

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460669
研究課題名(和文) 急性白血病の症例ごとの幹細胞自己複製シグナルとその分子標的薬の効果予測の検査法

研究課題名(英文) Tests for self-renewal signals of acute leukemia stem cells and prediction of the effects of molecular-targeted drugs for the signals

研究代表者
東田 修二 (TOHDA, Shuji)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251510
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性白血病を治癒させるには白血病幹細胞の幹細胞性維持に関わるシグナルを明らかにする検査法と、それに対する分子標的薬が有効な症例を選別する検査法の開発が必要である。本研究により、白血病細胞の培養系において、BMI1シグナルやNOTCHシグナルが白血病の幹細胞性制御に関与することを明らかにした。また、これらの分子に対する阻害薬が細胞増殖や幹細胞シグナルを抑制することを見出した。これらの阻害薬が新たな分子標的治療となる可能性を示すとともに、その薬剤感受性検査法を開発した。

研究成果の概要(英文)：To cure acute leukemia, development of two tests is required: tests to identify the signals regulating stemness of leukemia stem cells and sensitivity tests of the molecular-targeted drugs for the signals. We have found that BMI1 signal and NOTCH signal regulate the stemness of leukemia stem cells using in vitro culture assay. We also showed that the inhibitors suppressed the cell growth and stemness-related signaling. These findings indicate the possibility that the inhibitors can be molecular-targeted drugs. We also developed the drug-sensitivity tests.

研究分野：医歯薬学

キーワード：白血病 白血病幹細胞 分子標的薬 薬剤感受性検査

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、現行の化学療法により約8割の症例は寛解に至るが、その半数以上は、わずかに残存する白血病幹細胞が再び増殖して再発する。治癒率を向上するには、従来型の白血病細胞全体の殺細胞効果による治療ではなく、白血病幹細胞を標的として根絶する新たな治療戦略が必要である。

2. 研究の目的

白血病幹細胞を根絶するためには、白血病幹細胞の自己複製能を制御するシグナルを明らかにし、症例ごとのシグナルの特性に応じた分子標的治療を行う必要がある。これを臨床応用するには、この治療の有効性を事前に予測する検査法の確立が必要である。これらを明らかにし、検査法を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

急性白血病細胞を培養し、幹細胞性を制御することが知られているシグナル伝達系の構成分子の遺伝子発現、蛋白発現と活性化を解析することにより、各白血病細胞でどのような幹細胞シグナルが作用しているかを明らかにする。

次に、活性化している分子に対する阻害薬(低分子化合物)やその分子の発現をノックダウンする siRNA を添加して細胞を培養し、細胞増殖やコロニー形成能に対する効果を調べる。有効に作用した細胞における、遺伝子発現や蛋白活性化の変化を解析して、効果の分子機序を明らかにするとともに、どのような解析をすれば、有効性を予測できるかを検討する。

この3年間では、EPH-ephrin シグナル、NOTCH シグナルの蛋白糖鎖修飾、BMI1 シグナルについて解析を行った。また、幹細胞性との関与は未解明であるが、血液系腫瘍細胞で高頻度に見られる NPM1 変異や MYD88 変異を検出する新たな遺伝子検査法を開発に取り組んだ。

4. 研究成果

以下の研究成果を論文もしくは学会口演として発表した。

(1) 白血病細胞の増殖における EPH-ephrin シグナルの作用

幹細胞制御シグナルの一つである EPH 受容体とそのリガンドである ephrin とのシグナルの、白血病細胞の増殖における作用を検討した。EPH 受容体と ephrin は多数の種類が存在するが、白血病細胞ではさまざまな組み合わせの EPH と ephrin が発現することを見出した。ある種の白血病細胞では、遺伝子組換え型 ephrin B2 刺激により、短期増殖とコロニー形成が促進し、蛋白のチロシンリン酸化の増強した。こうした事実は EPH-ephrin シグナルが白血病細胞の増殖に関与する可能

性を示した。さらに EPH 阻害薬の薬剤感受性の検討を行った。

(2) 白血病細胞における NOTCH 蛋白の糖鎖修飾の解析

正常組織幹細胞を制御する NOTCH シグナルは、NOTCH 蛋白の糖鎖修飾によって、その作用が修飾される。NOTCH の糖鎖修飾に関与する種々の糖転移酵素は、白血病細胞にも発現していること、リガンド刺激による NOTCH 活性化によって、一部の糖転移酵素の発現が増強し、ポジティブフィードバックを受けることを見出した。これらの酵素の制御が幹細胞の抑制につながる可能性を示した。

(3) 白血病細胞の増殖における BMI1 の作用

ポリコーム群複合体はヒストンのユビキチン化修飾を介した遺伝子発現の抑制により、幹細胞制御に関与する。この複合体を構成する BMI1 蛋白は調べたすべての白血病細胞で高発現していた。BMI1 阻害剤は白血病細胞にアポトーシスを誘導して増殖を抑制し、NOTCH 蛋白の発現をも抑制することを見出した。BMI1 阻害薬が白血病幹細胞に対する分子標的薬となる可能性を示した。

(4) 白血病細胞における NPM1 遺伝子変異の検査法の開発

急性骨髄性白血病で高頻度に見られる NPM1 遺伝子変異を、Quenching プローブと PCR を用いて、簡便かつ高感度に検出する新規検査法を開発した。

(5) リンパ球系腫瘍における MYD88 遺伝子変異の検出と細胞増殖に対する MYD88 の作用

リンパ球系腫瘍にしばしば見られる MYD88 遺伝子変異を高感度に検出する遺伝子検査法を開発した。この遺伝子変異によって恒常的に活性化している MYD88 蛋白に対する分子標的薬の、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果や細胞内シグナル伝達蛋白への作用を明らかにした。

以上のように、白血病細胞における、いくつかの幹細胞シグナルの分子病態を明らかにし、それに対する分子標的薬が有効である可能性を示すとともに、その感受性検査法の原型を見出した。しかし、これらの成果の多くは白血病細胞株を用いた実験によるものであり、今後は多数の患者由来細胞にも対象を拡げる必要がある。また、自己複製能などの幹細胞性を、より明確に示すことができる検査法の開発も必要であり、今後の研究課題とする。また、他の幹細胞制御シグナルとの相互作用や、細胞全体としての増殖メカニズムにおける位置づけも明らかにする必要がある。

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 6 件)

1. Kawaguchi-Ihara N, Itoh M, Murohashi I, Tohda S: Establishment of a quenching probe method for detection of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia cells. *Oncology Letters* 4:2429-2432,2016
PMID: 27073492 査読あり
2. Nogami S, Kawaguchi-Ihara N, Shiratori E, Ohtaka M, Itoh M, Tohda S. Detection of the MYD88 mutation by the combination of the allele-specific PCR and quenching probe methods. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2017 39(2):163-168.
doi: 10.1111/ijlh.12598. 査読あり
3. 東田修二: 腫瘍マーカーとコンパニオン診断の適切利用による個別化医療の推進. *臨床病理* 65: 314-316, 2017 査読なし
4. 東田修二: 造血器腫瘍のバイオマーカー: 白血病幹細胞の個性診断をめざして. *臨床病理* 63: 1110-1113, 2015 査読なし
5. Tohda S: NOTCH signaling roles in acute myeloid leukemia cell growth and interaction with other stemness-related signals. *Anticancer Research* 34: 6259-6264, 2014
査読あり
6. Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S: Effect of EPH-ephrin signaling on the growth of human leukemia cells. *Anticancer Research* 34: 2913-2918, 2014 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

1. 東田修二. 教育講演:臨床検査のガイドライン JSLM2015 活用のポイント: 腫瘍マーカーとコンパニオン診断の適切利用による個別化医療の推進. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 3. 神戸国際会議場 (神戸市)
2. Erika Shiratori, Mai Itoh, Mika Ohtaka, Shohei Nogami, Shuji Tohda. Mechanisms of

Suppressive Effects of MYD88 Inhibitors on the Growth of Lymphoma and Leukemia Cells. The 58th American Society of Hematology. San Diego (USA) 2016.12.4

3. 甲田祐樹、大高美香、白鳥恵理香、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞の増殖に対する MER チロシンキナーゼの阻害剤の作用. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 2. 神戸国際会議場 (神戸市)
4. 白鳥恵理香、野上祥平、大高美香、伊藤真以、東田修二. MYD88 の阻害によるリンパ腫細胞の増殖抑制作用. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 4. 神戸国際会議場 (神戸市)
5. 野上祥平、白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞での NOTCH シグナル活性化に伴う microRNA 発現の変化. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 4. 神戸国際会議場 (神戸市)
6. 大高美香、野上祥平、白鳥恵理香、伊藤真以、東田修二. BMI1 阻害剤による白血病細胞のアポトーシス誘導を介した増殖抑制作用. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 4. 神戸国際会議場 (神戸市)
7. 奥橋佑基、細萱茂実、東田修二. 急性 T リンパ芽球性白血病における PTEN の機能解析. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016. 9. 4. 神戸国際会議場 (神戸市)
8. Shohei Nogami, Mai Itoh, Shuji Tohda: Clinical usefulness of allele-specific/quenching probe method for detection of the MYD88 L265P mutation. The 14th Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine Congress. 2016.3.26. Taipei (Taiwan)
9. 白鳥恵理香、野上祥平、王詩淳、大高美香、伊藤真以、東田修二: リンパ腫・白血病細胞株の増殖に対する MYD88 阻害薬と BTK 阻害薬の作用. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015. 11. 21. 長良川国際会議場 (岐

阜)

10. 王詩淳、野上祥平、白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二：白血病細胞における糖転移酵素の発現と Notch シグナル活性化との関連. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015. 11. 20. 長良川国際会議場 (岐阜)
11. 大高美香、白鳥恵理香、王詩淳、野上祥平、伊藤真以、東田修二：白血病細胞に対する BMI 阻害剤の細胞分子生物学的作用. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015. 11. 20. 長良川国際会議場 (岐阜)
12. 奥橋佑基、伊藤真以、細萱茂実、東田修二：Notch シグナル阻害剤に耐性を示す白血病細胞の分子病態. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 2015. 11. 20. 長良川国際会議場 (岐阜)
13. 東田修二. 造血器腫瘍のバイオマーカー：白血病幹細胞の個性診断をめざして. シンポジウム 癌生物学とバイオマーカー探索. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014. 11. 25. 福岡国際会議場 (福岡)
14. 大高美香、高橋祐介、白鳥恵理香、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞の増殖に対する Bmi1 阻害剤の作用. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014. 11. 24. 福岡国際会議場 (福岡)
15. 白鳥恵理香、大高美香、高橋祐介、伊藤真以、東田修二. *BCR-ABL* 融合遺伝子の定量 RT-PCR 法と定性 RT-Nested PCR 法での検出感度の比較. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014. 11. 24. 福岡国際会議場 (福岡)
16. 川口寛子、伊藤真以、室橋郁生、東田修二. Quenching probe 法を用いた NPM1 遺伝子変異の検出法. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014. 11. 24. 福岡国際会議場 (福岡)
17. Yuki Okuhashi, Yusuke Takahashi, Mika Ohtaka, Erika Shiratori, Shijun O, Mai Itoh, Shuji Tohda. Effects of *GLI1* and *CTNNB1* knockdown on NOTCH signaling of leukemia

cells. The 56th American Society of Hematology. 2014.12.6. San Francisco (USA)

[図書] (計 2 件)

1. 東田修二：医歯薬出版、最新臨床検査学講座 遺伝子・染色体検査学、遺伝子の検査法. 2015、(共著) pp69-117.
2. 東田修二：中外医学社、日常診療のための検査値のみかた、造血器腫瘍関連染色体・遺伝子検査. (共著) pp609-612.

[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

<http://www.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東田 修二 (TOHDA, Shuji)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：80251510

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

大高 美香 (OHTAKA Mika)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・博士課程大学院生

白鳥 恵理香 (SHIRATORI Erika)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・博士課程大学院生