血病モデルマウスに抗がん剤とともに PAI-1 阻害剤を併用すると、白血病細胞の抗がん剤への感受性を高め、生存率を著明に改善する。

いずれの知見も HSC や LSC の制御法の確立を目指す上で重要な課題であるが、これらの詳細な機構は不明なままである。そこで、本研究では、上記した 2 つの課題について PAI-1 分子の造血系における役割に焦点を当て、その制御機構の解明に取り組むことにより、HSC 移植法のさらなる効率化と白血病根治療法の確立を目指すことを目的とした。我々は、BCR-ABL 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞を放射線照射したマウス静脈内に接種することによって CML を発症する動物実験モデルを確立した。そして、CML を発症したマウスにイマチニブと PAI-1 阻害剤を併用投与すると、イマチニブ単独投与群と比較して、より強い抗がん作用を発揮し、高い生存率をしめすことを明らかにした。そこで本研は、線溶系の制御による抗がん作用増強のメカニズムを明確にし、がん幹細胞を標的とした新しい治療コンセプトの確立を目指した。

3. 研究の方法

マウスおよびヒト白血病モデルマウスを利用した解析を行った。マウスの場合、HSC に BCR-ABL 遺伝子を導入後、野生型あるいは遺伝子欠損マウ

スへの移植により作製した。そして、(1) フローサイトメトリーや組織学的な解析による PAI-1 阻害剤投与のがん幹細胞の細胞周期におよぼす影響の解析、(2) 培養系での PAI-1 分子による細胞周期、薬剤耐性制御の解析、(3) ELISA 法や阻害抗体を用いた PAI-1 阻害剤投与によって誘導されるがん幹細胞の増殖を促すサイトカインの同定、(4) PAI-1 や tPA 遺伝子欠損マウスを利用した線溶系によるがん幹細胞制御機構の解明、(5) ヒト白血病モデルマウスにおける治療効果の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 線溶系による造血幹細胞 (HSC) の運動性制御機構の解明

HSC の homing と動員は造血系の恒常性を維持するために備わっている重要な機構である。骨髓内の HSC は定期的に末梢血中に動員し、別の骨髓へと homing することによって出血や感染で変動した造血系のバランスを一定に保つと考えられている。HSC 移植はまさにこの homing を利用した医療である。さらに、ドナーにサイトカインを投与することによって動員した HSC を利用した移植医療も施行されている。しかし、このホーミングと動員のメカニズムについては不明な点が多い。我々は、tPA の抑制因子である PAI-1 活性を阻害すると、HSC のホーミングと動員が亢進することを見いだした (図 1 と図 2)。そこで本研究では、PAI-1 分子に着目し、ホーミングと動員における線溶系の役割を明確にすることを目標とした。PAI-1 阻害剤は、未照射の場合は G-CSF の発現と動員を亢進させ、放射線照射の場合は SDF-1 の発現とホーミングを亢進させた。しかし、それぞれの阻害抗体を用いたところ、PAI-1 阻害剤による動員とホーミングの誘導活性は完全には阻害されなかったことから、ニッチが産生する PAI-1 が他の因子の発現を調節していることを示唆した。内在性 PAI-1 の制御機構を解明するために、wild type (WT) と PAI-1 遺伝子を欠損したマウス (PAI-1 KO) のドナーとレシピエント入れ替え移植を行った。その結果、PAI-1 KO の HSC は、ホーミングが亢進した。面白いことに、レシピエント環境中の PAI-1 発現に関係なく、PAI-1 KO の HSC のホーミングは高いままに維持されることが得られた (図 2)。

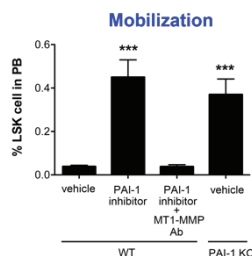


図1

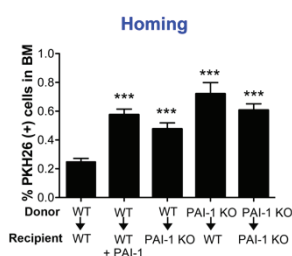


図2

フローサイトメーターを用いた解析において、PAI-1 KO の HSC では細胞表面酵素である MT1-MMP の発現が亢進していることを見いだした (図 3)。さらに HSC の運動性における MT1-MMP 役割を調べるために、MT1-MMP 中和抗体を使用し、阻害実験を行った。その結果、MT1-MMP を阻害すると、PAI-1 KO の HSC において、亢進した HSC の動員、細胞の

遊走と homing が抑制されたことから、MT1-MMP が HSC の運動性に重要な役割を示すことを明らかにした (図 4)。

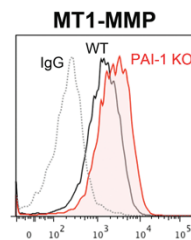


図3

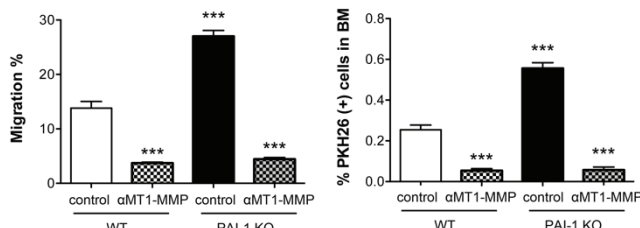


図4

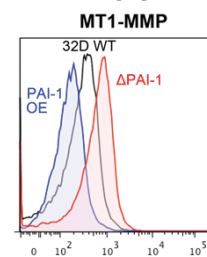


図5

また、PAI-1 を過剰発現 (PAI-1 OE) あるいは発現抑制 (Δ PAI-1) した 32D 細胞株において、MT1-MMP の発現を解析すると、PAI-1 過剰発現細胞には MT1-MMP 発現を抑制し、PAI-1 発現抑制細胞では MT1-MMP 発現が亢進することを確認できた (図 5)。これらの結果から内在性 PAI-1 は MT1-MMP の発現を抑制することを明確にした。そして、PAI-1 KO の HSC において、細胞内のタンパク質転換酵素である Furin の発現が亢進していることを見いだした (図 6)。PAI-1 過剰発現細胞株には Furin 発現を抑制し、PAI-1 発現抑制細胞株では Furin 発現が亢進することが確認され、PAI-1 と Furin 発現抑制 (Δ PAI-1 Δ Furin) の細胞株では誘導した MT1-MMP の発現が抑制される結果ことが得られた (図 7)。

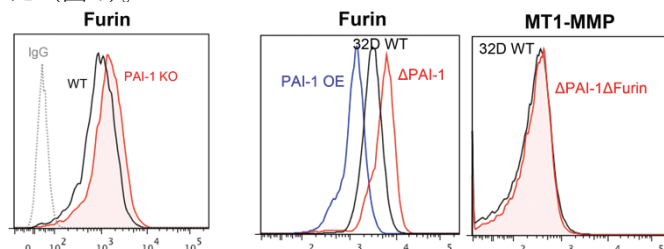
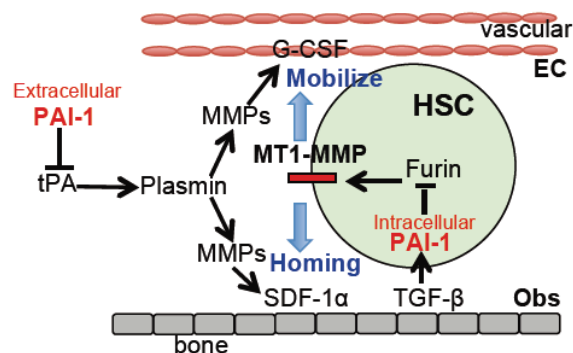


図6

図7

これらの結果から、外来性 PAI-1 は、ニッチからのケモカイン産生を制御する。一方、内在性 PAI-1 は HSC 自身の Furin 活性と MT1-MMP 活性の両方を負に制御し、HSC の運動性を抑制している。内在性 PAI-1 は定常状態における TGF- β による HSC の静止期の維持と運動性の制御に重要な役割

を果たしている (下図)。



(2) 線溶系の活性化による白血病幹細胞 (LSC) を標的とした新しい治療法の確立

LSC は、細胞周期が静止期に留まることによって維持されている。抗がん剤は細胞周期依存的に細胞死を誘導するものであるため、休止期 LSC は治療抵抗性となり残存する。このことが、がんが再発する根本的な原因となる。したがって、がんの根治を達成するためには、がん幹細胞をニッチから離脱させ、静止期から増殖期に誘導させる方法の確立が重要である。骨髄内で tPA が活性化されると、引き続き MMP が活性化され、幹細胞とニッチ細胞をつなぎ合わせているアンカー分子群を切断するため、幹細胞はニッチから離脱し、静止期から増殖期に入る。したがって、tPA を効率よく誘導する薬剤を開発し併用することが、休止期がん幹細胞を標的としたより効果的な治療戦略となることが期待される。本研究は、PAI-1 阻害剤と抗がん剤 (イマチニブ) を併用することにより、骨髄内に残存する白血病細胞 32Dp210 が減少し、白血病に対する生存率を著明に改善することを見いだした。一方、PAI-1 過剰発現した 32Dp210 PAI-1 OE は抗がん剤に対する抵抗性を示すものの、PAI-1 阻害剤と併用することによって残存する白血病細胞が画的に低下し、生存率を改善することが得られた (図 9 と図 10)。

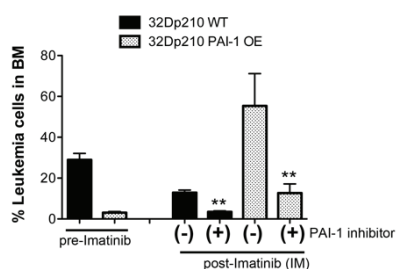


図9

さらに、(1)から得られた知見により、HSC の運動性に深く関わる MT1-MMP を中和抗体で阻害し、白血病細胞の抗がん剤に対する抵抗性が亢進することから MT1-MMP が重要な役割を果たしていることが明確にした (図 11)。これらの結果から PAI-1 の発現抑制は MT1-MMP 発現亢進を介して、白血病細胞のニッチからの離脱を促進し、抗がん剤に対する抵抗性を減弱することを明らかにした。

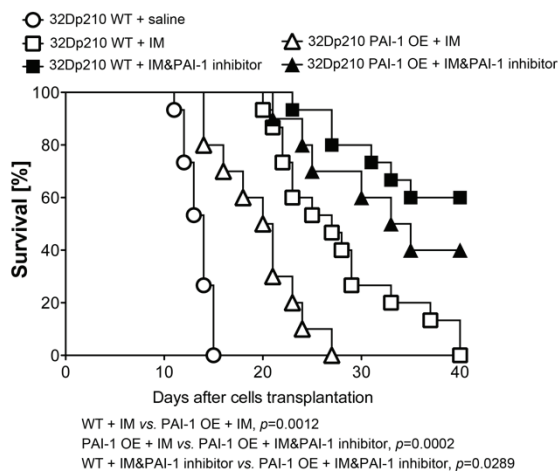


図10

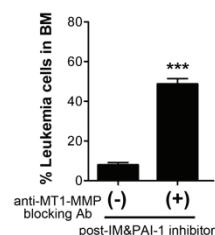


図11

本研究は、治療抵抗性休止がん幹細胞を標的とする新しいコンセプトに基づくがん根治療法の確立に寄与するものである。使用する PAI-1 阻害剤は今年度から HSC 移植患者を対象とした臨床試験を開始した新規薬剤である。したがって、本剤が抗がん作用も発揮することが認められれば速やかな臨床応用が実現する可能性が高く、その医療に与えるインパクトは大きいものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① Abd Aziz Ibrahim, Takashi Yahata, Miyata Toshio, Ando Kiyoshi, Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells*, 査読あり、Vol.32, 2004, 946-958, (ISI impact factor: 7.7).

[学会発表] (計1件)

① アブドゥル アジズ、PAI-1 分子は造血細胞のホーミングを制御している、第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16日、ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

アブドゥル アジズ (ABD, Aziz)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号: 50738789