

平成21年 5月 24日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390258

研究課題名（和文） 造血器腫瘍成立における細胞環境シグナルの役割解明

研究課題名（英文） Role of cell environmental signaling in the establishment of hematopoietic malignancies

研究代表者

千葉 滋 (CHIBA SHIGERU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：60212049

研究成果の概要：癌などの悪性腫瘍は、正常細胞内で遺伝子異常が生じて腫瘍細胞に変化し増殖していく。さらに、腫瘍の周辺には腫瘍細胞が増殖しやすい環境が整っていく。このような腫瘍細胞環境に、細胞内情報伝達システムの一つである Notch がどのような役割を果たすか調べた。Notch 情報伝達の阻害剤により、腫瘍細胞内の情報が遮断されて腫瘍細胞が死にやすくなると同時に、腫瘍に栄養を与える血管新生がうまくできず、細胞環境の面からも腫瘍増殖が抑制されることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：造血器腫瘍、白血病、血管新生、Notch

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の成立と進展においては、腫瘍細胞の内在性変化とともに、腫瘍細胞と腫瘍細胞周囲の環境との相互作用が重要な因子であり、この実体が明らかにされつつあった。また、個体内で腫瘍を維持する細胞として、腫瘍幹細胞の存在がクローズアップされ、腫瘍幹細胞の生息環境（または niche）に関心が持たれていた。中でも、白血病が成立する環境シグナルと、正常造血幹細胞 niche シグナルとの異同を明らかにすることは、新たな白血病の治療法開発にとっても重要な課題

であった。

このような環境あるいは niche シグナルの中で、申請者らはそれまで研究を続けてきた Notch シグナルに注目し、その白血病細胞環境因子としての側面に焦点を当てて研究を進めようとした。Notch シグナルは、悪性腫瘍細胞における内在性変化が確認されている。すなわち、申請者らを含む複数のグループが、T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の約半数で Notch1 遺伝子に活性化型変異が認められることを見出していた (Science, 2004; Leukemia, 2005; Blood, 2006)。申請

者らはさらに、異なる腫瘍における Notch 分子の活性化型変異を見出し、また、分化した骨髄系前駆細胞において Notch シグナルの標的遺伝子である Hes-1 を発現させることにより、分化が停止し不死化するとも見出していた。

一方、環境との相互作用因子としての役割については、悪性黒色腫(melanoma)が Notch シグナルの活性化により細胞接着因子発現が誘導され、転移が促進されること(J Clin Invest, 2005; Cancer Res, 2006); 骨髄腫(myeloma)細胞が Notch シグナルにより細胞周期が停止し、薬剤抵抗性を獲得すること(Blood, 2004); Notch シグナルは悪性脳腫瘍細胞の増殖には影響を与えないものの、腫瘍幹細胞の個体への生着に必須であること(Cancer Res, 2006)などが示されてきた。

本研究では、これらの知識に立脚し、造血環境シグナルが造血器腫瘍成立において果たす役割を解明することを目指した。この研究は、Notch シグナルを標的とする造血器腫瘍治療の分子細胞基盤確立に寄与するものと考えられた。

2. 研究の目的

Notch 受容体を介するシグナルが、造血器腫瘍の成立において細胞内在性シグナルおよび細胞環境シグナルの両面で重要であることを示す。これによって、抗腫瘍薬として開発が進められている Notch 阻害剤の作用機序を明確にする。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄細胞にレトロウィルスベクターを用いて活性化型 Notch または Notch シグナルの下流遺伝子 Hes1 を導入して白血病発症モデルを作成する。(2) ①免疫不全マウスに T-ALL 細胞を移植し腫瘍形成後に Notch シグナル阻害剤を投与し腫瘍が縮小するかを検証する。②縮小する場合、腫瘍細胞内の Notch シグナル阻害効果によるものか腫瘍細胞環境の Notch シグナル阻害効果によるものかを明らかにする。

4. 研究成果

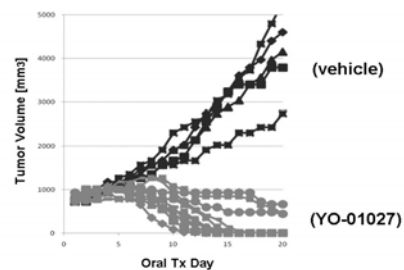
(1) マウス骨髄細胞から骨髄系前駆細胞(CMP)を純化し Hes1 を発現させると、細胞は顆粒球・マクロファージへの分化を停止し、不死化することが明らかになった。しかし Hes1 を発現させた CMP を同系マウスに移植しても白血病は発症しなかった。一方、慢性骨髄性白血病(CML)原因遺伝子 BCR/ABL を CMP に発現させて同系マウスに移植しても、過去の報告どおり疾患を再現できなかったものの、BCR/ABL と Hes1 を同時に CMP に発現させ

同系マウスに移植すると、CML 急性転化に類似した致死性の白血病を発症した。この結果は、Hes1 の活性化が CML の急性転化に関与する可能性を示唆するものであり、国内外を通じてはじめて明らかにされる重要な知見である。今後、ヒト CML 患者由来細胞を用いて、急性転化に Hes1 の活性化が関与するか、その場合どのような機序で Hes1 が活性化されるかなどを調べることにより、CML 急性転化の機序を明らかにしていくことが重要である。

(2) ①免疫不全マウスに T-ALL 細胞を移植し腫瘍形成後に Notch シグナル阻害剤を投与すると、著明に腫瘍が縮小した。

②T-ALL に Notch シグナル阻害剤不応性の活性化型 Notch 1 を発現させ免疫不全マウスに移植して腫瘍形成後に Notch シグナル阻害剤を投与すると、腫瘍増殖は著明に遅くなったが縮小はしなかった(図2)。すなわち、Notch シグナルは T-ALL 細胞内および腫瘍細胞環境の両者に働いて腫瘍増殖に寄与していることが明らかになった。さらに、腫瘍を栄養する血管内皮に変化が生じており、腫瘍細胞環境で Notch シグナルは腫瘍血管の新生に重要な役割を果たすことが明らかになった。

parental DND-41 in SCID



NICD/DND-41 in SCID

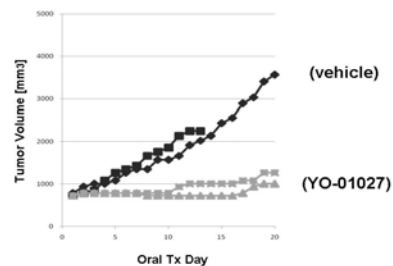


図2. ヒト T-ALL 細胞株 DND-41 (上段; parental DND-41) またはこの細胞に Notch 阻害薬不応性の活性化 Notch1 を発現させた DND-41 (下段; NICD/DND-41) を免疫不全マウス皮下に移植し腫瘍を形成させる。その後 Notch 阻害剤 (YO-01027) またはコントロール (vehicle) を経口投与する。NICD/DND-41 は in vitro では YO-01027 に完全に耐性であるが、in vivo では YO-01027 に一定の効果を示す。ただし、parental DND-41 に対する効

果に比べると有意に低い。

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 9 件) 全て査読あり

1. Kijima M, Iwata A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kitamura A, Yagita H, Chiba S, Shiota H, Yasutomo K. Jagged1 suppresses collagen-induced arthritis by indirectly providing a negative signal in CD8+ T cells. *J Immunol* 182(6):3566-3572, Mar, 2009
2. Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Akiba H, Chiba S, Ogawa H, Okumura K. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 123(1):74-81, Jan, 2009
3. Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H, Yagita H, Sakata-Yanagimoto S, Saito T, Taniuchi I, Chiba S, Sone S, Yasutomo K. Notch 2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 9(10):1140-1147, Oct, 2008.
4. Goyama S, Yamamoto G, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* 3(2):207-220, Aug, 2008.
5. Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(22):7839-7844, Jun, 2008.
6. Takeshita M, Ichikawa M, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia* 22(6):1241-1249, Jun, 2008.
7. Kijima M, Yamaguchi T, Ishifune C, Maekawa Y, Koyanagi A, Yagita H, Chiba S, Kishihara K, Shimada M, Yasutomo K. Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2-Notch interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(19):7010-7015, May, 2008.
8. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A,

Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev* 22(8):986-991, Apr 15, 2008.

9. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, Ishizuka-Katsura Y, Nakayama T, Itoh N, Jiang J, Nishitomi K, Kamino K, Morihara T, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Chiba S, Takeda M. Regulation Of Notch Signaling By Dynamic Changes In The Precision In S3 Cleavage Of Notch-1. *Mol Cell Biol* 28(1):165-176, Jan, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

1. Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba, 他. Notch signaling as a therapeutic target of cancer. The 13th Japan-Korea Cancer Research Workshop. 2008年12月13日. 韓国Daejeon.
2. Suk-young Lee, Shigeru Chiba, 他. Gain-of-function mutations and copy number increases of *Notch2* in diffuse large B-cell lymphoma. 49th American Society of Hematology Annual Meeting. 2007年12月10日. 米国ジョージア州アトランタ.
3. Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba, 他. Essential role of Notch signaling in *in vivo* mucosal-type mast cell maturation and localization, and eradication of parasites. 第37回日本免疫学会総会・学術集会. 2007年11月21日. 東京.
4. Suk-young Lee, Shigeru Chiba, 他. Activating mutations and copy number gains of *Notch2* in diffuse large B-cell lymphoma. 第66回日本癌学会学術総会. 2007年10月5日. 横浜.

[図書] (計 2 件)

1. 千葉 滋: 日本医事新報社. 造血器腫瘍アトラス—形態、免疫、染色体と遺伝子— 改訂第4版. 2009年. 「Notch遺伝子」pp49-53
2. 千葉 滋. 中外医学社. Annual Review血液 2008. 2008年. 「Notch遺伝子と造血幹細胞増幅および白血病との関わり」pp1-7

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

1. （名称）ヒトD e l t a 1 とヒト免疫グロブリンGのF c 部分との融合タンパク質を産生する形質転換体。（発明者）千葉滋、安友康二。（権利者）徳島大学。特願2007-318431。2007年12月10日出願。国内。

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 滋 (CHIBA SHIGERU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
60212049

(2)研究分担者

坂田一柳元 麻実子 (SAKATA-YANAGIMOTO
MAMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
80212049