

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14635

研究課題名(和文) Notch活性化型悪性腫瘍を標的とした新規分子標的薬の開発

研究課題名(英文) The exploration of new drug for the treatment of Notch-active tumor cells.

研究代表者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Notch1遺伝子変異によるNotchシグナルの過剰発生は、ヒトT細胞急性リンパ性白血病(T-ALL)の50%に認められる等、ヒト腫瘍発生との関連が指摘されている。しかし、Notchシグナル阻害剤は様々な副作用を有し、抗腫瘍薬としての使用が困難である。我々は、造血未分化細胞に発現するLmo2がNotchシグナル応答性に重要であり、その発現低下は、Notchシグナルによる速やかな細胞死を誘導することを見出した。また、独自に樹立したマウスETP-ALL細胞を用いて、Lmo2の発現抑制による増殖抑制効果を確認し、Lmo2が新たな抗腫瘍薬の標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It was known that more than 50% of human T-ALL have activating mutations that generate constitutive active form of NOTCH1. However, the gamma-secretase inhibitors (restrain the proteolysis of Notch receptor) have never been widely administrated because of their toxicity. We show that Lmo2, frequently expressed in hematopoietic stem cells and a high-risk subtype of T-ALL with stem cell-like features (ETP-ALL), contributes to the maintenance of their differentiation potential toward T cell lineage and its repression induces their cell death with Notch signaling. Lmo2 is adaptor protein in transcriptional complex and preserve cell viability via Bcl11a and Bcl2. Moreover, the reduction of Lmo2 in originally established murine ETP-ALL-like cells also leads growth arrest. These results raise the possibility that Lmo2 is a potent target of newly identified drug for ETP-ALL.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：Notch 血液腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは、胸腺での T 細胞分化決定やその後の分化・増殖に必須である。また *Notch1* 遺伝子変異による Notch シグナルの過剰発現は、ヒト T 細胞急性リンパ性白血病 (T-ALL) の 50% に認められる等、腫瘍発生との関連が指摘されている。しかし、Notch1 活性化変異による恒常的な Notch シグナルとは別に、生体内環境における Notch シグナルの腫瘍増殖における役割についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、生体内での細胞増殖における Notch シグナルの役割を様々な視点から再検討し、腫瘍細胞の増殖を抑制するために Notch シグナルをどのように制御あるいは利用することが可能か検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未分化造血細胞における Lmo2 の役割解析

Ebf1 欠損マウス胎仔肝細胞より造血未分化細胞 (Lin. (-) c-kit (+) 画分) を分離し、SCF、IL7 存在下にストローマ細胞上にて培養することで、pro-B 細胞株を得た。ストローマ細胞を選択することにより、Notch シグナル依存的 T 細胞分化能を有する pro-B (+) 細胞および分化能を有さない pro-B (-) 細胞をそれぞれ樹立した。両細胞より mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析から、発現量の異なる遺伝子を網羅的に探索した。遺伝子発現量は Real-time RT-PCR にて定量した。*Lmo2*、*Meis1* 遺伝子は、それぞれレトロウイルスベクター (MIGR1) を用いて pro-B (-) 細胞に導入した。マウス胎仔胸腺細胞由来 ETP-ALL 様細胞株は、胎齢 15 日目マウス胸腺細胞に c-Myc、活性化 Akt 遺伝子を強制発現させ、樹立した (AMT 細胞)。*Lmo2* shRNA は独自に合成し、造血未分化細胞に導入した。T 細胞分化抑制能を指標に適宜選択した。それを AMT 細胞に導入し、増殖への影響を調べた。

(2) 多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma, MM) のボルテゾミブ耐性を促す腫瘍ニッチ分子としての Notch リガンド: *Jagged1* の役割

多発性骨髄腫 (MM) 細胞株として主に U266 細胞を用いた (同細胞は Notch2 を発現するが、Notch リガンドは発現しない)。Notch および Notch リガンドの発現は Western blotting により調べた。可溶性ヒト *Jagged1*-hIgG キメラタンパク質は R&D 社より購入した。プロテオソーム阻害剤: Bortezomib (BTZ、ヤンセンファーマ)、抗癌剤: メルファラン、サリドマイド (Sigma-Aldrich)、gamma-secretase 阻害剤 (GSI XII、Calbiochem)、PKC 阻害剤: Go6976 (Cell Signaling Tech) をそれぞれ購入し使用した。In vivo 効果の検証は、MM 細胞を NOD-scid/gc KO (NOG) マウスあるいは hJag1 発現 NOG マウスに移植し、行った。

4. 研究成果

(1) 未分化造血細胞における Lmo2 の役割解析

我々は、Notch シグナルによる T 細胞分化誘導の詳細を調べる過程で、Notch 依存的に T 細胞系列へ分化可能な造血未分化細胞株 (pro-B (+)) と分化能を保持しない細胞株 (pro-B (-)) を樹立し、両者の遺伝子発現比較とそこで差異のあった遺伝子の pro-B (-) 細胞への強制発現による分化能の回復を指標とした解析から、*Lmo2* が未分化能維持に重要な役割を果たすことを見出した。一方で *Lmo2* は、造血幹細胞で高く発現することが知られ、また、ヒト T-ALL の中でも薬剤抵抗性を示し予後不良群として知られる ETP-ALL に顕著に発現することから、腫瘍細胞の「未分化性」との関連から注目されている。また、*Lmo2* 低発現 pro-B (-) 細胞では、増殖能の低下と Notch シグナル依存的な細胞死を認めたことから、*Lmo2* が ETP-ALL などの未分化型造血腫瘍に対する新たな抗腫瘍薬の標的となる可能性を着想するに至った。

そこで、両 pro-B 細胞 (pro-B (+)、白、図 1; pro-B (-)、黒) に加えて、*Lmo2* を過剰発現し T 細胞分化能を回復した *Lmo2*/pro-B (-) 細胞 (赤)、両 pro-B 細胞間で発現に顕著な差がある *Meis1* 導入 pro-B (-) 細胞 (*Meis1*/pro-B (-)、T 細胞分化能は保持しない、緑) より発現遺伝子を抽出し、赤と白で発現が高く、逆に緑と黒で低い遺伝子を探索した (図 1)。その結果、*Bcl11a* 遺伝子が、*Lmo2* 下流遺伝子候補として見出された。*Bcl11a* の発現低下は、欠損マウスの解析から、未分化 B 細胞期での細胞生存率の低下を招くこと、*Bcl2* の過剰発現により生存率が回復することが報告されている。そこで、*Bcl2* を pro-B (-) 細胞にて過剰発現させたと、Notch シグナル依存的な細胞死の誘導が抑制された。この結果から、造血未分化期での *Lmo2* の発現低下は、*Bcl11a* 発現を減少させ、Notch シグナルによる分化誘導時での細胞生存が保証されず、細胞死が誘導されることが示唆された。一方、*Lmo2* の標的分子と考えられる *Bcl2a1* にも同様の機能が期待されたが、*Bcl2a1* によっては Notch シグナル誘導性の細胞死は抑制されなかった。現在、両分子間の相違について、両分子のキメラを作製し調べており、Notch シグナルによる細胞死誘導機構の解明が期待される。

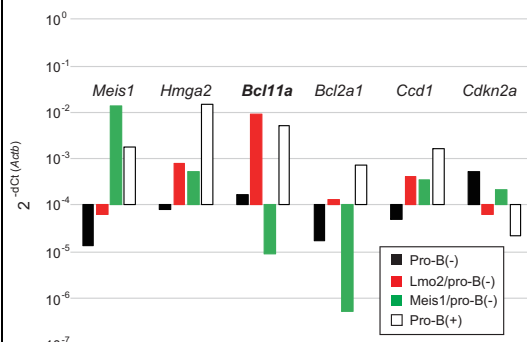


図 1 Pro-B 細胞における遺伝子発現

次に、Lmo2 の機能を抑制することが報告された PA207 ペプチド (Cacer Res 69:4784, 2009) を pro-B(+) 細胞にて発現させ、pro-B(-) 細胞様の Lmo2 低下形質の有無を調べたが、まったく認められなかった。よって、本実験系 (リンパ系前駆細胞) においては、PA207 は Lmo2 の機能を阻害できないことが示された。このことから、当初、同ペプチドの立体構造を模した小分子化合物をシミュレートすることでスクリーニング予定であった Lmo2 機能阻害剤の探索戦略は練り直しを余儀なくされた。

そこで、未分化造血細胞期において Lmo2 の機能低下を誘導し、Lmo2 の機能を調べるための shRNA のデザインに着手した。様々な Web サイトを利用して作成した shRNA は、造血未分化細胞への導入により、T 細胞および B 細胞への分化を抑制し、shRNA による一定の発現抑制効果が認められた。そこで、我々が独自に樹立したマウス ETP-ALL 様細胞株: AMT (DN1 性状を保持し、Lmo2 を発現) にて shRNA を発現させたところ、顕著な増殖抑制効果を示した。現在、同細胞における Notch シグナル発動の影響についてさらに検証している。Lmo2 発現低下に伴い、Notch に応答して細胞生存率が低下する可能性が高いと考えられる。

以上の結果より、Lmo2 は、ヒト ETP-ALL 治療のための新たな標的分子となる可能性が考えられた。

(2) 多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma, MM) のボルテゾミブ耐性を促す腫瘍ニッチ分子としての Notch リガンド: Jagged1 の役割

多発性骨髄腫 (MM) は、形質細胞の異常増殖を示す難治性の血液腫瘍であり、いまだに治療法は確立されていない。近年開発されたプロテアソーム阻害剤: ボルテゾミブ (BTZ) により、ようやくその治療が可能になりつつあるが、依然として治療抵抗性の MM が一定頻度存在し、その予後は不良である。MM の治療抵抗性は、細胞自身の性状に加えて、腫瘍ニッチと呼ばれる環境要因の存在が指摘されている。すなわち、環境から付与される刺激によって、MM が性状を変化させ、抗癌剤治療抵抗性を獲得する可能性が推察される。最近、その一部として、骨髄環境にて Notch シグナルが発生し、MM の増殖性や挙動に影響を与えることが示され、MM の治療抵抗性との関連が想定された。

そこで我々は、ヒト MM 細胞における Notch 分子の発現を詳細に調べ、Notch リガンド存在下での MM 細胞への挙動の変化について確認した。また、我々が独自に作製したヒト NotchL 発現 NOG マウスを用いて、Notch シグナル誘導環境における MM の振る舞いを、in vivo モデルにて検討した。さらに、BTZ 存在下での MM 細胞の治療抵抗性について精査した。

その結果、10 種類のヒト MM 細胞株すべてにおいて、Notch1 あるいは Notch2 (または両者) の顕著な発現を認めた。しかし、いずれの細胞についても、Jag1 を介して誘導される

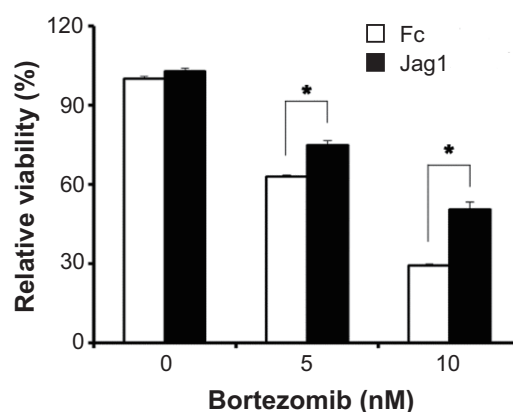


図2 U266 細胞に対する Bortezomib 誘導細胞死を Jag1 由来 Notch シグナルが抑制する

Notch シグナルがその細胞増殖に、in vitro、in vivo いずれについても影響しなかった。一方、Jag1 誘導 Notch シグナルの存在は、BTZ 処理による細胞死を in vitro にて抑制することを見出した (図2)。これは BTZ 処置に特徴的な効果であり、他の抗癌剤処置 (サリドマイド、メルファラン) に対しては認められなかった。同様の効果は、in vivo での Jag1 発現 NOG マウスへの MM 細胞移植と BTZ 処置による in vivo の実験系でも示された。さらに、Notch シグナル発生を抑制する gamma-secretase 阻害剤を BTZ と併用することにより、BTZ 耐性能獲得が抑制され、相乗効果が発揮されることが示された。また、Jag1 を介した Notch シグナルが、BTZ 処理によって抑制される MARCKS を、PKC を介して誘導し、腫瘍細胞の生存維持に寄与する可能性を示唆した。

以上の結果は、MM 治療に際し大きな問題となる BTZ 耐性が、腫瘍環境要因としての Jag1 を介して誘導される Notch シグナルによってもたらされることを、初めて明確にした。

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 1 件)

(1) Muguruma Y, Yahata T, Warita T, Hozumi K, Nakamura Y, Suzuki R, Ito M and Ando K. Jagged1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells. Blood Cancer J. 7:650-654, 2017. (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Hozumi K, Ochiai S and Hirano K. Molecular machinery for the maintenance of differentiation potential toward T/B cell lineages in hematopoietic stem/progenitor cells by Lmo2. 日本免疫学会・学術集会. 2017 (仙台)

(2) Hozumi K, Ochiai S and Hirano K. Essential role of Lmo2 for the

maintenance of T-cell differentiation potential in Ebf1-deficient pro-B cells. 日本免疫学会・学術集会. 2016 (沖縄)
(3)Muguruma Y, Warita T, Yahata T, Itoh M, Hozumi K and Ando K. Jagged1-Notch interaction in the niche is responsible for acquisition of drug-resistance. 日本血液学会. 2016, パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

(1)Hozumi K, Springer, Notch signaling: Immunity and Cancer., 2017, P.3-P.20.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

穂積 勝人 (HOZUMI, Katsuto)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：30246079

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

(3) 連携研究者

平山 令明 (HIRAYAMA, Noriaki)
東海大学・先進生命科学研究所・教授
研究者番号：70238393