

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03716

研究課題名(和文)急性NK白血病における腫瘍微小環境解析

研究課題名(英文)Analysis of tumor microenvironment in aggressive NK leukemia

研究代表者

幸谷 愛 (Kotani, Ai)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00517477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：アグレッシブNK白血病に対して微小環境の包括的な解析を目指しPDXマウスを6例構築し、微小環境に注目してヒトとマウスの配列差を用いたインターラクトーム解析を行った。複数のソフトを用いて網羅的スクリーニングを行い、10対の治療標的候補遺伝子対を選出し、それらをCas9を用いて欠損させたPDXマウスを樹立し、トランスフェリン受容体(TfnR)を含む7遺伝子の欠損による増殖抑制が認められた。特に抗ヒトTfnR抗体の投与による生存延長が顕著であり、AMEDの支援を受け、R5年度に医師主導試験が開始された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アグレッシブNK白血病は、本邦では、年間発症数が20人から30人という希少疾患であり、進行が早く、生存中央値は2ヶ月未満である。希少疾患故、病態解析が進まず、標準治療法がない。しかし、AYA世代を含む若年者に発症する特徴や欧米では更に頻度が低いため、我が国から治療法開発をしていくべき疾患である。臨床治験を開始するところまで、研究成果をつなげられた本研究の社会的意義は極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To comprehensively analyze the microenvironment of aggressive NK leukemia, a rare disease, for which there is no standard treatment, we constructed 6 PDX mice and performed interlactome analysis using human and mouse RNA sequence differences with a focus on the microenvironment in 3 of the mice that can be analyzed stably. We performed an exhaustive screening using several in silico analysis software programs and selected 10 candidate gene pairs for therapeutic targets. In particular, administration of anti-human TfnR antibody markedly prolonged survival, and a physician-initiated study was initiated in fiscal year 2005 with the support of AMED's "Drug Discovery Support Promotion Program and Pre-designation Commercialization Support Program for Orphan Drugs".

研究分野：血液内科学

キーワード：アグレッシブNK白血病 Epstein Bar virus

1. 研究開始当初の背景

アグレッシブ NK 白血病は（ANKL）、本邦では、年間発症数が 20 人から 30 人という希少疾患であり、進行が早く、生存中央値は 2 ヶ月未満である。希少疾患故、病態解析が進まず、標準治療がない。しかし、AYA 世代を含む若年者に発症する特徴や、欧米では更に頻度が低いため、研究開発が進まない状況から、我が国が主導して、治療法開発をしていくことが喫緊の課題の疾患である。

ANKL は Epstein Barr virus (EBV) が病態形成に関与するが、詳細は不明である。これまでの研究で、EBV 関連造血悪性腫瘍においては、悪性度は高いが、腫瘍細胞の微小環境への依存度が、顕著に高いことを明らかにしてきた。

(Higuch, *Kotani et al BLOOD 2018; Kudo, *Kotani et al Cell Metabolism 2022, *last and corrensponding author)

2. 研究の目的

上記の背景から、悪性どの極めて高い疾患である ANKL においても、微小環境に注目した病態解析を詳細に行うことによる治療標的の同定によって、有望な新規治療法開発に寄与できると想定し、全国の血液内科医に協力を要請し、ANKL に対して微小環境の包括的な解析を目指し Patient derived xenograft (PDX) マウスを構築して、病態解析の解析と治療標的の同定を目指した。

3. 研究の方法

PDX マウスを複数症例から構築し、注意深い病態解析を行い、共通の形質を見出し、主要な腫瘍の増殖の場を特定する。更に、腫瘍の増殖の場におけるがん微小環境に注目してヒトとマウスのゲノム配列の 20% の配列差を用いたインターラクトーム解析を行う。その後 in silico ドライアプローチ、CRISPR を用いた Wet アプローチの双方から治療標的の同定を試みる。

4. 研究成果

協力要請に呼応した血液内科医より 10 例の ANKL 検体を得て、そのうち 6 例の PDX マウスを構築した。安定的な形質を示す 3 例に対して、病理解析や、継代解析、試験管内細胞増殖試験によって、詳細な病態解析を行うことによって、ANKL においては、腫瘍増殖の場が、従来考えられてきた骨髄ではなく、肝臓、それも特殊な血管である類洞であることを明らかにした。さらに肝臓に対するインターラクトーム解析と in silico 解析によって、治療標的候補遺伝子対 10 個を選出した。それらに対して、CRISPR を用いて欠損させて、PDX マウスを作成する、マウス生体内スクリーニングを行うことによって、マウス生体内でその欠損に腫瘍抑制効果を認める 7 つの治療標的遺伝子対を同定した。

特にトランスフェリン-トランスフェリン受容体については、抗ヒトトランスフェリン受容体抗

体を手し、投与を行い、投与後わずか数日で、腫瘍の消失、体重減少の回復、といった顕著な治療効果が示されました。

本研究成果はアメリカ血液学会で、Achievement Award を受賞し、さらに以下の論文に“Congratulation ” とのコメントを投稿時から得るなど、国際的な賞賛を浴びた。

加えて、AMED「創薬支援推進事業・希少疾病用医薬品指定前実用化支援事業」の支援を受け、R5年より医師主導臨床治験が開始されるに至った。

Kameda, Yanagiya, Miyatake, *Kotani et al BLOOD in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Shunya Nakayama, Kazuaki Kameda, Etsuko Nagashima, Masatoshi Ito, Takashi Suyama, Yumi Matsuzaki, Tetsuhiro Chiba, Hideaki Sumiyoshi, Yutaka Inagaki, Ai Kotani	4. 巻 12(11)
2. 論文標題 Human hepatocyte-derived extracellular vesicles attenuate the carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell death & disease	6. 最初と最後の頁 2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-04204-7.	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 -

1. 著者名 Masaharu Kawashima, Hiroshi Higuchi, Ai Kotani	4. 巻 61
2. 論文標題 Significance of trogocytosis and exosome-mediated transport in establishing and maintaining the tumor microenvironment in lymphoid malignancies. Journal of clinical and experimental hematopathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop.	6. 最初と最後の頁 192-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.21005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito M, Kudo K, Higuchi H, Otsuka H, Tanaka M, Fukunishi N, Araki T, Takamatsu M, Ino Y, Kimura Y, Kotani A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Proteomic and phospholipidomic characterization of extracellular vesicles inducing tumor microenvironment in Epstein-Barr virus-associated lymphomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e21505,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002730R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotani A, Ito M, Kudo K.	4. 巻 74
2. 論文標題 Non-coding RNAs and lipids mediate the function of extracellular vesicles in cancer cross-talk.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Semin Cancer Biol.	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcancer.2021.04.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara S, Sato T, Sugioka R, Miwa R, Saito H, Sato R, Fukuyama H, Nakajima A, Sawai S, Kotani A, Katagiri K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Rap1 is essential for B-cell locomotion, germinal center formation and normal B-1a cell population. 202, 12, 624419.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 624419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.624419.	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 -

1. 著者名 Masatohsi Ito ,Kai Kudo ,Hiroshi Higuchi, Hiroko Otsuka,Masyuki Tanaka, Noriko Fukunishi ,Takanori Araki , Masako Takamatsu,Yoko Ino ,Yayoi Kimura, Ai Kotani.	4. 巻 35(4)
2. 論文標題 Proteomic and phospholipidomic characterization of extracellular vesicles inducing tumor microenvironment in Epstein-Barr virus-associated lymphomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB JOURNAL	6. 最初と最後の頁 e21505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002730R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 So Nakagawa, Masaharu Kawashima, Yuji Miyatake, Kai Kudo, Ryutarō Kotaki, Kiyoshi Ando, Ai Kotani.	4. 巻 773
2. 論文標題 Expression of ERV3-1 in leukocytes of acute myelogenous leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene.	6. 最初と最後の頁 145363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.145363.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Motoyuki Otsuka, Kouichi Kitamura, Masatoshi Ito, Hideki Derek Kawai, Masamichi Muramatsu, Tatehiro Kagawa, Ai Kotani.	4. 巻 295(35)
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry.	6. 最初と最後の頁 12449-12460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Masaharu Kawashima, Ai Kotani. et al.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Overexpression of miR0669m inhibits erythroblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 13554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70442-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaharu Kawashima, Joaquim Carreras, Ai Kotani. et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2405-2417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-0737-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yushi Imai, Tetsuhiro Chiba, Takayuki Kondo, Hiroaki Kanzaki, Kengo Kanayama, Junjie Ao, Ryuta Kojima, Yuko Kusakabe, Masato Nakamura, Tomoko Saito, Ryo Nakagawa, Eiichiro Suzuki, Shingo Nakamoto, Ryosuke Muroyama, Akinobu Tawada, Tomoaki Matsumura, Tomoo Nakagawa, Jun Kato, Ai Kotani, Hisahiro Matsubara, Naoya Kato.	4. 巻 20(3)
2. 論文標題 Interferon- induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology letters.	6. 最初と最後の頁 2161-2168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Koike, Marni E Cueno, Keiko Nodomi, Muneaki Tamura, Noriaki Kamio, Hajime Tanaka, Ai Kotani, Kenichi Imai.	4. 巻 25(17)
2. 論文標題 Heat-Killed Fusobacterium nucleatum Triggers Varying Heme-Related Inflammatory and Stress Responses Depending on Primary Human Respiratory Epithelial Cell Type.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules.	6. 最初と最後の頁 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25173839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 8.Yuichiro Yamamoto, Masatoshi Kakizaki, Ai Kotani. et al.	4. 巻 32(8)
2. 論文標題 PD-L1 is induced on hepatocyte surface via CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6 upregulation by the anti-HBV drug Entecavir.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International immunology.	6. 最初と最後の頁 519-531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Masaharu Kawashima, Yuichiro Yamamoto, Hiroshi Higuchi, Etsuko Nagashima, Natsumi Kurosaki, Masako Takamatsu, Yara Yukie Kikuti, Ken-Ichi Imadome, Naoya Nakamura, Ai Kotani.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Dasatinib exacerbates splenomegaly of mice inoculated with Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell lines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports.	6. 最初と最後の頁 4355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61300-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuaki Kameda, Ryo Yanagiya, Yuji Miyatake, Ai Kotani et al	4. 巻 in press
2. 論文標題 Hepatic niche leads to aggressive natural killer cell leukemia proliferation through transferrin-transferrin receptor 1 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BLOOD	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022018597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kai Kudo, Yoshimi Miki, Joaquim Carreras, Shunya Nakayama, Yasushi Nakamoto, Masatoshi Ito, Etsuko Nagashima, Kei Yamamoto, Hiroshi Higuchi, Shin-Ya Morita, Asuka Inoue, Junken Aoki, Kiyoshi Ando, Naoya Nakamura, Makoto Murakami, Ai Kotani	4. 巻 34
2. 論文標題 Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 15-633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2022.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 多価不飽和脂肪酸及び/又はリゾリン脂質を表面に有する細胞外小胞	発明者 幸谷 愛、村上誠、 工藤海、中山駿矢	権利者 東海大学 東京 大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-121246	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 劇症型N K白血病に対する治療標的の同定	発明者 幸谷愛、宮竹佑治	権利者 東海大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-180891	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	前田 高宏 (Maeda Takahiro) (00791972)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究 分担者	半田 寛 (Handa Hiroshi) (90282409)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------