

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08654

研究課題名(和文) 骨髄微小環境内に残存する治療抵抗性白血病細胞の分子病態と測定システムの開発

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of refractory leukemia cells in the bone marrow microenvironment

研究代表者

宮地 勇人 (MIYACHI, Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196

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)：本研究では、骨髄微小環境内に残存する治療抵抗性白血病細胞の分子病態と測定指標の開発を目的とした。FLT3-ITD導入した株化培養白血病細胞K562細胞は、細胞外マトリックス構成成分との特異的な接触でAra-C耐性が増強した。内在性にFLT3-ITDを有する2種の骨髄性白血病細胞(MOLM-14、MV4:11)でも同様であった。関連遺伝子として、ファイブロネクチンやその受容体をコードする遺伝子の発現上昇が確認された。これらの結果は、FLT3-ITDを有するAML細胞が治療後残存し治療抵抗性を獲得する分子メカニズムの一部と考えられ、診断・モニタリング法さらに治療法の開発に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify molecular mechanisms of refractory leukemia cells in the bone marrow microenvironment. When FLT3-ITD positive leukemia cell lines (either exogenous or endogenous, K562 or MOLM-14, MV4:11, respectively) were cultured in the presence of components of extracellular matrix, such as fibronectin, of the bone marrow microenvironment, Ara-C resistance was significantly and specifically enhanced. Genes coding fibronectin or its receptor are increased in the expression at the interaction. These findings would be a part of molecular mechanisms of refractory leukemia cells in the bone marrow microenvironment after chemotherapy. The involved genes and signals would contributory to biomarkers relevant for diagnosis and monitoring the disease.

研究分野：分子薬理腫瘍学

キーワード：白血病 治療抵抗性 抗がん剤 骨髄微小環境 FLT3-ITD 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) の治療後は、染色体・遺伝子異常によって規定される。しかしながら、予後良好な染色体異常においても治療抵抗性の症例が少なからず存在する。fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) 遺伝子の internal tandem duplication 異常 (FLT3-ITD) は、AML の約 30% に認められ、独立した重要な予後不良因子とされている。我々は、FLT3-ITD を過剰発現させた白血病細胞が、低酸素下で誘導される転写因子 HIF1 を介して核酸アナログ Ara-C に対して耐性を獲得することを明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 2009;390:1001)。治療後に残存する白血病細胞は抗がん剤による細胞アポトーシスから逃れて再び増殖し再発の原因となることが報告されつつある。これらの結果は、低酸素状態にある骨髄において、細胞増殖を標的とする抗がん剤に耐性となる可能性を示唆している。白血病幹細胞が骨髄微小環境と接触する上で重要なインテグリンに関して、細胞内シグナルは、主に結合するインテグリン関連キナーゼのカスケードとして、PDK1、Akt、Rictor、Src、NF- κ B、GSK3、AP-1 などの活性化を介して腫瘍細胞の生存に関与する。これらから、インテグリンなどと細胞外環境との相互作用が細胞死からの回避や抗がん剤抵抗性をもたらしている可能性がある。白血病の治療抵抗性において、治療前から存在する自然耐性と治療後に獲得する獲得耐性がある。白血病の初回治療の選択は、その長期予後を改善することから、白血病細胞の発症に関わる遺伝子異常がもたらす自然耐性の分子機構の解明とそれに基づく、耐性状態の評価と克服が治療上の大きな課題である。FLT3-ITD 陽性細胞の治療抵抗性における骨髄微小環境の意義と関連遺伝子とその制御は、治療抵抗性白血病の検査診断、治療選択への応用について早急に明らかにすべき課題である。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄中に残存し再発の原因となる治療抵抗性の AML 白血病細胞における抗がん剤耐性の分子機構を明らかにし、それに基づく耐性の評価指標の開発を目的とした。本研究者の最近の知見に基づき、白血病細胞と骨髄微小環境との相互反応に着目し、骨髄微小環境の構成要素との接触状態での治療抵抗性メカニズムを解明するとともに、既に DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルで明らかとした細胞外マトリックス・間質構成要素・受容体について、予後不良な遺伝子異常 FLT3-ITD を有する白血病細胞を用いて、遺伝子発現異常の産物と結合物質の相互反応が抗がん剤耐性にどのように影響するか、新たなバイオマーカーとしての意義を明らかとし、さらにそれらを指標とした抗がん剤耐性の評価法を確立するこ

とを目的とした。

3. 研究の方法

FLT3-ITD 陽性白血病細胞として、3 種類の株化培養ヒト白血病細胞、すなわち外来性に FLT3-ITD 導入した K562、内源性保有する MOLM-14 および MV4:11 細胞を用いた。骨髄微小環境の要素の細胞外マトリックスとの接触が抗がん剤耐性獲得に果たす役割を明らかにするため、FLT3-ITD 陽性白血病細胞は、様々な培養条件にて抗がん剤感受性試験を行った。細胞外マトリックス構成成分であるファイブロネクチン (FN)、コラーゲン (COL4) などコートしたマイクロウェルプレート、あるいは骨髄由来間質幹細胞との共培養システムにて抗がん剤感受性を MTT アッセイにて評価した。抗がん剤としては、AML 治療の key drug である Ara-C、idarubicin、methotrexate を用いた。AML 細胞における細胞外マトリックス・骨髄間質細胞との相互反応の特異性を確認するため、細胞と細胞外環境の相互反応を抑制する機能性モノクローナル抗体を用いて、抗がん剤への耐性度変化を調べた。

細胞外マトリックス・骨髄間質細胞との相互作用における耐性の分子機構は、耐性細胞から抽出した RNA を用いて、既製の cDNA microarray でスクリーニングした遺伝子の発現についてリアルタイム PCR で定量的測定を行った。

4. 研究成果

本研究では、まず FLT3-ITD を導入した株化培養細胞株をモデル細胞として、細胞外マトリックスとの接触が抗がん剤耐性獲得における役割を明らかにすることを目的とした。FLT3-ITD 陽性白血病細胞は、エレクトロポレーション (Invitrogen Transfection System) により FLT3-ITD を K562 細胞にトランスフェクションし作製した (K562 / FLT3-ITD 細胞)、K562 / FLT3-ITD 細胞は、Ara-C、idarubicin、methotrexate および vincristine などの抗がん剤に対して感受性に明らかな変化はなく、Ara-C に対してモック細胞に比べ有意に高い耐性 (約 10 倍) を示した。FLT3-ITD 陽性株化培養細胞 K562 における、細胞外マトリックス構成成分との接触における抗がん剤感受性変化は、COL4 の存在において明らかな変化はなかった。一方、FN をコーティングした培養プレートにて培養した場合、Ara-C 耐性が有意に増強することが明らかとなった。特異的分子を確認するため、FN 接着を特異的に抑制する抗

1 インテグリン抗体の投与を行ったところ、同一アイソタイプの対照抗体と比較して Ara-C に対する耐性を有意に低下させた。次に、内因性 FLT3-ITD を有する AML 由来株化培養ヒト白血病細胞 (MOLM-14 および MV4:11) において同様の実験を行った。MOLM-14 および MV4:11 細胞において

Ara-C 耐性は, FN の存在下で増強されたが, COL4 では増強されなかった。

分子メカニズムを明らかとするため, FLT3-ITD を導入した培養細胞株 K562 における遺伝子発現について, cDNA microarray 解析による遺伝子発現プロファイルに基づく遺伝子発現の定量的解析を行った結果, ファイブロネクチン遺伝子 (FN) の発現上昇, さらに FN 存在下にて, FN をリガンドとする受容体遺伝子発現上昇が確認された。

以上より, FLT3-ITD 陽性の AML の治療抵抗性の機序として, 骨髄微小環境の細胞外マトリックス要素のファイブロネクチンを介した抗がん剤耐性の増強が示唆された。これらの結果は, FLT3-ITD を有する AML 細胞が治療後骨髄に残存し治療抵抗性を獲得する分子メカニズムの一部を説明するものと考えられる。これらの関連分子は, 治療抵抗性 AML 細胞のバイオマーカーとして, 診断・モニタリング法さらに治療法の開発に貢献しうると考えられる。

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 1 件)

1, 小見山 智義、小倉淳、広川貴次、繆之景、神口 浩、浅井 さとみ、宮地 勇人、小林 広幸. Analysis to Estimate Genetic Variations in the Idarubicin-Resistant Derivative MOLT-3, International Journal of Molecular Sciences, 18(1), 12 (2017 年 1 月) (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Anar Damdinsuren, Satomi Asai, Hayato Miyachi. The role of the stromal cells in the chemotherapy resistance in AML with RTK mutation. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM 2017), 2017 年 11 月 (京都) (査読有)

2. ツェベグジャブ バヤルハット、ダムディンスレン アナラ、浅井 さとみ、宮地 勇人、Fibronectin mediates Ara-C resistance in FLT3-ITD leukemia. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会. 2017 年 11 月 (京都) (査読有)

3. ダムディンスレンアナラ、松下 弘道、浅井 さとみ、宮地 勇人. Generation of the leukemic cell line models with common KIT mutations. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会. 2016 年 9 月 (神戸) (査読有)

4. ラハースレン ネメフバートル、アナラ ダムディンスレン、伊藤 誠敏、塚本 秀雄、浅井 さとみ、松下 弘道、宮地 勇人. Differential expression analysis of proteome and transcriptome in FLT3-ITD positive leukemia cells. 第 62 回 日本臨床検査医学会学術集会. 2015 年 11 月 (岐阜). (査読無)

5. アナラ ダムディンスレン、松下 弘道、伊藤 誠敏、田中 政之、金 貴蘭、塚本 秀雄、浅井 さとみ、安藤 潔、宮地 勇人. RUNX3 in FLT3-ITD-induced Ara-C resistance. 第 62 回 日本臨床検査医学会学術集会. 2015 年 11 月 (岐阜). (査読あり)

6. Anar Damdinsuren, Hiromichi Matsushita, Masatoshi Ito, Masayuki Tanaka, Guilan Jin, Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Kiyoshi Ando Hayato Miyachi. RUNX3 is prerequisite for FLT3-ITD-induced Ara-C resistance in leukemic cells. 第 77 回 日本血液学会学術集会. 2015 年 10 月 (金沢). (査読有)

7. Anar Damdinsuren, Hiromichi Matsushita, Masatoshi Ito, Masayuki Tanaka, Guilan Jin, Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Kiyoshi Ando Hayato Miyachi. Molecular mechanisms of refractoriness in leukemia. the 3rd Asian Clinical Congress (ACC3) in Tokyo. 2015 年 9 月 (東京) (査読無)

8. Lkhaasuren Nemekhbaatar, Anar Damdinsuren, Masatoshi Ito, Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Hiromichi Matsushita, Hayato Miyachi. Comparative analysis of proteome and transcriptome in FLT3-ITD transducer leukemic cells. 第 22

回 日本遺伝子診療学会大会. 2015 年 7 月
(横浜). (査読無)

9. Anar Damdinsuren, Hiromichi Matsushita,
Masatoshi Ito, Masayuki Tanaka, Guilan Jin,
Hideo Tsukamoto, Satomi Asai, Kiyoshi Ando,
Hayato Miyachi. Microarray gene expression
profiling of the FLT3-ITD-transduced
leukemic cells.

第22回 日本遺伝子診療学会大会. 2015年7
月(横浜). (査読無)

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 勇人 (MIYACHI Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：

20174196

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

1. アナラ ダムディンスレン (Anar
DAMDINSUREN)、東海大学・医学部・研究員

2. ラハースレン ネメフバータル
(Lkhaasuren NEMEKHBAATAR)、東海大学・
医学部・研究員

3. ツェベグジャブ バヤルハット (Bayarbat
TSEVEGJAV)、東海大学・医学部・研究員