

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04301

研究課題名(和文)線溶制御因子よるがん幹細胞の治療抵抗性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Blockade of PAI-1 eliminates leukemic stem cells

研究代表者

八幡 崇 (YAHATA, Takashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10398753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTGF-betaによって慢性骨髄性白血病(CML)幹細胞にPAI-1発現が強く誘導されること、そして、PAI-1発現量の多寡が治療抵抗性を決定することを明らかにした。すなわち、PAI-1発現の高いCML細胞ほど治療抵抗性であることから、TGF-betaの影響を強く受けるCML幹細胞が治療抵抗性を獲得するためにPAI-1が重要な役割を果たしていることを明確にし、PAI-1阻害剤によって白血病幹細胞が排除され再発が抑制されるなど、PAI-1阻害剤の有効性を実証する重要な知見を得ることができた。今後は、このエビデンスに基づき、白血病の根治療法の確立を目指した臨床試験を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：We found that the expression of TGF- $\beta$ -iPAI-1 signaling was selectively augmented in CML stem cells. CML cells expressing higher levels of iPAI-1 were resistance to imatinib treatment, indicating the iPAI-1 protects CML cells from TKI treatment. Combined treatment of imatinib plus PAI-1 inhibitor significantly decreased the persistent CML cells in the BM, reduced spleen size, and prolonged survival of CML-bearing mice. Importantly, blockade of PAI-1 activity in combination with TKI effectively eliminated CML stem cells in the BM, which resulted in losing their ability to initiate CML disease in the serial transplanted recipients. The effect of PAI-1 inhibitor to enhance the therapeutic effect of TKI was completely canceled by the administration of neutralizing antibody specific for MT1-MMP. Our findings provide evidence that blockade of PAI-1 activity could be a novel therapeutic approach for CML patients.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：白血病 幹細胞 ニッチ 分子標的薬 TGF-beta

## 1. 研究開始当初の背景

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は、plasminogen activator (PA) 活性を阻害することにより線維素溶解系 (線溶系) を負に制御する線溶制御因子である。申請者らの解析により、PAI-1 は造血制御因子としても機能し、造血幹細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった (Stem Cells, 2014)。さらに、PAI-1 はがんの生存、浸潤、転移にも関与していることが知られており、PAI-1 高発現型のがんは予後不良であることが明らかとなっている (Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2013)。実際、米国臨床腫瘍学会により、乳がんの予後予測因子として PAI-1 の発現解析検査が推奨された。このように、PAI-1 は多様な機能を有し、がんと深く関わる因子であるにも関わらず、研究開発当初はがんの生存や進展に PAI-1 がどのような機序でどのような役割を果たしているのかについては、ほとんど明らかにされていなかった。

申請者らは、BCR-ABL 転座型の白血病、HER2 陽性の乳がんや卵巣がんが生着したマウスに抗がん剤を投与する際に、申請者らが開発した PAI-1 活性を特異的に阻害する低分子化合物 (PAI-1 阻害剤; Nat Rev Nephrol, 2011) を併用投与すると、いずれのがんにおいても顕著な腫瘍塊の退縮と生存率の向上が得られることを見いだした (国際特許出願済)。このことは、PAI-1 はがん幹細胞の治療抵抗性獲得に重要な役割を果たしていることを示唆するが、その詳細な機序は不明なままであった。がんの根治療法を確立するためには、がん幹細胞とその周辺環境を構成する周辺細胞 (ニッチ) の両方に着目した研究が重要である。特に、申請者らは、PAI-1 がニッチのみならずがん幹細胞自身にも発現していることを見いだしたので、ニッチから産生される

外来性 PAI-1 とがん幹細胞自身が発現する内源性 PAI-1 のそれぞれに焦点を当てた研究を行う必要があると考え、本研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究計画では慢性骨髄性白血病 (CML) をモデルとした以下に挙げる課題に取り組み、PAI-1 によるがん幹細胞の治療抵抗性獲得機構を解明することにより、PAI-1 阻害剤による抗がん作用増強の機序を明確にし、そのエビデンスに基づく新しい治療戦略の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

マウス造血幹細胞を回収し、BCR-ABL 遺伝子を導入後にマウスに移植すると CML を発症する。CML 幹細胞は細胞表面抗原で特定され、ニッチ依存的に休止期状態を維持することから生理的で臨床に近い病態が再現される優れた実験系として汎用されている。本研究計画では、PAI-1 遺伝子欠損マウスをドナー (白血病幹細胞) あるいはレシピエント (ニッチ) として利用することにより、PAI-1 分子の役割を解析し、PAI-1 阻害剤の作用機序を明確にする。また、PAI-1 の制御因子である TGFb シグナルを中心とした解析を行うことによって、がん幹細胞の抗がん剤耐性獲得機構を明確にし、そのエビデンスに基づくがん幹細胞を標的とした新しい治療法の確立を目指した。

## 4. 研究成果

白血病幹細胞は、TGFb 依存的に薬剤抵抗性を獲得するが、その機序は不明なままであった。申請者らはニッチから産生される TGFb によって慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞、特に CML 幹細胞に PAI-1 発現が強く誘導されることをマウス及びヒトにおいて明らかにした。そして、PAI-1 発現を欠損あるいは過剰に発現している CML 細胞を作製

し抗がん剤感受性を検討したところ、PAI-1 発現量の多寡が治療抵抗性を決定することを明らかにした。すなわち、PAI-1 発現の高い CML 細胞ほど治療抵抗性であることから、TGF $\beta$  の影響を強く受ける CML 幹細胞が治療抵抗性を獲得するために PAI-1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで PAI-1 による治療抵抗性獲得のメカニズムについて検討した。まず PAI-1 によって制御される因子を探索したところ、セリンプロテアーゼである Furin の活性を抑制していることを突き止めた。Furin は様々なタンパク質の前駆体を成熟型に変換する酵素である。細胞が発現する PAI-1 が Furin を抑制することにより、細胞が遊走するために重要な MT1-MMP の成熟化が抑制される。つまり、PAI-1 によって MT1-MMP 発現が抑制されるので、CML 幹細胞の遊走能は低下しニッチに留まるようになる。このことが抗がん剤に対して抵抗性を示す原因であることを明らかにした。PAI-1 阻害剤はこの PAI-1 の活性を抑制するので、Furin の活性化と MT1-MMP 発現の上昇を促す。このことにより CML 幹細胞のニッチからの離脱を誘導した。重要なことに、PAI-1 阻害剤の投与により CML 幹細胞が効率良く排除され、抗がん剤投与中断後の再発も抑制された。したがって、CML 幹細胞をニッチから離脱させ、ニッチの保護効果を減弱させることによる抗がん剤高感受性化が PAI-1 阻害剤の作用機序であることが明らかになった。

本成果をもとに、白血病患者を対象とした医師主導第 2 相臨床試験を開始した(課題番号 925020)。

#### 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 4 件)

1: Muguruma Y, Yahata T, Warita T, Hozumi K, Nakamura Y, Suzuki R, Ito M, Ando K,

Jagged1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells. *Blood Cancer J.* 2017 Dec 15;7(12):650. doi: 10.1038/s41408-017-0001-3 (査読有り) .

2: Yahata T, Ibrahim AA, Muguruma Y, Eren M, Shaffer AM, Watanabe N, Kaneko S, Nakabayashi T, Dan T, Hirayama N, Vaughan DE, Miyata T, Ando K. TGF- $\beta$ -induced intracellular PAI-1 is responsible for retaining hematopoietic stem cells in the niche. *Blood.* 2017 Nov 23;130(21):2283-2294. doi: 10.1182/blood-2017-02-767384 (査読有り) .

3: Matsuzawa H, Matsushita H, Yahata T, Tanaka M, Ando K. Comparison of the Gene Expression Profiles of Human Hematopoietic Stem Cells between Humans and a Humanized Xenograft Model. *Tokai J Exp Clin Med.* 2017 Apr 20;42(1):41-51 (査読有り) .

4: Muguruma Y, Hozumi K, Warita H, Yahata T, Uno T, Ito M, Ando K. Maintenance of Bone Homeostasis by DLL1-Mediated Notch Signaling. *J Cell Physiol.* 2017 Sep;232(9):2569-2580. doi: 10.1002/jcp.25647 (査読有り) .

5: Shimada S, Nunomura S, Mori S, Suemizu H, Itoh T, Takabayashi S, Okada Y, Yahata T, Shiina T, Katoh H, Suzuki R, Tani K, Ando K, Yagita H, Habu S, Sasaki E, Kametani Y. Common marmoset CD117+ hematopoietic cells possess multipotency. *Int Immunol.* 2015

Nov;27(11):567-77. doi:  
10.1093/intimm/dxv031 (査読有り) .

[学会発表] (計 4件)

1: Yahata T, Ibrahim AA, Miyata T, Ando K.  
G-CSF-induced cAMP-PKA-CREB pathway  
counteracts TGF- $\beta$  -PAI-1  
signaling-dependent retention of HSCs in  
the niche 59th American Society of  
Hematology Annual Meeting and Exposition,  
2017年12月

2: Yahata T, Ibrahim AA, Miyata T, Ando K.  
G-CSF-induced cAMP-PKA-CREB pathway  
counteracts TGF- $\beta$  -PAI-1  
signaling-dependent retention of HSCs  
第79回日本血液学会学術集会, 2017年10  
月

3: Yahata T, Ibrahim AA, Miyata T, Ando K.  
TGF- $\beta$  induced intracellular PAI-1 is a  
critical regulator HSC localization in  
the niche 第78回日本血液学会学術集会  
2016年10月

4: Yahata T, Ibrahim AA, Miyata T, Ando K.  
TGF- $\beta$  induced intracellular PAI-1 is a  
critical regulator HSC localization in  
the niche, The 14th Stem Cell Research  
Symposium, 2016年6月

[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 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

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

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

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

宮田敏男 (MIYATA, Toshio)  
東北大学大学院・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 10222332

アブドゥル・アジズ  
(IBRAHIM, Abd Aziz)  
東海大学・医学部・特定研究員 (PD)  
研究者番号 : 50738789

(4) 研究協力者  
( )