

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17371

研究課題名（和文）PECAM-1と骨髄間質細胞が白血病難治化に及ぼす影響の検討

研究課題名（英文）Analysis of the interaction effect of PECAM-1 and bone marrow stromal cells on leukemia cells

研究代表者

梅澤 佳央（Umezawa, Yoshihiro）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：50813218

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）：阻害薬を用いた薬理的検討において、PECAM-1はSHP2を通じてPI3K/Akt/mTORC経路の活性化を来す可能性が示唆された。32Dc13細胞を用いた検討ではPECAM-1の発現は、骨髄間質細胞との共培養系において細胞増殖や生存に対し有利な結果をもたらさなかった。しかし、PECAM-1を発現した慢性リンパ性白血病細胞を用いた検討においては、骨髄間質細胞との共培養で有意に培養期間の延長が認められ、その効果は骨髄間質細胞にPECAM-1を過剰発現させるとさらに顕著であった。これらPECAM-1発現による延長効果はBTK阻害薬を用いることで抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLLにおいて細胞表面のPECAM-1を通じた骨髄間質細胞とのinteractionが細胞生存に対し有利な環境を付与していることが示唆され、BTK阻害薬によりその効果は抑制された。PECAM-1はBTKなどによりそのimmunotyrosine-based inhibitory motif(ITIM)のチロシンがリン酸化され、SHP2などをリクルートすることでシグナル伝達を行い、骨髄微小環境を介した治療抵抗性に寄与している可能性が考えられ、また、BTK阻害薬はこのような骨髄微小環境とCLLの相互作用も包括的に治療標的としうるということが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Pharmacological analyses using inhibitors suggested that PECAM-1 may activate the PI3K/Akt/mTORC pathway through SHP2 regulation. PECAM-1 over-expressed 32Dc13 cells demonstrated no advantage on cell proliferation or survival in a co-culture system with bone marrow stromal cells compared to control cells. However, chronic lymphocyte leukemia(CLL) cells expressing PECAM-1 showed significant advantage on its survival when co-cultured with bone marrow stromal cells, and the effect was enhanced with over-expression of PECAM-1 on bone marrow stromal cells. Interestingly, this favoring effect of PECAM-1 expression on CLL cell survival was diminished by using BTK inhibitor.

研究分野：血液内科学

キーワード：PECAM-1 CLL leukemia bone marrow stromal cell SHP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年白血病の治療成績は、BCR/ABL や Jak2-V617F、FLT3-ITD などの driver mutation に対する分子標的治療の導入で劇的な治療成績の改善を認めている。しかし、このような薬剤の適応となる driver mutation が見られないような白血病も多く、耐性機序や難治化の原因解明、新しい治療標的の探索が求められる。

白血病の再発難治化の一因として、骨髄間質細胞、細胞外マトリックスなどからなる骨髄微小環境との相互作用が考えられ、その中でも、骨髄間質細胞から分泌される SDF-1 とその受容体である CXCR4 のシグナルは、造血幹細胞の分化増殖に必須であり、白血病幹細胞の骨髄での増殖に重要な役割を果たしている (1))。

申請者はこれまで SDF-1 とその受容体である CXCR4 と PECAM-1 の相互作用について研究を継続してきた。PECAM-1 は 130kDa のイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型の接着分子の一つである。細胞内にチロシンを含む ITIM (immunotyrosine-based inhibitory motif) をもち、これらのチロシンリン酸化が SHP2 などのアダプター分子の結合を通じて細胞内シグナル伝達に関与している。臨床的にも AML、ALL、CLL などのさまざまな白血病において PECAM-1 の発現が報告され、申請者の研究室では PECAM-1 がフィラデルフィア染色体陽性 ALL においてチロシンキナーゼ阻害薬に対する治療抵抗性を付与する可能性 (2) や PECAM-1 による SDF-1 (間質細胞由来因子) 刺激に伴う持続的な PI3K/Akt/mTORC シグナル、低分子 GTPase の活性化を報告した (3)。

これらの報告は白血病細胞が PECAM-1 を通じて骨髄間質細胞との相互作用により、PI3K/Akt 経路などのシグナルを亢進させ、引いては治療抵抗性を誘導する可能性を示しており、白血病細胞は、そのものがもつ Driver mutation などからのシグナルをさらに骨髄微小環境において亢進させていると考えられる。PECAM-1 を介したこれらのネットワークは白血病治療において新たな治療標的や予後予測のバイオマーカーとして有用である可能性がある。

2. 研究の目的

これまでの研究成果から、PECAM-1 が骨髄間質細胞をはじめとする骨髄微小環境との interaction を通じて白血病などへの治療抵抗性に寄与しているという仮説を検討する。本研究では造血器腫瘍の driver mutation (BCR/ABL や FLT3-ITD など) ではなく、血管内皮細胞などにも発現している接着分子である PECAM-1 に着目している。PECAM-1 はチロシンキナーゼや転写因子などではなく、一見直接的な腫瘍原性には関係なさそうだが、さまざまなシグナル伝達に寄与することが報告されており、SDF-1/CXCR4 axis もその一つである。白血病治療において driver mutation の検索やその阻害による治療成績は飽和してきているのが現状であり、骨髄微小環境のもたらす腫瘍原性、治療抵抗性の検討を PECAM-1 を通じて行うことで包括的な治療コンセプトの展開へとつなげていく。

3. 研究の方法

これまでの我々の研究で、PECAM-1 が SDF-1 により JAK2 や BTK を介して ITIM のチロシンをリン酸化させ、その下流にある PI3K/AKT/mTOR 経路の活性化することを報告してきている。レトロウイルスベクター等を用いた PECAM-1 の過剰発現、またはノックダウンによりモデル細胞株を作製しており、阻害薬を用いた薬理学的方法や、PECAM-1 のアダプター分子である SHP2 の阻害薬、遺伝子導入による影響を検討する。また、骨髄微小環境との相互作用による影響を検討するため、ST2 や KUSA-H1 といった骨髄間質細胞のモデル細胞株と PECAM-1 発現細胞との共培養や慢性リンパ性白血病細胞、患者細胞 (臨床検体) を用いた骨髄間質細胞との共培養を行い、細胞生存に及ぼす影響を検討し解析を行った。

4. 研究成果

(1) PECAM-1 発現細胞と骨髄間質細胞の共培養が細胞生存に及ぼす影響の検討

造血幹細胞モデルとして 32Dcl3 細胞、白血病細胞モデルとして BCR-ABL 発現細胞 (Ton .B210) において PECAM-1 の発現細胞、ノックダウン細胞をレトロウイルスベクターを用いて作製した。阻害剤を用いた薬理学的検討ではノックダウン細胞において PI3K 阻害剤、Jak 2 阻害剤の感受性が亢進される結果であったが、PECAM-1 の過剰発現細胞においてはコントロール細胞と有意差は見られなかった。骨髄微小環境モデルとして骨髄間質細胞株の Kusa-H1、ST2 を用いて、32Dcl3 の PECAM-1 発現やノックダウンが骨髄間質細胞との共培養における細胞

死に及ぼす影響をフローサイトメトリーを用いて検討した。32Dc13細胞はIL-3のwithdrawalにて細胞死が誘導されるが、PECAM-1の発現やノックダウンが骨髄間質細胞との共培養において、この細胞死誘導に与える一定の影響は認めなかった。

(2) PECAM-1がSDF-1刺激下にPI3K/Akt/mTORCを活性化する分子メカニズムの検討

PECAM-1による骨髄間質細胞と腫瘍細胞とのinteractionには過去の検討からPI3K/Akt/mTORCシグナルが関連している可能性が考えられた。PI3K経路活性化の分子メカニズムの検討のためPECAM-1のITIMに対するアダプター分子であるSHP2についての検討を行なった。免疫沈降法による検討では32Dc13細胞で、PECAM-1とSHP2のassociationが認められた。SHP2の阻害薬(IIB-08)を用いた検討ではPECAM-1を過剰発現させた細胞において、細胞死誘導がコントロール細胞と比較して抑制された(図1)。また、32Dc13細胞においてはSHP2阻害薬によりSDF-1誘導性のAktの活性化が強く抑制され(図2)、さらにSHP2阻害に伴いPECAM-1の発現の低下がウエスタンブロッティング、FACSで確認され、CXCR4の発現も低下していた。SHP2阻害によるPECAM-1、CXCR4の発現抑制、もしくは分解亢進機序は検討の余地があるが、PECAM-1によるSDF-1誘導性のPI3K/AKT経路の活性化にはSHP2が強く関連している可能性が考えられる。

図1 PECAM-1発現細胞に対するSHP2阻害薬の効果

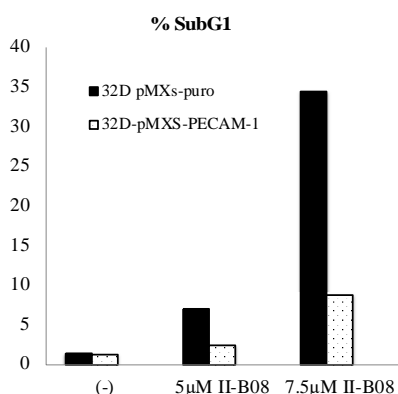
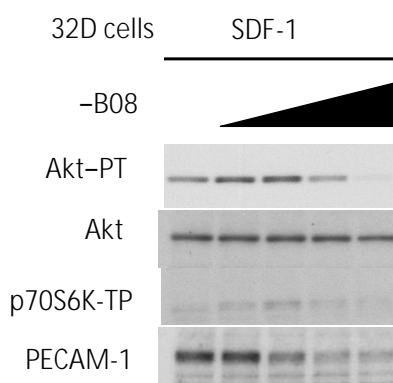


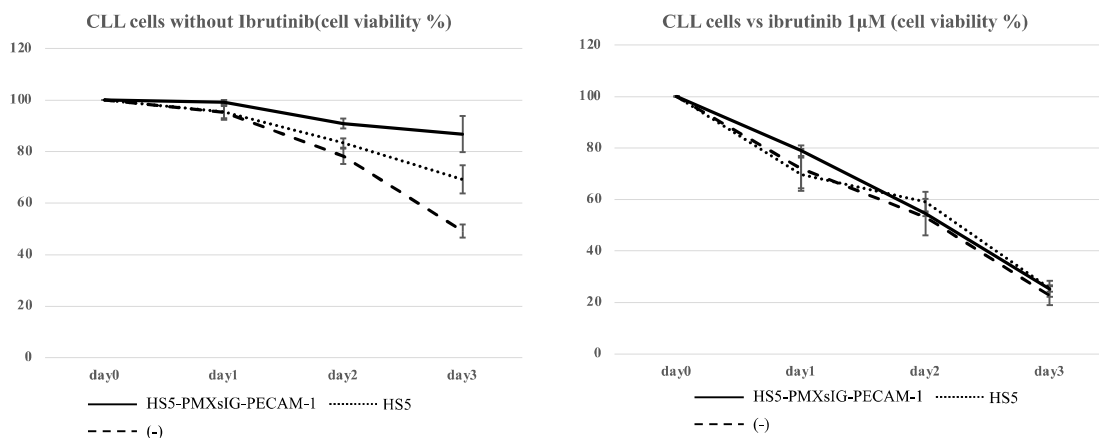
図2 SHP2阻害薬使用によるPI3K/Akt経路への影響



(3) 慢性リンパ性白血病臨床検体を用いた腫瘍細胞と骨髄間質細胞とのinteractionの検討

Myeloid系における検討では上述のようにPECAM-1の発現が薬理的阻害や細胞間質細胞との共培養で明らかな細胞生存、治療抵抗性へ与える影響が見られず、Lymphoid系のモデルとして慢性リンパ性白血病 (CLL) 細胞を用いての検討を行った。CLLのモデル細胞株としてのTMD12はPECAM-1を発現しておらず、PECAM-1の発現をプラスミドベクターを用いて試みたが、良好な増殖が得られず、モデル細胞株としての樹立が困難であった。そこで、臨床検体を用いた検討を行うこととし、CLL臨床検体の10例をフローサイトメトリーでPECAM-1の発現を見たところ、全例で陽性であった。CLLの臨床検体をHS-5(骨髄間質細胞の細胞株)およびHS-5にレトロウイルスベクターでPECAM-1を強発現した細胞と共培養した結果、特にPECAM-1を強発現させたHS5との共培養で細胞死が有意に培養期間の延長が見られ、これらの延長効果はIbrutinibにより阻害された。

図3 CLL細胞とHS5との共培養が細胞死に及ぼす影響



PECAM-1 が PECAM-1 同士の相互接合により、ITIM のリン酸化を受けるといふ我々の過去の検討からも、CLL において細胞表面の PECAM-1 が細胞間質細胞が発現する PECAM-1 との interaction により細胞生存に対し有利な環境を付与していることが推定され、BTK 阻害薬である Ibrutinib によりその効果は抑制されると考えられる。PECAM-1 は BTK によりその ITIM がリン酸化を受けるといふが、このような骨髄微小環境と CLL 細胞の相互作用を包括して治療標的とできることが、BTK 阻害薬の CLL に対する治療効果のメカニズムの一つである可能性が示唆され、今後モデル細胞株の早期の樹立と分子メカニズムの更なる検討を行う。

<引用文献>

1. Manar S Shafat, Bruno Ganeswaran, Kristian M Bowles, Stuart A Rushworth

The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. *blood Rev.* 2017 Sep;31(5):277-286

2. Nan Wu, Tetsuya Kurosu, Gaku Oshikawa, Toshikage Nagao, Osamu Miura

PECAM-1 is involved in BCR/ABL signaling and may downregulate imatinib-induced apoptosis of Philadelphia chromosome-positive leukemia cells *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):419-28.

3. Umezawa Y, Akiyama H, Okada K, Ishida S, Nogami A, Oshikawa G, Kurosu T, Miura O.

Molecular mechanisms for enhancement of stromal cell-derived factor 1-induced chemotaxis by platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1). *J Biol Chem.* 2017 Dec 1;292 (48):19639-19655.

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------