

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16111

研究課題名(和文)疾患由来iPS細胞を応用し同定したADAM8による造血器腫瘍の薬剤耐性機構解明

研究課題名(英文)The significance of ADAM8 on chemoresistance of hematopoietic malignancies

研究代表者

宮内 将(Miyauchi, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40772801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、造血器腫瘍の発症および治療抵抗性におけるADAM8遺伝子の役割を解明し、治療抵抗性造血器腫瘍を克服する新規治療薬開発の端緒とすることである。細胞株を用いた分子生物学的実験による治療抵抗性メカニズムの解明およびデータベースを用いた造血器腫瘍の生存解析を行った。本研究の結果、ADAM8がprotease活性を介して炎症性を修飾することで治療抵抗性に関連していることが示唆された。さらに、ADAM8は悪性リンパ腫の治療抵抗性のみならず一部の急性骨髄性白血病における予後不良集団に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、これまでに知られていなかった造血器腫瘍の治療抵抗性におけるADAM8の役割の一端が明らかとなり、新規の学術的意義を有する。さらにADAM8が代表的な造血器腫瘍である悪性リンパ腫や急性骨髄性白血病の治療抵抗性と関連があることが示唆された。本研究の成果は治療抵抗性に苦しむ造血器腫瘍患者に対する新たな治療法開発の端緒となる可能性があり、社会的にも意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to elucidate the molecular mechanisms of ADAM8-induced chemoresistance in hematological malignancies and to develop the basis of novel therapeutic strategies. In this project, we conduct the molecular biological experiments based on cell lines and survival analysis based on the public databases. This project suggest that ADAM8 modulate the inflammatory signals via the cleavage of inflammatory signal inhibitory receptors, resulting in the involvement in the chemoresistance. Besides, it would also suggest that high expression of ADAM8 is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia, as well as diffuse large B cell lymphoma.

研究分野：血液腫瘍内科学

キーワード：造血器腫瘍 治療抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の多剤併用化学療法・分子標的療法の発展によりがん治療は飛躍的な進歩をとげた。しかしながら、他のがん種と同様に造血器腫瘍にも治療抵抗性の難治症例が存在する。治療的抵抗性症例の克服はがん治療の大きな課題である。

申請者は、疾患由来人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) という新たな技術を応用して、代表的な造血器腫瘍の一つである CML の治療抵抗性 CML 幹細胞の特徴を有した新規疾患モデルを構築した。このモデルを駆使して、治療抵抗性

CML 細胞をマークする全く新たな細胞表面抗原 ADAM8 を同定した (図 1)。ADAM8 が診断時のみならず治療中の CML 患者検体においても治療抵抗性 CML 細胞に対する有効なマーカーであることを示し、得られた知見を世界に先駆けて報告した (図 2)。

治療抵抗性 CML 細胞の追加の解析を進めたところ、診断時の CML 患者検体において ADAM8 をノックダウンすると治療抵抗性が解除されること、ADAM8 の主要な機能である matrix metalloproteinase (MMP) 活性を阻害する薬剤を用いても治療抵抗性が解除されることを明らかとした。これらの結果から、ADAM8 が治療抵抗性 CML 細胞に対するマーカーとしてのみならず、機能的に CML 細胞の治療抵抗性に関わることが示唆された (図 3)。

加えて、他の造血器腫瘍における ADAM8 の役割について検証するため、本邦でのがん罹患率が白血病の約 2 倍である悪性リンパ腫での検討を行うこととした。悪性リンパ腫の約 9 割に達する非ホジキンリンパ腫のうち、30-40%を占める最も発生頻度の多い病型であるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma: DLBCL) に対して標準的多剤併用療法を行った患者群 (n = 53) について解析を行った。遺伝子発現プロファイルと紐付けされたデータベースの解析 (PrognScan) から、ADAM8 高発現症例 (n = 40) と ADAM8 低発現症例 (n = 13) を比較したところ、ADAM8 高発現症例が全生存期間、無増悪生存期間ともに不良であることを明らかとした (図 4)。これらの解析結果から、「ADAM8 が CML のみならず種々の造血器腫瘍の治療抵抗性に機能的に関わる」という着想をもとに本研究を開始した。

図 1

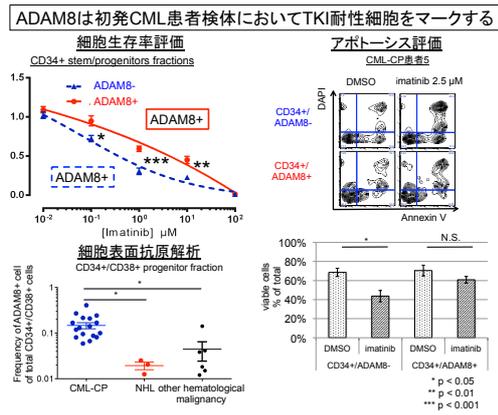


図 2

ADAM8はTKI投与中のCML患者においてもTKI耐性細胞をマークする

| 患者背景 | | | | | |
|----------|--------------------|--------|-----------|-----------|----------------------------------|
| Pt.ID | age (at diagnosis) | sex | treatment | TKI | disease status |
| CML-CP16 | 42 | male | 30 months | dasatinib | MMR (IS% 0.03) |
| CML-CP24 | 67 | female | 6 months | dasatinib | MMR (3-log reduction of BCR-ABL) |
| CML-CP25 | 49 | female | 24 months | imatinib | MUL (undetectable by PCR) |

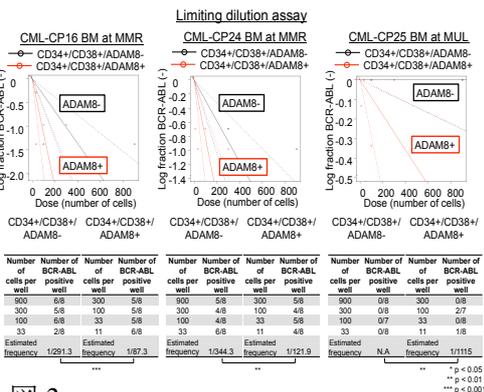
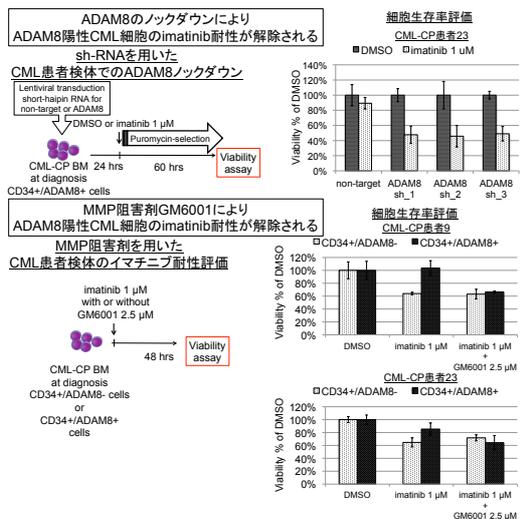


図 3



2. 研究の目的

本研究の目的は、造血器腫瘍の発症および治療抵抗性における ADAM8 遺伝子の役割を解明し、治療抵抗性造血器腫瘍を克服する新規治療薬開発の端緒とすることである。

申請者は、疾患由来 iPS 細胞を応用した新規疾患モデルを駆使し、より直接的な患者検体において治療抵抗性 CML 細胞をマークする全く新たな細胞表面抗原として ADAM8 同定し、その知見を世界に先駆けて報告した。ADAM8 の治療抵抗性造血器腫瘍に関連する報告は我々の知る限り認められず、学術的独自性の強い研究提案といえる。独自の解析により同定した ADAM8 についてさらなる解析を行うことで、ADAM8 が MMP 活性を介して CML の治療抵抗性に関わる機能性の分子であること、ADAM8 が CML のみならず代表的な造血器腫瘍の一つ DLBCL においても治療抵抗性に関わることを示す結果を得た。本研究は、独自の解析で同定した治療抵抗性 CML 細胞のマーカーである ADAM8 に対して、対象疾患の広がりを探求した解析結果に基づく拡張性と分子機能を探求した解析結果に基づく治療応用性を検証する、独自性と創造性を併せ持った研究である。

3. 研究の方法

CML の治療抵抗性に関わる ADAM8 の分子メカニズム解明

CML の治療抵抗性病期 blast crisis (BC) では ADAM8 発現上昇を認めることを患者検体で確認している。CML-BC の細胞株 (K562、KU812、KCL22、NC02、MEG01) において ADAM8 をノックダウンし tyrosine kinase inhibitor (TKI) 感受性を評価する。TKI 感受性が増加すれば、遺伝子解析を追加し治療抵抗性に関与すると考えられる分子メカニズムを探求する。

造血器腫瘍治療抵抗性における ADAM8 の役割の探索

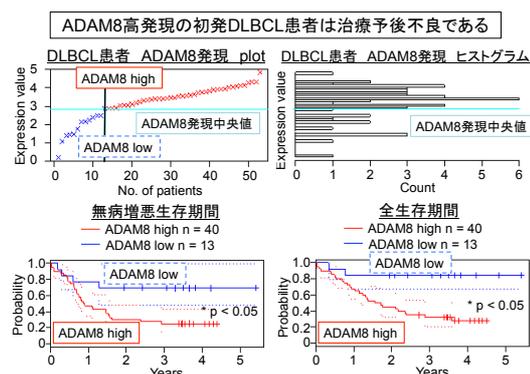
代表的な造血器腫瘍である DLBCL において ADAM8 高発現症例が全生存期間、無増悪生存期間ともに不良であることを明らかとした。他の造血器腫瘍治療抵抗性における ADAM8 の役割を探求するために TCGA 等のデータベースを活用し、各疾患の ADAM8 高発現群と低発現群における全生存期間、無増悪生存期間の比較を行う。

4. 研究成果

CML の治療抵抗性に関わる ADAM8 の分子メカニズム解明においては、CML-BC の細胞株 (K562、KU812、KCL22、NC02) において、K562 で ADAM8 のタンパク質レベルでの発現を確認し、K562 細胞株において ADAM8 をノックダウンしたところ、増殖能が亢進し tyrosine kinase inhibitor (TKI) 感受性が増加することを見出した。遺伝子発現解析の結果 ADAM8 ノックダウンした細胞株において炎症反応に関わるシグナルが減弱していることが示唆された。ADAM8 は重要な炎症性シグナル、IL1 シグナルの阻害性受容体 IL1R2 を分解することが知られており、ADAM8 が protease 活性を介して IL1 シグナルを修飾することで治療抵抗性に関連していることが示唆された。

また、造血器腫瘍の治療抵抗性における ADAM8 の役割をより幅広く解析するために TCGA のデータベースを用いて急性骨髄性白血病患者の予後と ADAM8 の発現量の関連を検討した。その結果 DLBCL 患者群のみならず ADAM8 高発現の AML 患者群で予後が不良な集団が存在することを見出した。これらの結果、ADAM8 が幅広い造血器腫瘍において治療抵抗性に関わることを示唆され

図 4



た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Taoka K, Arai S, Kataoka K, Hosoi M, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Aixinjueluo W, Kobayashi T, Kumano K, Yoshimi A, Otsu M, Niwa A, Nakahata T, Nakauchi H, Kurokawa M. | 4. 巻 8(1) |
| 2. 論文標題 Using patient-derived iPSCs to develop humanized mouse models for chronic myelomonocytic leukemia and therapeutic drug identification, including liposomal clodronate. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Report | 6. 最初と最後の頁 15855 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34193-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮内 将 |
| 2. 発表標題 ADAM8 Is an Antigen of Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells Identified by Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. |
| 3. 学会等名 第14回血液学若手研究者勉強会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|