

令和元年6月26日現在

機関番号：84306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07171

研究課題名(和文) 低酸素環境に潜むCML幹細胞の動態解明に基づく革新的な分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative molecular targeted therapeutics based on elucidation of dynamics of CML stem cells in hypoxic environment

研究代表者

前川 平 (MAEKAWA, TAIRA)

京都府保健環境研究所・その他部局等・所長

研究者番号：80229286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(CML)は、チロシンキナーゼ阻害剤によって無治療寛解や治癒を目指す時代となり、CML幹細胞の根絶が喫緊の課題となっている。かつてCML治療の第一選択薬として用いられていたinterferon (IFN)- γ は一部の症例で細胞遺伝学的効果をもたらすにも関わらず、その作用機構は不明であった。我々は「幹細胞性」を有する低酸素適応CML細胞株および患者細胞を用い、低酸素環境に潜むCML幹細胞の動態の解明を試みた。その結果、IFN- γ がBCR-ABLと協調して転写因子C/EBP β を活性化し、CML幹細胞の骨髄球系細胞への分化とそれによる枯渇を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性骨髄性白血病の実験動物モデル及び患者から提供を受けた白血病細胞を用いて検討し、インターフェロンが白血病の原因遺伝子と協調して働き、白血病幹細胞の枯渇を誘導することがわかりました。白血病幹細胞は、白血病の治療抵抗性や再発の原因となると考えられており、本研究成果は一部の白血病においてインターフェロンを工夫して投与することによって治療成績がさらに改善する可能性を示唆するものです。

研究成果の概要(英文)：Chronic myelogenous leukemia (CML) has become an era of therapeutic remission and cure with tyrosine kinase inhibitors, and eradication of CML stem cells has become a pressing issue. Interferon (IFN)- γ , which was once used as a first-line drug for CML treatment, has unknown mechanisms of action despite its cytogenetic effects in some cases. We attempted to elucidate the dynamics of CML stem cells in a hypoxic environment using hypoxic-adapted CML cell lines and patient cells that are "stem-like". As a result, it was revealed that IFN- γ cooperates with BCR-ABL to activate the transcription factor C/EBP β and induce the differentiation of CML stem cells into myeloid cells and their depletion.

研究分野：血液内科学

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 インターフェロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病(CML)は、好中球や好塩基球など骨髄球系細胞の増多を特徴とする慢性期を経過し、放置すれば急性白血病の像を呈し極めて予後不良の転機を辿る。CMLは9番染色体と22番染色体の相互転座(Ph染色体)により生じたBCR-ABL融合蛋白質のチロシンキナーゼ活性によって造血幹細胞の中で様々な分子が活性化されていることが主たる病因である。歴史的にCMLに対する治療薬として長く用いられていたbusulfanやhydroxyureaは、白血球数のコントロールが主目的であり、急性期への進行を抑制することは困難であった。1980年代にCMLに対する治療薬として脚光を浴びたのがInterferon- α (IFN α)である。IFN α は血液学的な改善のみならず、一部の症例でPh染色体を消失させるという画期的な効果が認められた。このことからCML治療の第一選択薬となっていたが、その作用機序は必ずしも明らかではなかった。

2. 研究の目的

CMLは、チロシンキナーゼ阻害剤(Tyrosine kinase inhibitor : TKI)によって無治療寛解や治癒を目指す時代となり、CML幹細胞の根絶が喫緊の課題となっている。かつてCML治療の第一選択薬として用いられていたIFN α は一部の症例で細胞遺伝学的効果をもたらすにも関わらず、その作用機構は不明であった。CML前駆細胞はBCR-ABL依存性増殖相にあり、TKIの標的となり消滅する。一方、CML幹細胞はBCR-ABL非依存性に生存し、TKIの標的となることから逃れている。またCML幹細胞は低酸素環境下に潜み、過酷な低酸素環境に適応して生存するため自らの代謝を改変している。今までの研究で、「幹細胞性」を有する低酸素適応CML細胞株ではC/EBP β の発現低下を認めた。従ってBCR-ABLを介さずC/EBP β の発現を増強してGo期にあるCML幹細胞を細胞周期に導入させ、BCR-ABL依存性の増殖相に誘導すれば、TKIの標的にできると考えた。低酸素環境に潜むCML幹細胞の動態解明に基づき、CML幹細胞の殲滅を目指した革新的な分子標的治療法を開発するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- a) CML幹細胞特異的代謝経路を阻害する臨床応用可能な物質の探索：作製した高度の低酸素条件(1% O₂)に適応し増殖可能となった種々のCML-HA (hypoxia adapted) 亜株の代謝学的な変化を明らかにし、臨床応用可能な誘導体を開発する。
- b) 低酸素環境におけるC/EBP β 発現制御とCML幹細胞の動態：CML-HA細胞株を用い、またマウス細胞株32DやC/EBP β -KOマウス(conditional C/EBP β -KOマウスでの検討も考慮する)由来の骨髄細胞でのBCR-ABL過剰発現系を作製し、BCR-ABL制御下および非制御下でのC/EBP β の低酸素環境における発現動態を*in vitro*で検討する。
- c) C/EBP β の発現を増強させる方法の開発：CML-HA細胞株を用いてBCR-ABL非依存的にC/EBP β の発現を増強させる方法を検討する。CMLモデルマウスを用いた*in vivo*での検討も行う。

4. 研究成果

a) BCR-ABL による緊急時顆粒球造血制御機構の活性化

従来から、我々は感染症などのストレスに反応して好中球が増える、いわゆる“緊急時顆粒球造血(emergency granulopoiesis)”の状態では、CCAAT/Enhancer Binding Protein ファミリーに属する転写因子 C/EBP β が造血幹・前駆細胞の増殖・分化の制御において重要な働きをしていることを見出していた。急性の細菌感染症などで認められる好中球増多は時に類白血病反応と呼ばれるように、慢性期の CML で観察される好中球を中心とした骨髓球系細胞の増多と類似している。そこで CML における C/EBP β の機能的意義について検討したところ、BCR-ABL が下流の STAT5 を介して C/EBP β を活性化し、白血球増加をもたらしていること、C/EBP β は白血病幹細胞が分化して枯渇する方向に作用することを明らかにした。これらの結果から、薬剤によって C/EBP β をさらに活性化することができれば、CML 幹細胞の枯渇を強力に誘導することができ、最終的には根絶できるのではないかと考えた。すなわち、BCR-ABL は C/EBP β を介して緊急時顆粒球造血の経路を活性化し、慢性期の病態を形成しているが、逆にこれがアキレス腱になるのではないかと着想した。

b) IFN α による C/EBP β の制御

さまざまな化学物質、生理活性物質を検討したところ、驚くべきことに従来 CML の治療に用いられてきた IFN α が効率よく C/EBP β の発現を亢進させることが判明した。まず、我々は次世代シーケンスを用いた解析によって、C/EBP β 遺伝子の 3'側に約 75 kb 離れたところにタンデムに並んだ STAT5 の結合配列を含む領域が存在し、同部位には BCR-ABL 依存性に STAT5 が結合することを見出した。この領域は動物種をこえて保存されており、BCR-ABL 依存性に活性化型エンハンサーのマークである H3K27Ac が結合すること、ゲノム編集技術を用いてこの配列を特異的にマスクしたり削除したりすると BCR-ABL 依存性の C/EBP β の活性化が抑制されることから、新規のエンハンサーであることが判明した。CML 幹細胞のモデルを用いて検討したところ、IFN α はこれまでに知られていた STAT1 のみならず STAT5 も活性化していた。上記で同定した新規エンハンサー部位には、IFN α によって活性化された STAT5 とともに STAT1 も結合して C/EBP β の発現亢進をもたらし、この作用は BCR-ABL と相加的であることが明らかとなった。

c) IFN α による CML 幹細胞の枯渇誘導

細胞株を用いた *in vitro* 及びマウスモデルを用いた *in vivo* の実験によって検討したところ、IFN α は CML 幹細胞を分化させることによって枯渇を誘導し、その作用は C/EBP β に依存していた。したがって、IFN α は C/EBP β の活性化を通じて CML 幹細胞の分化・枯渇を誘導していることになる。CML 幹細胞は正常の造血幹細胞と多くの性質を共有している。骨髓の微小環境中で休眠状態の正常造血幹細胞も IFN α によって細胞周期が活性化されることが知られているため¹¹⁻¹³⁾、IFN α の正常造血幹細胞に及ぼす作用を検討したところ、正常造血幹細胞でも C/EBP β 依存性に分化・枯渇が誘導された。しかし、興味深いことに *in vivo* の実験から正常造血幹細胞に比して CML 幹細胞は IFN α に対する感受性が高いということが判明した。これは、上述のように CML 幹細胞では、BCR-ABL に

よる STAT5 の活性化と IFN α による STAT1 および STAT5 の活性化が相加的に作用して、正常造血幹細胞と比してより高いレベルの C/EBP β 発現を誘導することが理由と考えられた。このような IFN α の CML 幹細胞の枯渇誘導作用は、CML 患者検体でも認められた。CML 患者由来の CD34 陽性幹細胞分画は、IFN α 添加によって C/EBP β の発現亢進と、それに伴う骨髓球系分化の促進、コロニー形成数の減少が確認された。以上の結果から、IFN α による CML の治療効果の少なくともその一部は、C/EBP β の活性化を介した CML 幹細胞の分化とそれによる枯渇の誘導によると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Yokota A, Hirai H, Shoji T, Maekawa T, Okuda K. : Constitutively active ABL family kinases, TEL/ABL and TEL/ARG, harbor distinct leukemogenic activities in vivo. *Leukemia*, 31(12):2742-2751, 2017. doi: 10.1038/leu.2017.114.
2. Tamura A, Hirai H, Yokota A, Kamio N, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, Torikoshi Y, Miura Y, Tenen DG, Maekawa T: C/EBP β is required for survival of Ly6C-monocytes. *Blood*, 130(16):1809-1818, 2017.
3. Yokota A, Hirai H, Sato R, Adachi H, Sato F, Hayashi Y, Sato A, Kamio N, Miura Y, Nakano M, Tenen DG, Kimura S, Tashiro K, Maekawa T.: C/EBP β is a critical mediator of IFN- α -induced exhaustion of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood Adv.* 2019 Feb 12;3(3):476-488. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020503.

[学会発表] (計 8 件)

1. 横田明日美, 平位秀世, 林 慶紘, 前川 平: 慢性骨髄性白血病の病態形成における転写因子 C/EBP β の機能. 第 20 回造血器腫瘍研究会(千葉) 平成 28 年 2 月 12 日(2016)
2. Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Sato R, Adachi H, Sato F, Sato A, Tamura A, Miura Y, Nakano M, Tashiro K, Maekawa T: The C/EBP β transcription factor promotes exhaustion of CML stem cells in response to interferon- α . [Abstract #E-2040] The 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association 第 75 回日本癌学会 学術総会 (横浜) 平成 28 年 10 月 7 日 (2016)
3. Yokota A, Hirai H, Sato A, Tamura A, Shoji T, Kashiwagi T, Fujishiro A, Iwasa M, Miura Y, Hayashi Y, Maekawa T : The C/EBP β transcription factor mediates exhaustion of CML stem cells induced by IFN α . [Abstract #PL-4] The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 第 78 回日本血液学会学術総会 (横浜) 平成 28 年 10 月 14 日 (2016)
4. Sato A, Hirai H, Yokota A, Tamura A, Shoji T, Kashiwagi T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Ando A, Maekawa T : Stress-induced translational alteration of C/EBP β isoforms regulates the behavior of HSPCs. [Abstract #OS-1-142] The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 第 78 回日本血液学会学術総会 (横浜) 平成 28 年 10 月 13 日 (2016)
5. 佐藤淳至, 平位秀世, 横田明日美, 前川 平: C/EBP β のアイソフォームと造

- 血幹細胞制御.第 21 回造血器腫瘍研究会(熊本) 平成 29 年 2 月 17 日(2017)
6. Yokota A, Hirai H, Sato A, Hayashi Y, Miura Y, Kimura S, Maekawa T: Exhaustion of CD34+ CML-CP stem cells is induced by IFN α through upregulation of C/EBP β . [Abstract# P-2243] The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 平成 29 年 9 月 29 日 (2017)
 7. 平位秀世, 横田明日美, 前川平: 慢性骨髄性白血病の進展における C/EBP β の機能解明平成 29 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点成果発表会(金沢市) 平成 29 年 10 月 26 日(2017)
 8. 田村彰広, 平位秀世, 横田明日美, 神尾尚馨, 佐藤淳至, 庄司月美, 柏木隆宏, 鳥越勇佑, 三浦康生, Tenen DG, 前川平: C/EBP β は Ly6C-単球の生存に必須である. 第 14 回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾)(東京) 平成 30 年 6 月 30 日 (2018)

[図書] (計 1 件)

1. Maekawa T: Therapies targeting leukemic stem cells, p. 343-361, *In* Chemotherapy for leukemia - novel drugs and treatment (ed. Ueda T), pp. 361, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017 doi: 10.1007/978-981-10-3332-2

[産業財産権]

なし

[その他]

- 1 Web 記事 (2019 年 4 月 6 日、京都大学ホームページ)
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190402_1.html
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/documents/190402_1/01.pdf
2. 新聞記事 (2019 年 5 月 30 日、京都新聞夕刊、7 版 008 頁)「慢性骨髄性白血病 治療仕組み一端を解明 京大グループ」

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平位秀世

ローマ字氏名：HIRAI, Hideyo

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：50315933

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。