

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591213

研究課題名（和文）

腫瘍細胞と間質細胞をデュアルターゲットとした新規腫瘍幹細胞根絶法の開発

研究課題名（英文）Development of dual targeting therapy for cancer stem cells and niche.

研究代表者

小船 雅義 (KOBUNE MASAYOSHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90336389

研究成果の概要（和文）：

ヘッジホッグ (Hh) シグナル伝達の異常再活性化は、多彩な癌幹細胞で報告されている。しかしながら、骨髄系腫瘍の発症・進展と骨髄微小環境における Hh シグナル系の関係は、不明である。本研究において、我々は健常人 CD34+細胞、CD34+白血病/骨髄形成細胞と BM 間質細胞における Hh 関連タンパク質の発現を検討した。Indian hedgehog (Ihh) 蛋白とそのシグナル伝達トランスデューサ SMO は双方ともに CD34+急性骨髄性白血病 (AML) で発現していた。また、骨髄異形成症候群 (MDS) における CD34+分画においても発現を認めた。さらに、Hh に対する中和抗体の実験で、Ihh が autocrine している可能性が示唆された。意外なことに、内因性 Hh 抑制蛋白である HHIP の発現は、健常由来の間質細胞における HHIP の発現に比して、AML/MDS-由来の間質細胞において激減していた。さらに、骨髄間質細胞における HHIP 発現量は、共培養した際の SMO+白血病細胞の増殖性と強い相関を認めた。薬剤 5-Aza-dC を用いて、HHIP 遺伝子のプロモーターの脱メチルを促すと、HHIP 発現が上昇し、それに伴って、AML/MDS-由来間質細胞の白血病細胞の支持能が減少した。5-Aza-dC のこの効果は、HHIP に対する shRNA を間質細胞に導入することで打ち消された。これらの結果は、骨髄間質における HHIP 発現が抑制されると、AML/MDS が進行・進展しやすくなる可能性を示唆しているものと考えられ、今後の本研究領域のさらなる進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Aberrant reactivation of Hedgehog (Hh) signaling has been described in a wide variety of human cancers including cancer stem cells. However, involvement of Hh signaling system in bone marrow (BM) microenvironment in the development of myeloid neoplasm has remained unclear. In this study, we assessed the expression of Hh related proteins in normal human CD34+ cells, CD34+ leukemic/dysplastic cells and BM stromal cells. Both Indian hedgehog (Ihh) and its signal transducer, SMO were expressed in CD34+ acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) derived cells, suggesting that Ihh could effect in autocrine manner. Remarkably, the intrinsic Hh signaling inhibitor, human hedgehog-interacting protein (HHIP) expression in AML/MDS-associated stromal cells was drastically lower than that in healthy donor derived stromal cells. Moreover, the HHIP expression level in BM stromal cells highly correlated with supporting activity of SMO+ leukemic cells. Demethylating agent 5-aza-dC rescued the HHIP expression via demethylation of HHIP gene and reduced the leukemia-supporting activity of AML/MDS-associated stromal cells. This effect of 5-aza-dC could be negated by HHIP shRNA transfer into stromal cells. Interestingly, HHIP-reduced stromal cells preferentially migrated toward Ihh-releasing leukemic cells. These results indicate that suppression of stromal HHIP expression could be involved in the progression of AML/MDS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：①癌 ②内科 ③シグナル伝達 ④臨床 ⑤発現制御

1. 研究開始当初の背景

近年、血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は目覚ましい進歩をとげ、悪性リンパ腫や白血病の一部に長期生存が得られる症例が見られるようになった。しかしながら高リスクの白血病や骨髄腫などにおいては腫瘍細胞を根絶することが困難で、骨髄移植や近年進歩した分子標的療法を併用しても根治することは困難である。最近、この治療抵抗性に血液腫瘍細胞と骨髄間質細胞の様々な相互作用が関与することが明らかとされている。しかしながら、ヒト骨髄間質細胞の培養は極めて困難であり、約 20 継代程度で細胞分裂が停止してしまうことが、血液腫瘍細胞とヒト間質細胞の相互作用を迅速に解析していく上での妨げとなっている。最近、申請者らはヒト骨髄間質細胞の株化に成功し、それらにおける遺伝子の発現を解析した。その結果、Indian hedgehog (Ihh) が造血前駆・幹細胞の生存および増殖を支持することを見出した。また、急性骨髄白血病に関して解析した結果、薬剤抵抗性が integrin  $\beta 1$  を介した骨髄間質細胞との接着により、惹起されることを見出した。さらに Hh を *in vivo* で過剰発現させると、骨髄造血微細環境の構造異常や、T および B リンパ球の分化が抑制されることを見出し報告した。これらのことは、Hh シグナルは腫瘍細胞自身の細胞増殖に働くのみならず、腫瘍間質細胞の形成支持因子として作用する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では白血病細胞および腫瘍間質細胞における Hh シグナルの関与をより詳細に解析するとともに、そのシグナルを遮断することにより腫瘍細胞および腫瘍間質細胞の両者を同時にターゲットとした新規の治療法を開発することを目的とする。本研究では研究期間内に、Hh シグナルが血液腫瘍細胞の

増殖および腫瘍間質細胞の形成を誘導する分子機構を詳細に解析する。次に前臨床試験を視野に置き、患者由来の血液腫瘍細胞および間質細胞を用いることで、抗 Hh 中和抗体、Cyclopamine および HIP を含む Hh シグナル阻害剤の治療効果を検討する。以上のアプローチにより最終的に臨床応用を目指し研究を展開する。

3. 研究の方法

平成 21 年度は主として Hh 阻害剤等の血液腫瘍細胞および間質細胞における効果を *in vitro* において詳細に解析し、今後の研究の進展のための十分な基礎データを得ることを目的とする。平成 22 年度以降は、患者由来の初代白血病細胞を用いた解析を行とともに、Hh 阻害剤を用いた治療効果の検討を開始する。

1) 白血病細胞における Ihh、receptor 分子およびシグナル伝達分子の発現とその活性の解析

AML 細胞株として U937, HL60, Kasumi-3, KG-1, TF-1 を用いて、Ihh の発現とそのレセプター分子の発現を PCR および Taqman-PCR により解析する。

2) Hh シグナルを遮断することによる *in vitro* での薬剤耐性の解除の検討

ヒト骨髄間質細胞と白血病細胞株を共培養する。共培養開始時に Hh シグナル阻害因子 (HIP) あるいは Smoothened 阻害剤 (Cyclopamine) を培養上清に添加する。腫瘍細胞の増殖抑制効果を MTT アッセイなどを用いて検討する。また、白血病治療に用いられる薬剤である Ara-C に対する薬剤耐性についても検討する。

3) 骨髄腫細胞と腫瘍由来・骨髄間質細胞の機

能の解析

正常骨髄間質細胞が腫瘍細胞と相互作用し、腫瘍間質細胞として働く場合の形質や機能の変化については充分解析されていない。本研究では血液腫瘍細胞と腫瘍由来・骨髄間質細胞の表面抗原や接着分子は flowcytometry で、サイトカイン遺伝子発現については RCR および real time PCR でスクリーニングする。また、正常骨髄間質細胞との機能の差異に関して検討する。

#### 4. 研究成果

1) 一部の CD34 陽性白血病細胞株および赤白血病細胞株においては、Hh が発現し、そのレセプター (Patched および Smoothed) が発現していることを PT-PCR 法で明らかにした (図 1)。

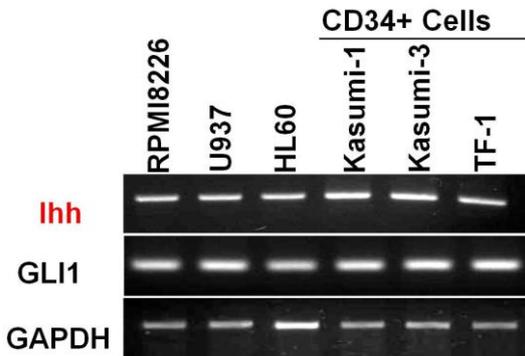


図 1

2) さらに、下流の転写因子 Gli 反応性プラスミドを用いたルシフェラーゼ・アッセイで、Hh シグナルが細胞内に伝達していることを確認すると共に、Hh の中和抗体で処理することにより、このシグナル伝達が阻害されることを明らかとした。したがって、腫瘍細胞から産生された Hh は、オートクラインにより腫瘍細胞の増殖が促進するものと考えられた。

3) さらに、Cyclopamine などの Hh シグナル阻害剤を用いること、腫瘍細胞増殖抑制、アポトーシスを誘導のみならず Ara-C に対する薬剤耐性が解除できることが示された (図 2)。

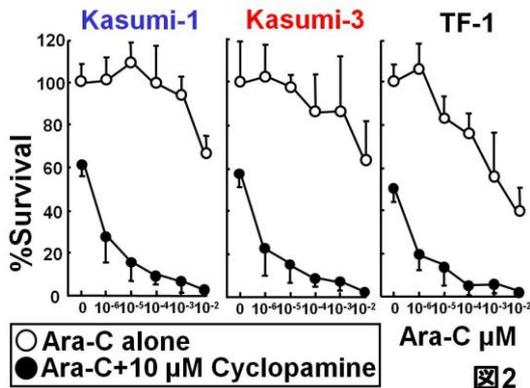
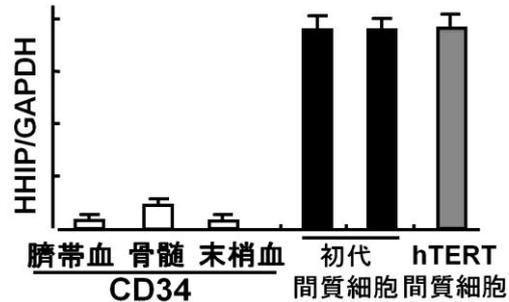


図 2

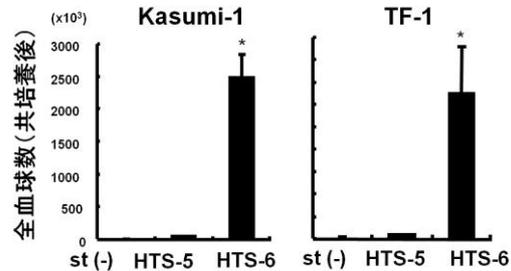
4) CD34 陽性白血病細胞株および赤白血病細胞株においては、Hh シグナルの内的因性抑性因子である HHIP が、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することを確認した。さらに、正常骨髄間質細胞における HHIP の発現を解析したところ腫瘍細胞の数 100 倍の高発現を認めた (図 3)。

図 3 正常造血・間質細胞における HHIP の発現



5) 骨髄間質細胞のクローンを作成したところ、HHIP 高発現のみならず HHIP 低発現のクローンを樹立可能であった。無血清培地で腫瘍細胞と間質細胞を共培養したところ、HHIP 高発現・間質細胞では腫瘍細胞の増殖が遅く、HHIP 低発現・間質細胞では、腫瘍細胞の増殖が速いことが確認された (図 4)。

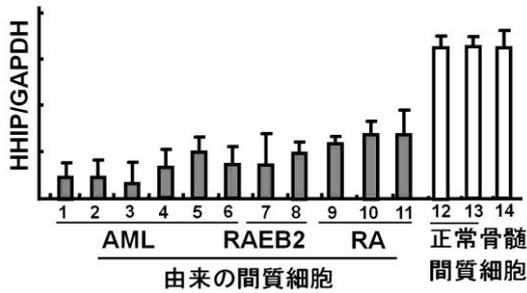
図 4 HHIP 低発現ストローマにおける増殖抑制効果の破綻



6) HHIP 高発現・間質細胞の HHIP を shRNA で knockdown した後に、腫瘍細胞と共培養すると腫瘍細胞の増殖が促進されることが示され、逆に HHIP 低発現・間質細胞に HHIP を高発現させると、共培養による腫瘍支持能が低下することが示された。このことは、間質細胞の HHIP が新たな分子標的になる可能性を示唆している。

7) 正常間質細胞、腫瘍間質細胞および CD34 陽性細胞における human HIP (HHIP) の発現強度を real time PCR 法を用いて検討したところ、正常間質細胞における HHIP の発現は、腫瘍間質および CD34 陽性腫瘍細胞の数 100 倍の高発現を認めた (図 5)。

図5 AML/MDS間質細胞におけるHHIPの発現



8) 無血清培地で CD34 陽性腫瘍細胞と腫瘍間質細胞をサイトカイン存在下で共培養したところ、HHIP 高発現・正常間質細胞では腫瘍細胞の増殖が遅く、HHIP 低発現・腫瘍間質細胞では、腫瘍細胞の増殖が速いことが確認された。

9) HHIP 高発現・正常間質細胞の HHIP 発現を shRNA で knockdown した後に、CD34 陽性腫瘍細胞と共培養すると腫瘍細胞の増殖が促進されることが示され、逆に HHIP 低発現・間質細胞に HHIP を高発現させると、共培養による腫瘍支持能が低下することが示された。このことは、骨髄間質細胞における HHIP 発現が CD34 陽性腫瘍細胞に対して抑制的に働く可能性を示唆している。現在、腫瘍間質細胞において HHIP 発現が低下する分子機構を解明し、新たな腫瘍ニッチに対する分子標的療法に発展させる方策を検討中である。

#### 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 7 件)

1. Kobune M et al. 2<sup>nd</sup>. Prognostic significance of serum ferritin level at diagnosis in myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 95:527-534, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1007/s12185-012-1048-3
2. Kobune M et al. 1<sup>st</sup>. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. *Int J Hematol* 93:715-719, 2011. 査読有り  
DOI: 10.1007/s12185-011-0878-8
3. Sato Y, Kobune M et al. Endoscopic findings of enteropathy-type T-cell lymphoma by double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy. *Dig Endosc* 22:243-245, 2010. 査読有り  
URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20642619](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20642619)

4. Kuribayashi K, Kobune M et al. Pure red cell aplasia associated with Good's syndrome accompanied by decreased stem cell factor production in the bone marrow. *Intern Med* 49: 377-382, 2010. 査読有り

URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20642619](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20642619)

5. Ono I, Kobune M, et al. De novo follicular regeneration of the skin by wingless int 3 and bone morphogenetic protein 2 genes introduced into dermal fibroblasts and fibroblast growth factor-2 protein. *Wound Rep Reg* 17: 436-446, 2009. 査読有り

URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19660053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19660053)

6. Hirayama Y, Kobune M, et al. Late onset neutropenia and immunoglobulin suppression of the patients with malignant lymphoma following autologous stem cell transplantation with rituximab. *Intern Med* 48: 57-60, 2009. 査読有り

URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19122357](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19122357)

7. Kobune M, et al. 1<sup>st</sup>. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci* 100: 948-955, 2009. 査読有り

URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19245435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19245435)

[学会発表] (計 4 件)

1. Kobune M et al. 1<sup>st</sup>. Long-Term Production System of Red Blood Cells Using Human Cord Blood and Stromal Cells. 52nd American society of Hematology Annual Meeting, 2010 Dec 4-7, Orlando, U. S. A.
2. Kobune M et al. 1<sup>st</sup>. Long-Term ex vivo Production of Mature Erythroblasts from Umbilical Cord Blood Using a Coculture System with Telomerized Human Stromal Cells. JSH International Symposium, 2010 July 16-17, Akita, Japan.
3. 小船雅義, 村瀬和幸, 井山諭, 佐藤勉, 瀧本理修, 菊地尚平, 宮西浩嗣, 佐藤康史, 加藤淳二. SMO 阻害剤は急性骨髄性白血病細胞の薬剤耐性を解除する (ワークショップ). 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会: 東京, 2010(7/6-8).

4. Kobune M, et al. 1<sup>st</sup>. Cyclopamine induced apoptosis in primary CD34+ acute leukemic cells. American Society of Hematology, 2009 Dec 5-8, New Orleans, USA.

〔図書〕（計 4 件）

1. 小船雅義, 加藤淳二. 血液疾患アプローチのための解剖生理. 病気と薬パーフェクトガイド増刊号. 南山堂: 758-761, 2011.
2. 小船雅義, 加藤淳二. 感染・血液診療エキスパート. 貧血-炎症に伴う貧血. 中外医学社: 00-106, 2010.
3. 小船雅義, 加藤淳二. 主な血液疾患用薬剤の作用機序と適応鉄剤・ビタミン B12. 南江堂: 70-71, 2010.
4. 小船雅義, 加藤淳二. 血液疾患アプローチのための解剖生理. 病気と薬パーフェクト BOOK2009. 南山堂: 1202-1205, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小船 雅義 (KOBUNE MASAYOSHI)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90336389

### (2) 研究分担者

菊地 尚平 (KIKUCHI SHOHEI)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号: 80515792

### (3) 研究分担者

井山 諭 (IYAMA SATOSHI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50398319

### (3) 研究分担者

瀧本 理修 (TAKIMOTO RISHU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10336399