

令和元年6月17日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18205

研究課題名(和文) スフィンゴミエリン合成酵素欠損による急性骨髄性白血病進行の抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the involvement of sphingomyelin synthase in acute myeloid leukemia progression

研究代表者

谷口 真 (TANIGUCHI, Makoto)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：30529433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病は、遺伝子異常により骨髄系の造血細胞ががん化する疾患であり、宿主は腫瘍免疫の働きによりがん細胞を排除する機構が備わっているが、逆にがん細胞は腫瘍免疫を抑制して悪性化する。スフィンゴミエリンは、細胞脂質二重膜の主要構成脂質であり、液性因子によるシグナル伝達や細胞間接着を制御し、炎症などにより活性化する免疫応答に関与するが、腫瘍免疫や腫瘍免疫抑制との関連は不明である。本研究では細胞膜スフィンゴミエリンの合成を担うスフィンゴミエリン合成酵素を欠失することで腫瘍免疫が活性化し、急性骨髄性白血病を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はスフィンゴミエリン合成酵素の欠損により腫瘍免疫の活性化を介して急性骨髄性白血病が抑制されることから、スフィンゴミエリン合成酵素ががん抑制の標的となり得ることを示唆しており、がんの治療法の開発へと繋がる研究基盤となることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia (AML) is the cancer of hematopoietic myeloid cells induced by genomic mutation. Organisms eliminates cancer cells through activation of tumor immunity. However, cancer cells also have the ability of cancer immunoediting and suppress tumor immunity cells. Sphingomyelin (SM) is the main constitution of lipid bilayer membrane and regulates the signal transduction through affecting ligand-receptor association or cell-cell adhesion, which are involved in the inflammatory and its-mediated immune responses. However, it is unclear that the involvement of SM and SM production by SM synthase (SMS) in the regulation of tumor immunity or cancer immunoediting. In this study, I showed that deficiency of SMS suppresses AML through activation of tumor immunity.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴミエリン スフィンゴミエリン合成酵素 急性骨髄性白血病 腫瘍免疫 スフィンゴ脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) は、骨髄系造血前駆細胞が染色体・遺伝子異常により腫瘍化し、分化・成熟能を失うとともに異常増殖を起こす疾患である。生体では体内で発生した AML などの腫瘍細胞を排除するために、CD8<sup>+</sup> T 細胞 (細胞障害性 T 細胞、CTL) やナチュラルキラー (NK) 細胞、NK-T 細胞などの宿主の腫瘍免疫細胞が活性化されるが、近年、AML をはじめとする腫瘍細胞は制御性 T 細胞 (T-reg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) などを活性化することで、宿主の腫瘍免疫細胞を抑え、がんの悪性化が進むことが知られている (Science.331:1565-1570,2011)。こうした腫瘍免疫抑制効果は腫瘍細胞からの種々のサイトカインやケモカインが宿主細胞に作用することにより引き起こされる。

スフィンゴミエリン (SM) は細胞脂質二重膜の主要構成脂質であり、サイトカインやケモカインなどのリガンド-受容体シグナルを制御し、細胞増殖、分化、遊走などの細胞機能を制御する (BBA. 1841:692-703,2014)。細胞膜 SM は SM 合成酵素 (SMS) によりセラミドとホスファチジルコリンからゴルジ体で合成された後、形質膜を含む細胞膜へと輸送される。SMS にはゴルジ体に局在する SMS1 とゴルジ体および形質膜に局在する SMS2 があるが、その SM 合成での違いは不明である。これまでに、SMS1 が合成する SM は、トランスフェリン (Tf) -Tf 受容体による細胞増殖に、SMS1 および SMS2 の SM 合成がケモカイン CXCL12-CXCR4 受容体シグナル誘導性の細胞遊走抑制などに関与することが細胞レベルで知られているだけでなく、SMS 欠損マウスを用いた解析から、SMS1 欠損によって日本脳炎ウイルスの細胞への接着が低下し感染が抑制されること (Sci Rep.6:37829,2016) や CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化が抑制され、炎症性免疫応答が低下する (Int Immunol.24:327-337,2012) ことが報告されている。また SMS2 欠損では、LPS 刺激によるマクロファージの活性化が抑制され、炎症応答が低下する (Am J Physiol.300:L430-440,2011) ことが報告されている。以上のことから、SMS および SM は炎症性免疫細胞の活性化やサイトカイン・ケモカイン応答に関与されていることは明らかであるが、AML における腫瘍免疫や腫瘍免疫抑制やこれらの機能を誘導するサイトカイン・ケモカイン応答、また AML の悪性化との関連については明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では骨髄細胞へ AML の原因遺伝子である MLL-AF9 を導入し、骨髄移植することで AML を発症する AML モデルを利用し、SMS 欠損マウスにおける AML の病態および腫瘍免疫への影響を調べることで、宿主の SM および SMS の AML への役割を明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、AML モデルマウスを作成し、AML に対する腫瘍免疫、AML から受ける腫瘍免疫抑制作用および AML による病態について野生型および SMS 欠損マウスで比較した。

### (1) AML モデルの作製

野生型マウスの骨髄細胞を採取後、AML の原因遺伝子である MLL-AF9 をレトロウイルスで導入し、致死量の放射線照射 (10Gy) を行った野生型マウスへ正常骨髄細胞とともに移植を行った。この移植マウスをドナーとし、繰り返し骨髄採取-移植を繰り返すことで、無放射線照射での骨髄移植により AML を発症し、2~3 週で致死となる AML モデルマウスを作製した (図 1)。また、AML 細胞のマウス内での増加を *in vivo* imaging できるように MLL-AF9 レトロウイルスに加え、Luciferase 遺伝子をもつ AML-Luc モデルを作製し、IVIS により *in vivo* imaging を行った。

### (2) AML モデルマウスの病態解析

上記の MLL-AF9 レトロウイルスは GFP 遺伝子を有しており、AML 細胞 (MLL-AF9<sup>+</sup>; GFP<sup>+</sup>) はフローサイトメトリーや蛍光顕微鏡で検出することが可能である。野生型 (WT) および SMS2 欠損 (SMS2-KO) マウスへ 4~5 x 10<sup>5</sup> AML 細胞を移植後、生存を追うと同時に解析時には麻酔下で採血、血算を測定し、赤血球、白血球、血小板数などを調べた。また、安楽死後に脾臓および骨より脾臓細胞および骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーにより AML 細胞の割合を調べた。また、同時に AML の病態の指標の一つである脾腫を観察した。

### (3) 腫瘍免疫細胞および腫瘍免疫抑制細胞の解析

上記の AML モデルマウスから採取した脾臓細胞および骨髄細胞を以下の抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。腫瘍免疫細胞では CD4, CD8, CD3 および NK1.1 で染色し、CTL (CD8<sup>+</sup>; CD4<sup>-</sup>; CD3<sup>+</sup>)、NK 細胞 (CD3<sup>+</sup>; NK1.1<sup>+</sup>)、NK-T 細胞 (CD3<sup>+</sup>; NK1.1<sup>+</sup>) として検出した。腫瘍免疫抑制細胞では、Treg 細胞 (CD4<sup>+</sup>; CD25<sup>+</sup>; FOXP3<sup>+</sup>) または MDSC (Ly6G<sup>+</sup>; Ly6C<sup>+</sup>; CD11b<sup>+</sup>) を検出した。また、CTL の活性化は CD107a の膜表面への露出の増加を指標にした。

### (4) 骨髄移植により作製したキメラマウスでの AML モデル

WT または SMS2-KO マウスより採取した骨髄細胞を致死量の放射線照射 (9.5 Gy) した

WTまたはSMS2-KOマウスへ移植(1 x 10<sup>6</sup>細胞/マウス)し、キメラマウスを作製した。キメラ作製は、生存および尾から抽出したゲノムDNAを用いたgenotypingから確認した。骨髄移植後60~80日後にAMLを移植し、その生存を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) AMLモデルマウスの改変

従来のMLL-AF9 AMLモデルでは、正常マウスより採取した骨髄細胞へMLL-AF9を導入し、致死量放射線照射を行ったレシピエントマウスへ正常骨髄細胞とともにMLL-AF9導入細胞を移植する(Nature.442:818-822,2006)。しかし、この方法ではAMLモデルを作製するたびにレトロウイルスを感染させ、また発症まで数か月かかることもあり、感染効率などの問題から安定したAMLモデルの作製が難しい。そこで申請者は、初めのAMLモデルをドナーとして、レシピエントマウスの放射線照射量を徐々に減少させることで、無放射線照射下で生着し、2~3週間で致死となるAMLモデルを作製することに成功した。本AML細胞移植では、AMLの病態である、脾臓の肥大(脾腫)、白血球数の増加、赤血球・血小板の減少、が確認でき、末梢血、脾臓細胞および骨髄細胞でのAML+GFP+細胞の増加が確認された。以上から本モデルの作製により安定的にAMLを発症するモデルマウスが供給可能となった(図1)。

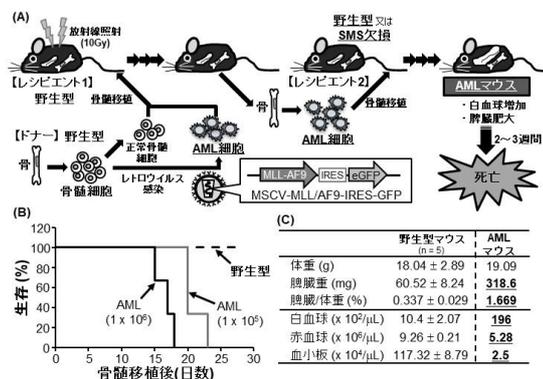


図1 急性骨髄性白血病(AML)マウスの作製

ドナーマウスの骨髄細胞へAML原因遺伝子MLL/AF9を導入後、レシピエントマウスへ骨髄移植を行う。その後、骨髄移植を繰り返すことで、AMLモデルを樹立した(A)。AMLマウスは、移植後15日から生存が低下し(B)、脾臓肥大、白血球数増加、赤血球・血小板数減少などの白血病の病態が観察される(C)。

##### (2) SMS2-KOマウスにおける生存延長とAML抑制

上記で作製したAML細胞をWTおよびSMS2-KOマウスへ移植したところ、WTマウスでは移植後18日以降から31日までに全滅(n=16)したが、SMS2-KOマウスでは31日目で80%が生きていた(n=13)。また、約50%のマウスがその後40日を超えて生存した。そこでAML移植後5日、10日、15日でのWTおよびSMS2-KOマウスの骨髄および脾臓のAML細胞の割合を調べたところ、10日目まではWTとSMS2-KOで有意差なくAML細胞が増加していたが、15日目にはWTマウスではさらにAML細胞が増加していたにもかかわらず、SMS2-KOマウスではAML細胞が減少または消失していた。また、それに伴ってAMLの病態である脾腫、白血球の増加、血小板減少もSMS2-KOでは抑制されており、明らかにAMLの病態も抑えられていた。このSMS2-KOでのAML細胞の減少をさらに確認するため、AML-Lucを用いたin vivo imagingを行ったところ、WTマウスでは日を追うごとに増加したが、SMS2-KOマウスではやはり減少していた。以上の結果から、SMS2-KOマウスではAMLを排除する機構が活性化していることが示唆された。

##### (3) SMS2-KOマウスでの腫瘍免疫活性化

SMS2-KOマウスではAMLの排除機構が活性化されていることが示唆されたため、AML移植後の腫瘍免疫細胞および腫瘍免疫抑制細胞の増加および活性化について検討した。AML移植後10日における骨髄中のT細胞およびNK細胞を調べたところ、WTマウスにおいても正常マウスに比べ、腫瘍免疫に働くCTL細胞の割合が増加していたが、興味深いことにSMS2-KOマウスではWTのAMLマウスに比べ有意にCTL細胞の割合が増加した。他方、NKおよびNK-T細胞の有意な増加は認められず、SMS2-KOマウスではCTLが活性化してAMLを排除していることが示唆された。そのCTLの活性化をCD107aにより検出したところ、SMS2-KO-AMLのCTL細胞のCD107aの割合がWTに比べ増加しており、SMS2-KOではより強くCTLが活性化していた。また、これらのCTLをセルソーターで分取し、活性化のマーカーであるインターフェロンγ(IFN-γ)の発現上昇をリアルタイムPCRにより確認したところ、正常マウスのCTLに比べ、AML移植後のWTおよびSMS2-KOマウスのCTLではIFN-γ発現も増加しており、このCTLに抗腫瘍活性があることが示された。他方、脾臓におけるTreg細胞を確認したところ、WTおよびSMS2-KOにおいて差は見られなかったが、MDSCではSMS2-KOマウスでは有意に減少しており、SMS2-KOマウスでは腫瘍免疫抑制機構も抑制されていることが示唆された。

##### (4) SMS2-KO由来骨髄細胞移植によるAML生存延長

上記の結果から、SMS2-KOのCTL活性化がAMLを抑制していることが示唆されたため、SMS2-KOマウスの骨髄移植がAML抑制に効果があるかを検討した。まず、WTおよびSMS2-KOマウスへ過性の骨髄抑制がおこる低用量の放射線照射(4.5 Gy)を行い、AMLを移植したところ、SMS2-KOマウスでもWTと同様に移植後16日までで全滅し、SMS2-KOマウスでの生存延長が抑制された。そこで、WTまたはSMS2-KOのキメラマウスを作製し、AML移植を行った。興味深いことに、SMS2-KO骨髄を移植したWTマウスではWT骨髄移植を受けたWTマウスに比べ有意に生存が増加したとともに、WT骨髄を移植されたSMS2-KO

マウスでは逆に生存が短縮された。以上のことから、SMS2-KO マウスからの骨髄移植が AML 抑制に効果があることが示唆された。

本研究から、SMS2 の抑制により AML が抑制できることが示唆され、AML をはじめとしたがん抑制のために SMS2 が標的となることが期待できる。しかしながら、まだ SMS2 および SM を介した CTL の活性化の分子メカニズムは分かっていないため、今後のさらなる研究が必要である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ohnishi T, Hashizume C, Taniguchi M, Furumoto H, Han J, Gao R, Kinami S, Kosaka T, Okazaki T. Sphingomyelin synthase 2 deficiency inhibits the induction of murine colitis-associated colon cancer. *FASEB J.* 31, 3816-3830, 2017. (査読あり)

Wang M, Uchiumi O, Ogiso H, Shui Y, Zou J, Hashizume C, Taniguchi M, Okazaki T, Kato N. Stressful learning paradigm precludes manifestation of cognitive ability in sphingomyelin synthase-2 knockout mice. *Behav. Brain. Res.* 319, 25-30, 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

谷口 真, 橋爪 智恵子, 上田 善文, 松下 倫子, 長屋 省吾, 小木曾 英夫, 古元 秀洋, 林 一彦, 岡崎 俊朗 “ スフィンゴリエリン合成酵素 2 欠損マウスにおける EL4 リンパ腫浸潤抑制 ” 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回 日本生化学大会), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸 (兵庫県, 神戸市)

谷口 真 “ スフィンゴリエリン合成酵素欠損マウス-動物病態モデルの利用と応用- ” 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回 日本生化学大会), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸 (兵庫県, 神戸市)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

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。