

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591153

研究課題名（和文）11q23 転座型 ALL と、それを維持する骨髄微小環境の生物学的特性と機序の解明

研究課題名（英文）molecular mechanisms supporting minimal-residual disease of 11q23/*MLL*-rearranged leukemia cells in bone marrow

研究代表者

古市 嘉行（FURUICHI YOSHIYUKI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：20467137

研究成果の概要（和文）：難治性小児白血病である 11q23 転座型 ALL は FLT3 を高発現し、骨髄微小環境において、大量の FL を発現・分泌している骨髄ストローマ細胞に接着し FLT3/FL-interaction を介してアポトーシス抵抗性の休眠状態に誘導される。TGF- β 1 と FL の共添加は 11q23 転座型 ALL 細胞の TGF- β 1 遺伝子発現を強く誘導するが、骨髄ストローマ細胞や ALL 細胞自身が分泌する TGF- β 1 と FL が協調的に作用することで、より深い休眠状態に誘導される可能性が示された。慢性骨髄性白血病の白血病幹細胞の維持に重要な役割をもつフォークヘッド転写因子 FOXO3a は、FL 及び低濃度 TGF- β 1 刺激により、その細胞内局在が核外へ移動する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：FLT3 is highly expressed in acute lymphoblastic leukemia with the 11q23/*MLL* rearrangement refractory to chemotherapy. The FLT3/FLT3-ligand (FL) interaction between 11q23/*MLL*-rearranged leukemia cells and bone marrow stromal cells expressing FL at high levels induce 11q23/*MLL*-rearranged leukemia cells into dormant status resistant to anti-leukemic agents. TGF- β 1 and FL cooperatively induce TGF- β 1-mRNA expression of 11q23/*MLL*-rearranged leukemia cells. Moreover, TGF- β 1 secreted by both bone marrow stromal cells and leukemia cells induce 11q23/*MLL*-rearranged leukemia into dormant status more strongly in cooperation with FL. Nuclear localization of forkhead O transcription factors (FOXO3a), that plays an important role in the maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells, is decreased by stimulation of TGF- β 1 and FL in 11q23/*MLL*-rearranged leukemia cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：11q23 転座型 ALL・微小残存病変 (MRD)・FLT3-ligand (FL)・TGF-beta1
骨髄ストローマ細胞・FOXO

1. 研究開始当初の背景

難治性小児白血病である 11q23 転座型急性リンパ性白血病 (以下 11q23 転座型 ALL) では、化学療法に対する骨髄移植療法の優位性を疑問視する報告がある一方、新たな分子標的療法の試みもなく、治癒率向上が難しい状況にあった。即ち 11q23 転座型 ALL では、強力な化学療法により約 90%の症例で寛解を得られるものの、早期に再発することが多く、その 3 年無病生存率は 30%台であり、これには抗白血病剤に対しアポトーシス抵抗性を獲得した微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) の形成が深く関与している。

近年、この 11q23 転座型 ALL で FLT3 (Fms-like tyrosine kinase-3) が高レベルに発現していることが判明したことから、11q23 転座型 ALL 細胞における FLT3/FLT3-ligand (FL) システムの生物学的特性について多面的に解析し理解を深めることが、治療成績向上のために重要であると考えられるようになった。

FLT3 は造血の初期段階の制御に重要な役割を果たすサイトカイン受容体であり、白血病細胞でも B 前駆細胞性 ALL や成人急性骨髄性白血病 (AML) で高発現している。11q23 転座型 ALL が、特異的な gene expression profiling を有し、FLT3 遺伝子を他の B 前駆細胞性 ALL と比べて過剰発現していることが判明した後、我々は FLT3 を過剰発現している 11q23 転座型 ALL では、遺伝子変異のない wild-type FLT3 であっても恒常的に活性化されていることを見出した。また 11q23 転座型 ALL 細胞に PKC412 等の FLT3 阻害剤を添加することで、FLT3 の遺伝子異常の有無にかかわらず効果的にアポトーシスが誘導されことも判明した。

以下、11q23 転座型 ALL 細胞における FLT3/FL 相互作用の生物学的特性について、我々がこれまでに見出したことを述べる。(Furuichi Y, et al. Cancer Research 2007;67:9852-9861)

(1) wild-type FLT3 を有する 11q23 転座型 ALL 細胞株に in vitro で FL を添加し培養すると、他の B 前駆細胞性 ALL 細胞株の多くが増殖刺激を受けるのとは対照的に、細胞回転を停止する。(G0/G1 arrest) (^3H) Thymidine uptake 法及び BrdU+PI 染色法)

(2) この増殖抑制効果は FLT3 のキナーゼ活性に依存する反面、細胞内シグナル伝達分子 STAT5 の脱リン酸化と、細胞回転関連分子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター p27 の分解システムの抑制による発現誘導を伴う。(Western blot 法及び RNA protection assay)

(3) FL 添加により休眠状態となった 11q23 転座型 ALL 細胞は放射線照射や抗白血病剤に対しアポトーシス抵抗性となる。(Annexin V +PI 二重染色法、dye exclusion test)

(4) 大量の FL を発現・分泌している骨髄ストローマ細胞に接着した 11q23 転座型 ALL 細胞は FLT3/FL-interaction を介して抗白血病剤に対しアポトーシス抵抗性となり MRD の形成に関与している可能性があり、アポトーシス抵抗性は抗 FL 中和抗体で部分的ではあるが有意にキャンセルされる。従って FLT3 特異的阻害剤を添加することで、11q23 転座型 ALL 細胞と骨髄ストローマとの FLT3/FL 相互作用を阻害できれば、細胞回転が再開され抗白血病剤への感受性を回復させる可能性がある。

2. 研究の目的

AML において、白血病幹細胞が正常骨髄幹

細胞とニッチを共有し、その多くが抗白血病剤抵抗性を示す細胞休止期に誘導される可能性が指摘され、白血病細胞を維持する骨髄微小環境の重要性が注目されている。更に細胞増殖、発生、分化など多様な生命現象に関与する サイトカイン TGF- β が慢性骨髄性白血病 (CML) の白血病幹細胞の維持や抗白血病剤抵抗性に関与していることが判明している。

本研究では 11q23 転座型 ALL が抗白血病剤に対しアポトーシス抵抗性を獲得する過程における FLT3/FL システム及び TGF- β 1-smad signal の関与と、そのメカニズムを解明し、更に MRD の形成に関わる、骨髄微小環境の他の分子間相互作用を探索することにより、11q23 転座型 ALL の治療成績の改善をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) 11q23 転座型 ALL 細胞株における FL 誘導性細胞回転停止への TGF- β 1 の関与と、TGF- β 1 自身の生物学的特性についての解析

- ① 11q23 転座型 ALL 細胞株 KOCL58 を用いて、FL あるいは TGF- β 1 単独添加時と、FL と TGF- β 1 の共添加時の TGF- β 1 遺伝子の発現変化を RT-PCR 法を用いて検討した。
- ② FL 及び TGF- β 1 により誘導される増殖抑制効果を thymidine uptake 法を用いて検討した。
- ③ 11q23 転座型 ALL 細胞株における FL 誘導性細胞回転停止への TGF- β 1 type I 受容体阻害剤の効果を thymidine uptake 法を用いて検討した。
- ④ FL と高濃度及び低濃度 TGF- β 1 の細胞回転への影響を BrdU+PI 染色法及び dye exclusion test を用いて検討した。
- ⑤ FL と低濃度 TGF- β 1 の共添加による抗白血病剤 AraC へのアポトーシス抵抗性誘導を Annexin V+PI 二重染色法及び active caspase3 染色で検討した。

⑥ FL と低濃度 TGF- β 1 の共添加による p27 の発現変化を Western blot 法で検討した。

⑦ 11q23 転座型 ALL 細胞株における FL 及び TGF- β 1 の生物学的特性を低酸素下で検討した。

⑧ 転写因子 FOXO3a について、FL 及び低濃度 TGF- β 1 刺激による局在変化を低酸素下で In Cell Analyzer を用いて解析した。即ち FOXO3a に接着した抗 FOXO3a 蛍光抗体の輝度を細胞全体と核内で比較検討した。

(2) MRD の形成に関わる骨髄微小環境の他の分子間相互作用の探索～骨髄ストローマ細胞由来液性因子について

- ① 11q23 転座型 ALL 細胞株 KOCL58 を、FL を高発現している骨髄ストローマ細胞 KM104 と接触共培養し、抗 FL 中和抗体及び TGF- β 1 受容体阻害剤を添加した際の増殖能の変化を thymidine uptake 法を用いて検討した。
- ② 11q23 転座型 ALL 細胞を、骨髄ストローマ細胞 KM104 と非接触共培養 (以下 transwell 共培養) した際の細胞回転への影響を PI 染色で、AraC 抵抗性誘導能を Annexin V+PI 二重染色法等で検討した。
- ③ 11q23 転座型 ALL 細胞に AraC 抵抗性を誘導したと考えられる骨髄ストローマ細胞由来液性因子に関して、ALL 細胞株と骨髄ストローマ細胞の transwell 共培養系における、抗 FL 中和抗体や TGF- β 1 受容体阻害剤添加の影響を Annexin V+PI 二重染色法で検討した。
- ④ 骨髄ストローマ細胞の培養上清で増加しているサイトカインを Cytokine antibody assay を用いて探索した。
- ⑤ 上記探索により得られたサイトカイン angiogenin 及び IL6 について 11q23 転座型 ALL 細胞への AraC 抵抗性誘導能を PI 染

色法で検討した。

4. 研究成果

(1) 11q23 転座型 ALL 細胞株における TGF- β 1 の生物学的特性

最近、TGF- β は正常骨髄幹細胞の hibernation や CML 白血病幹細胞の維持に関与していることが報告され、骨髄微小環境において MRD を形成、維持する上で重要な役割を担っている可能性が指摘されている。また我々はマイクロアレイを使用し、FL 刺激による ALL 細胞の遺伝子発現の変化を、FL 刺激で増殖が抑制され、抗白血病剤に抵抗性となる 11q23 転座型 ALL 細胞株 KOCL58 (%抑制 = $55.7 \pm 3.7\%$) と、反対に増殖が亢進する TEL-AML 陽性 ALL 細胞株 KOPN79 (%刺激 = $60.8 \pm 10.0\%$) を用いて比較検討し、発現傾向が異なる遺伝子として TGF- β 1 や Egr1 等を見出した。そこで 11q23 転座型 ALL 細胞株における、FL 誘導性細胞回転停止への TGF- β 1 の関与と、TGF- β 1 自身の生物学的特性について解析した。

TGF- β 1 の分泌刺激として有効なものに TGF- β 1 自身が知られていたが、我々は RT-PCR 法により、11q23 転座型 ALL 細胞株 (KOCL58) において、TGF- β 1 遺伝子が TGF- β 1 単独添加時に比し、FL 及び TGF- β 1 の共添加でより強く発現誘導されることを見出した。

次に我々は FL 及び TGF- β 1 添加による増殖能への影響を thymidine uptake 法を用いて検討したところ、11q23 転座型 ALL 細胞株 (KOCL58) において FL と TGF- β 1 の共添加で相乗的な増殖抑制が認められた (図 1)。

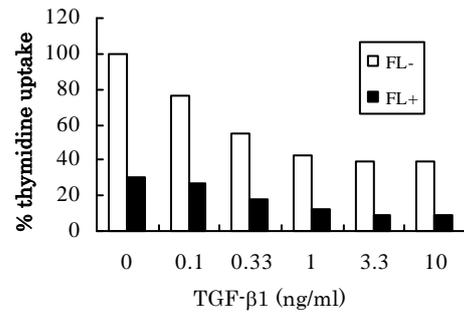


図 1. 11q23 転座型 ALL 細胞株 (KOCL58) における FL と TGF- β 1 の共添加による相乗的な増殖抑制効果

しかし 11q23 転座型 ALL 細胞株 (KOCL58) において、FL 添加による増殖抑制能は TGF- β 1 受容体阻害剤により部分的にキャンセルされたのみであり、従って FL 刺激により 11q23 転座型 ALL 細胞から産生される TGF- β 1 は FL 誘導性細胞回転停止の主要なメカニズムではないと考えられた。

更に FL と高濃度 TGF- β 1 (10ng/ml) の共添加による細胞回転への影響を BrdU+PI 染色法で検討したところ、G0/G1 期細胞休止に加えてアポトーシスが誘導されることが判明した (図 2a)。しかし興味深いことに FL と低濃度 TGF- β 1 (0.33ng/ml) の共添加では、協調的な細胞回転停止は認められたもののアポトーシスは誘導されず (図 2b)、AnnexinV+PI や active caspase3 染色を用いた検討では、むしろ抗白血病剤 AraC に対するアポトーシス抵抗性が誘導された (図 3)。

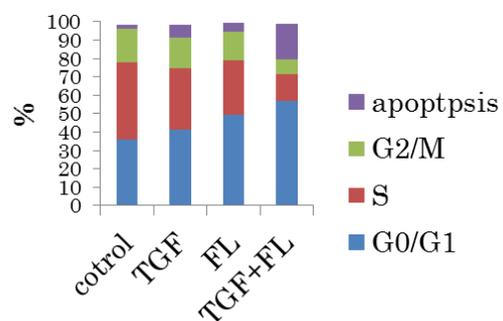


図 2a. FL+高濃度 TGF 刺激の細胞回転への影響

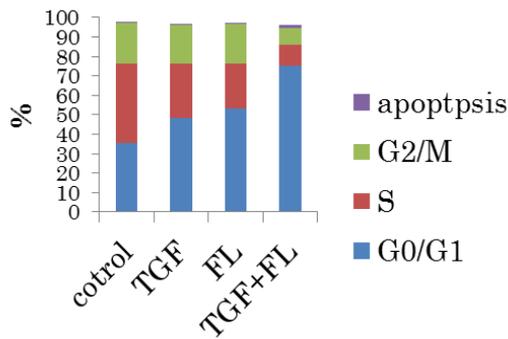


図 2b. FL+低濃度 TGF 刺激の細胞回転への影響

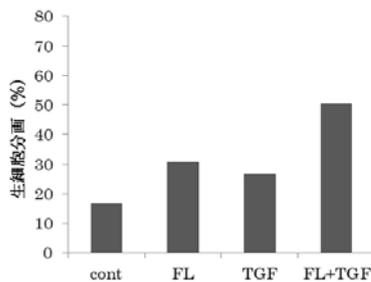


図 3. 11q23 転座型 ALL 細胞株 (KOCL58) における FL+低濃度 TGF 刺激による AraC 抵抗性誘導

また FL と低濃度 TGF- β 1 の共添加により p27 が協調的に発現誘導されることが判明した。更に FL 及び低濃度 TGF- β 1 の共添加により協調的に誘導されるアポトーシス抵抗性は、低酸素下の培養条件において、より顕著であった。

CML 白血病幹細胞の維持に重要な役割をもつと考えられているフォークヘッド転写因子 FOXO3a について、FL 及び低濃度 TGF- β 1 刺激による挙動変化を低酸素下で In Cell Analyzer を用いて検討したところ、FOXO3a は FL 及び TGF- β 1 刺激により、その細胞内局在が核外へ移動する可能性が示唆された。

(2) MRD の形成に関わる骨髄微小環境の他の分子間相互作用の探索～骨髄ストローマ細胞由来液性因子について

thymidine uptake 法を用いた検討で、11q23 転座型 ALL 細胞株と骨髄ストローマ細胞との

接触共培養系に、抗 FL 中和抗体および TGF- β 1 受容体阻害剤を添加すると ALL 細胞株の細胞休止状態が一部解除された。即ち 11q23 転座型 ALL 細胞は、骨髄ストローマ細胞との接着により FLT3/FL-interaction を介して半休眠状態に誘導されるが、更に骨髄ストローマ細胞が分泌する TGF- β 1 や、ALL 細胞自身が分泌する TGF- β 1 が FL と協調的に作用することにより、抗白血病剤抵抗性の深い休眠状態に誘導される可能性が示された (図 4)。

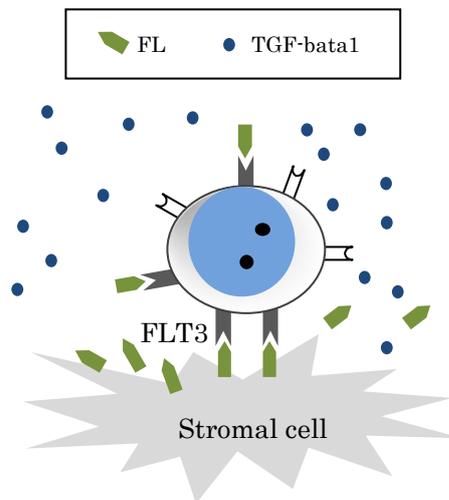


図 4. FL+低濃度 TGF 刺激により深い休眠状態へ誘導された 11q23 転座型 ALL 細胞は抗白血病剤抵抗性となる

骨髄ストローマ細胞由来液性因子による 11q23 転座型 ALL 細胞の抗白血病剤耐性誘導を非接触共培養系 (transwell 共培養系) で検討したところ 11q23 転座型 ALL 細胞株は、細胞増殖が亢進し、AraC に対するアポトーシス抵抗性が誘導された。しかし transwell 共培養により誘導された AraC 抵抗性は、抗 FL 中和抗体、TGF- β 1 受容体阻害剤の添加により減弱されることはなかった。

11q23 転座型 ALL 細胞は骨髄ストローマ細胞との接着により休眠状態に誘導されアポトーシス抵抗性を獲得し、この作用の一部に FL 及び TGF- β 1 が関与している可能性がある。その一方で、非接触 11q23 転座型 ALL 細胞は

多様な骨髄ストローマ細胞由来液性因子により増殖の促進とアポトーシス抵抗性を獲得している可能性がある。

我々は11q23 転座型 ALL 細胞にアポトーシス抵抗性を誘導する骨髄ストローマ細胞由来液性因子を探索するため Cytokine antibody assay を用い、骨髄ストローマ細胞の培養上清とメディアム中の液性因子を比較検討し、angiogenin 及び IL6 がストローマ細胞培養上清で増加していることを見出した。そこで11q23 転座型 ALL 細胞(KOCL58)に angiogenin 及び IL6 を添加し、抗白血病剤 AraC に対するアポトーシス抵抗性誘導能を検討したが、変化は認められなかった。transwell 共培養系で11q23 転座型 ALL 細胞に AraC 抵抗性を誘導する骨髄ストローマ細胞由来液性因子を探索したが、FL, TGF- β 1, angiogenin, IL6 の単独あるいは複数での関与は小さいものと考えられた。

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)

[学会発表] (計1件)

古市嘉行、合井久美子、犬飼岳史、佐藤広樹、高橋和也、加賀美恵子、杉田完爾

骨髄ストローマ細胞由来液性因子による

MLL+ALL細胞の薬剤耐性誘導の検討

日本小児血液学会、2010年12月17日、
大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 嘉行 (FURUICHI YOSHIYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：20467137

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし