

令和元年6月19日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19681

研究課題名(和文)ドナー細胞由来白血病発症機構への細胞外小胞の関与の検討

研究課題名(英文)Elucidation of the roles of extracellular microvesicles in donor cell-derived leukemia

研究代表者

向田 直史(Mukaida, Naofumi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30182067

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): BCR-ABL陽性慢性骨髄性白血病(CML)マウスに対して、X線照射・骨髄移植を行うと、核型異常を示すドナー細胞由来顆粒球の出現と重篤な貧血からなる骨髄異形成症候群を呈する、ドナー細胞由来白血病(DCL)を発症した。レシピエントCML細胞由来の細胞外小胞中の大量の二本鎖DNAが、ドナー細胞に水平伝播し、ドナー細胞内でSTING経路を介してインターフェロン経路が活性化され、ドナー由来の造血幹/前駆細胞の*in vitro*での複製能が低下することが明らかになった。さらに、CML発症マウスに対して、X線照射後に、STING欠損マウス由来の骨髄細胞を移植しても、DCL様の病態の出現が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、CML細胞由来の細胞外小胞がSTING経路を介して、ドナー由来の骨髄幹細胞に対して抑制的に作用することによって、DCLが発症する可能性が強く示唆された。したがって、STING経路の抑制によって、治療法が確立されておらず、予後が不良なDCLの発症を予防できる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文): Mice with BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia (CML) developed donor cell-derived leukemia (DCL), myelodysplastic syndrome with donor cell-derived granulocytes with aberrant nuclear morphology and severe anemia, when normal donor cells were transplanted after irradiation. Recipient leukemia cell-derived extravesicles abundantly contain double-stranded DNA (dsDNA), which was horizontally transmitted into donor cells. *In vitro* studies demonstrated that dsDNA activated STING and subsequently interferon pathways in donor cells, thereby inhibiting replication capacity of donor hematopoietic stem/progenitor cells. Moreover, CML mice did not develop DCL when they received STING-deficient mouse-derived bone marrow cells after irradiation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 細胞外小胞 ドナー細胞由来白血病 STING 骨髄移植 BCR-ABL 慢性骨髄性白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (CML) は、9番・22番染色体間での転座により生じた、チロシン・キナーゼ活性を示すBCR-ABL遺伝子産物が、ドライバー遺伝子として正常造血幹細胞 (HSC) に作用し、白血病幹細胞 (LIC) へと悪性転化させることで発症する。このことを利用して、ドライバー遺伝子であるBCR-ABLを標的として開発されたチロシン・キナーゼ阻害薬 (TKI) は、CML患者の生命予後を劇的に改善した。その一方で、LICがTKIに対して比較的抵抗性のため、長期のTKI治療後も骨髄内にLICが残存する症例が半数近くある。このため、骨髄移植療法がCMLの根治療法として再び脚光を浴びつつある (Nature Rev Clin Oncol 2016 13:79-91)。

骨髄移植の前処置であるX線照射後に残存するLICから起きる白血病の再発に対しては、マイナー組織適合抗原の不一致によるGraft versus Leukemia (GVL) 反応による再発予防策がすでに临床上広く用いられている。一方で、このような再発機構とは別個に、移植した正常細胞からの白血病、いわゆるドナー細胞由来白血病 (donor cell-derived leukemia; DCL) の発症が、骨髄移植患者の約1%で認められる。ただし、骨髄移植後に再発する白血病細胞の起源の同定が技術的に困難なことが多いことから、実際の頻度は現在の報告よりも高い可能性がある。しかも、DCLは通常の再発白血病に比べて悪性度が高いことから、临床上大きな問題となりつつある (Bone Marrow Transplantation 2014 49:102-109)。しかし、DCLには適切な動物モデルがないことなどから、このDCLの発症機構は不明な点が多い。

本研究申請時に、申請者のグループでは、骨髄移植治療後における、骨髄内での残存LICとドナー由来正常造血幹/前駆細胞 (HSPC) との相互作用の検討を目的に、BCR-ABL遺伝子を導入したLICを移植しCMLを発症させたマウスにX線照射・骨髄移植を行った。その結果、比較的早期のCMLに骨髄移植すると、骨髄内LICが十分に減少し、正常なドナー由来細胞に置き換わる上に、長期的にその状態が維持されることが明らかとなった。一方で、一部のマウスでは、骨髄・末梢血とともにレシピエント由来の白血病細胞は著減していたにもかかわらず、ドナー由来細胞がBCR-ABL遺伝子を発現するとともに、核型異常を示すドナー由来白血球の増加と重度の貧血を呈する、DCLに類似した病態が認められた。

これらの研究成果を受けて、今回認められた病態のDCLの疾患モデルとしての妥当性を検証するとともに、その発症の分子・細胞機構を解明することで、有効な治療法が確立されていないDCLに対する治療法の確立を目指して、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、DCLの予防を通じた、より安全で効果的な骨髄移植療法の新規戦略の確立を目指し、以下の検討を行った。

上述の現象を解析し、DCLの疾患モデルとしての妥当性の実証

上述の現象の分子・細胞機構の解析

3. 研究の方法

以下の点について検討を加えた。

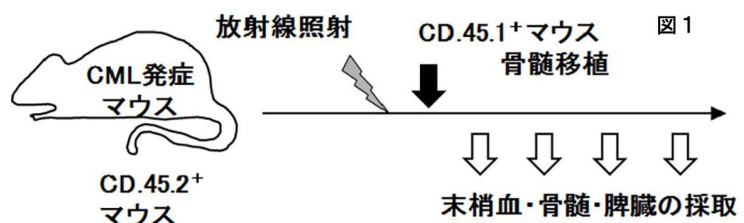
DCLの疾患モデルとしての妥当性の実証

DCL疾患モデルを用いた発症メカニズムの解明

DCLの疾患モデルとしての妥当性の検証

ア.CMLマウスモデルに対する骨髄移植治療後の血液病理学的解析

CD45.2陽性のBALB/cマウスの骨髄から分離したlineage marker c-kit⁺Sca-1⁺の正常造血幹/前駆細胞 (HSPC) に、ヒトBCR-ABL-ires-GFP遺伝子を導入し、白血病幹細胞 (LIC) を作製した。得られたLICを、X線照射したレシピエントマウスに骨髄移植し、CMLを発症させる。CML発症後 (LIC移植2週間前後) にX線照射し、CD45.1陽性のコンジェニックマウスから採取した骨髄単核球を骨髄移植した (図1)。



骨髄移植療法による治療効果、白血病の再発の有無を検討するために、以下の点について、経時的に評価し、DCLのマウス疾患モデルとしての妥当性を検証した。

- a. 末梢血白血球数
- b. 脾臓の大きさ
フローサイトメトリー法を用いて以下の点も経時的に測定する
- c. 骨髄内の LIC 数
- d. 末梢血・脾臓・骨髄での CD45.1+ドナー血液細胞と CD45.2+GFP 陽性残存白血病細胞の実数と割合
- e. 末梢血・脾臓・骨髄での、CD45.1+ドナー細胞中の BCR-ABL 発現細胞の割合

DCL 実験モデルを用いた発症メカニズムの解明と細胞外小胞の関与の検討

これまでの解析から、CMLマウスの脾臓から採取したエクソソームにおいて、白血病細胞由来 DNA断片が高レベルで検出されている。したがって、主にエクソソームを用いて、in vitroにおいて、正常マウスの骨髄から分離精製したHSPCと共培養することで、白血病細胞由来遺伝子の水平伝播、および造血能に与える影響を以下の点に着目し検討した。

- a. BCR-ABL遺伝子の水平伝播：エクソソームとHSPCを共培養し、BCR-ABL遺伝子を含むエクソソームを取り込むことで、HSPCがBCR-ABL (GFP) を新たに発現するかを検討した。
- b. 2本鎖DNAの水平伝播：膜透過性があり、DNAを選択的にラベルできる蛍光色素 (Vybrant DyeCycle, Thermo Fisher) でエクソソームに含まれるDNAを蛍光ラベルし、共培養することで細胞質内への取り込みを検討した。同時に、細胞質内DNAセンサーシグナルが活性化しているかを、1型IFN関連遺伝子の発現を中心に定量RT-PCR法を用いて解析した。
- c. MDS様形質：エクソソームとHSPCを液体培地で共培養し、HSPCの増殖に対する影響を検討した。さらに、HSPCの造血能に与える影響については、半固形培地を用いて、コロニー形成試験を行い、予備実験で観察されたコロニー形成阻害の再現性を確認した。観察された変化については、DNAセンサー遺伝子を欠損した細胞を用いて同様に検討することで、これらの細胞質内DNAセンサーシグナルの関与について検証した。

4. 研究成果

CML 発症マウスに骨髄移植すると、正常ドナー細胞の生着に伴い、骨髄内 LIC が十分に減少する一方で、長期的には赤血球の顕著な減少を伴う重度の貧血を発症し、生存率が急激に低下することが再現性良く認められた(図 2)。

重度の貧血を呈したマウスでは、MDS で特徴とされる核異型を示す白血球が認められ、ドナー細胞の悪性形質転換による MDS の発症が疑われた。

MDS 様病態を発症したマウスから骨髄細胞を採取し、正常マウスに 2 次移植した結果、一部のマウスは急性赤芽球性白血病を発症した。

MDS が急性白血病の前がん病変であり、MDS 患者では高頻度に急性白血病が発症することを勘案すると、以上の結果から、本モデルは DCL を反映するモデルと考えられた。

さらに、DCL 発症機構の解析を行い、以下の結果も得た。

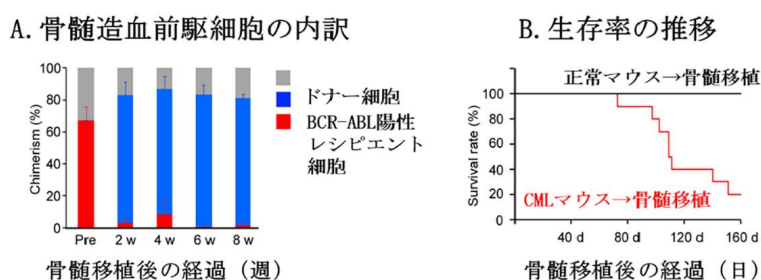


図 2 骨髄移植治療経過

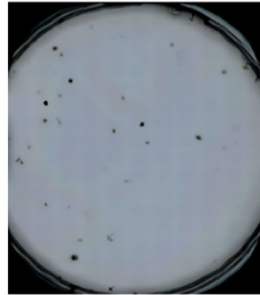
末梢血・脾臓・骨髄において、ドナー細胞が BCR-ABL 遺伝子を新たに発現していた。

CML 発症マウスの脾臓から採取したエクソソームが高レベルに BCR-ABL 遺伝子を含有していた。

正常マウスと比較して、CML マウスの脾臓から採取したエクソソームでは、約 10 倍程度高いレベルで 2 本鎖 DNA 断片が含まれていた。

CML 細胞由来のエクソソームが正常 HSC の細胞質内に取り込まれることを確認するとともに、HSC によるコロニー形成

未処置



CMLエクソソーム処置

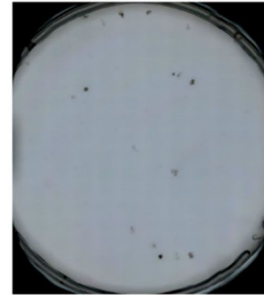


図 3 CMLエクソソームによる、HSCのコロニー形成阻害能

能が顕著に抑制された(図 3)。アレイ解析ならびに qRT-PCR 法の結果から、ドナー細胞において I 型インターフェロン関連遺伝子の発現の亢進が確認された。

細胞質内で 2 本鎖 DNA の認識に関するシグナル伝達分子 STING 欠損マウス由来の HSC では、CML 細胞由来エクソソームによるコロニー形成能の低下は認められなかった。

CML 発症マウスに対して、STING 欠損マウス由来の骨髄細胞を移植すると、野生型マウス由来の骨髄細胞の移植時に比べて、MDS 様病変の発症が遅延した。

以上の結果から、この DCL モデルの発症過程には、白血病細胞由来のエクソソーム中の 2 本鎖 DNA が、ドナー由来の HSPC に取り込まれることで、STING 経路を介して、I 型インターフェロン経路を活性化することによる造血能の低下が関与していることが判明した。したがって、STING 経路を標的とすることで、DCL 発症が予防される可能性が示唆される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Mukaida N, Nosaka T, Nakamoto Y, and Baba T. Lung macrophages: multifunctional regulator cells for metastatic cells (Invited review). *Int J Mol Sci* 2019; 20: 116. doi: 10.3390/ijms20010116. Special issue on “Tumor microenvironment”
2. Sasaki S, Baba T, Muranaka H, Tanabe Y, Takahashi C, Matsugo S, and Mukaida N. Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung. *Mol Cancer Ther* 2018 Jul;17(7):1515-1525. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0845.
3. Mukaida N and Nakamoto Y. Emergence of immunotherapy as a novel way to treat hepatocellular carcinoma (Invited review). *World J Gastroenterol* 2018 May 7, 24 (17): 1839-1858. doi: 10.3748/wjg.v24.i17.1839.
4. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Nishimura T, Imamura Y, Yurino H, Hashimoto S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B₄. *J Immunol* 2018 Mar 1, 200 (5): 1839-1852. doi: 10.4049/jimmunol.1700544.

5. Mukaida N, Tanabe Y, and Baba T. Chemokines as a conductor of bone marrow microenvironment in chronic myeloid leukemia. *Int J Mol Sci* 2017, 18, 1824. doi: 10.3390/ijms18081824.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 向田直史。抗がん剤によるがん微小環境の modulation。(招待講演)第 46 回和歌山悪性腫瘍研究会。2018 年 12 月 15 日。和歌山。
2. Mukaida N, Baba T, and Sasaki S. Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会。2018 年 12 月 10 日～12 日。福岡。
3. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive lung metastasis in cooperation with interstitial macrophages by generating leukotriene B₄. (English Symposium) 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
4. Baba T and Mukaida N. Pathogenic role of leukemia cell-derived extracellular vesicles in donor cell-derived leukemia after BM transplantation. 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
5. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. BCR-ABL, an oncogene of chronic myeloid leukemia, can induce cellular senescence. 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
6. Mukaida N, Naito T, Nakamoto Y, and Baba T. Crucial roles of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells in high-dose cyclophosphamide-induced specific tumor immunity. 45th Naito Conference on Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy. Sapporo, June 26-29, 2018.
7. 馬場智久。慢性骨髄性白血病におけるケモカイン CCL3 を介した正常・白血病性造血間でのクロストーク。2018 年 6 月 21 日～23 日。(招待講演)第 107 回日本病理学会総会。札幌。
8. Nosaka T, Baba T, Sasaki S, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis in collaboration with interstitial macrophages. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会。2017 年 12 月 12 日～14 日。仙台。
9. Baba T and Mukaida N. Pathological contribution of an inflammatory chemokine CCL3 in chronic myeloid leukemia as a stem cell inhibitor. (Invited Speaker) 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa, October 29-November 2, 2017.
10. Naito T, Baba T, Takeda K, Sasaki S, Nakamoto Y, and Mukaida N. Involvement of a chemokine, CCL3, in chemotherapeutic-induced tumor eradication by rapid recruitment of CD4-positive cytotoxic T cells into tumor sites. (Oral Presentation) 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa, October 29-November 2, 2017.
11. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. The recruited CCR2-expressing alveolar macrophages under the guidance of interstitial macrophage-derived CCL2 drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B₄. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa, October 29-November 2, 2017.

12. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. Context-dependent diverse roles of CCR5-mediated signals in chronic myeloid leukemia (CML) pathogenesis. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa, October 29-November 2, 2017.
13. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. Context-dependent diverse roles of CCR5-mediated signals in chronic myeloid leukemia (CML) pathogenesis. 第76回日本癌学会学術総会。2017年9月28日～30日。横浜。
14. Nosaka T, Baba T, Sasaki S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B₄. 第76回日本癌学会学術総会。2017年9月28日～30日。横浜。

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/bunsiseitai/JapContent.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：馬場 智久

ローマ字氏名： BABA TOMOHISA

所属研究機関名：国立大学法人金沢大学

部局名：がん進展制御研究所

職名： 准教授

研究者番号(8桁)： 00452095

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。