

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591201

研究課題名（和文） 白血病細胞の生存に対する骨関連細胞の関与

研究課題名（英文） Influence of bone related cells on leukemic cells

研究代表者

木村 晋也（KIMURA SHINYA）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359794

研究成果の概要（和文）：白血病細胞のニッチを解明するため、骨芽細胞、破骨細胞、骨片および白血病細胞の共培養系を樹立した。本実験系を用いて、骨芽細胞は白血病細胞の増殖を促すこと、骨から破骨細胞が TGF- β を組みだし、その TGF- β によって白血病細胞は休止期に入り、ABL 阻害剤に耐性を獲得することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We have established co-culture system with osteoblasts, osteoclasts, bones and leukemic cells to investigate the influence of bone related cells on leukemic cells. With this system, we found that osteoblasts stimulated the proliferation of leukemic cells, and leukemic cells which were introduced to quiescent phase by TGF- β that was released from bone via osteoclasts acquired the resistance to ABL tyrosine kinase inhibitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、骨、ニッチ

1. 研究開始当初の背景

ABL チロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs) の出現によって慢性骨髄性白血病 (CML) の予後は劇的に改善した。しかし全ての患者が ABL TKIs のみで治癒するわけではない。その主な原因は、ニッチに潜み G_0 期にあり ABL TKIs に耐性を示す白血病幹細胞であると考えられている。

2. 研究の目的

白血病細胞のニッチ構成成分と考えられ

る骨関連細胞（骨芽細胞、破骨細胞、骨）の白血病細胞の生存に対する影響を明らかにする。

3. 研究の方法

A) *in vitro* (通常サイズシャーレ) における骨関連細胞と白血病細胞の相互作用

i) 雄 Balb/CA 6~8 週齢の左右大腿骨を摘出し、骨髄をフラッシュアウトした後、 -80°C で 24 時間以上凍結し、骨組織

に付着した生細胞を死滅させる。Type I コラーゲンゲル 500 μ L を 12 穴トランス ウェルの底面にコーティングし、上記大腿骨（長軸方向に割をいれたもの）を設置、骨芽細胞（哺乳 1 日目のマウス頭頂骨より単離）、マウス骨髄細胞を添加し、ビタミン D₃ およびプロスタグランディン E₂ 存在下で 7 日間培養し破骨細胞を分化誘導する。マウス ProB 細胞 Ba/F3 に野生型 *bcr-abl* を遺伝子導入した Ba/F3/wt *bcr-abl* を 1 \times 10⁴ 個/well を加え、経時的に生細胞数を計測していく。上記システムを基本として、骨芽細胞、破骨細胞、増殖因子供給原として骨片または各種サイトカイン、さらに関与が疑われるシグナル伝達の阻害物質などを種々組み合わせ、多種類の培養系を構築し、各系での白血病細胞の増殖や細胞周期を検討した。

ii) 破骨細胞から放出されることが報告されている TGF- β 1 について ELISA で確認したところ、骨芽細胞+破骨細胞+骨の培養上清では、有意に TGF- β 1 が増加していた。Ba/F3/wt *bcr-abl* に精製 TGF- β 1 を曝露させた際の下流シグナル (Smad 等) の変化を検討する。また上記共培養系で生存中の Ba/F3/wt *bcr-abl* を回収し、同様の検討を行った。

B) ナノチャンパー内での共培養系の構築

上記通常シャーレで構築した共培養系を、容量 240nL のナノチャンパー内で再構築可能か検証する。これまでにナノチャンパー内で骨髄細胞を破骨細胞に分化させることには成功している。しかし、いまだその効率は通常シャーレより不良であり、よりよい培養条件を検討した。

C) *in vitro* (通常シャーレ内) でのニッチ攻撃療法の確立

上記で構築した共培養系で、骨芽細胞あるいは破骨細胞に特異的にアポトーシスを誘導する物質、またはシグナル伝達阻害物質から CML 治療に応用可能なものを同定する。破骨細胞に対して、ビスホスホネートについて検討した。

4. 研究成果

本研究によって、骨芽細胞は CML 細胞の増殖を促進し、骨組織から破骨細胞によって汲み出される TGF- β 1 が CML 細胞を休止期に誘導することで、増殖が抑制されることを明らかとした。休止期に誘導されることにより、破骨細胞周囲に接着している白血病細胞は ABL 阻害剤・ニロチニブに暴露されても死滅され難いことがわかった。破骨細胞を阻害す

る目的で開発されたビスホスホネート製剤・ゾレドロン酸の投与によって、やはり共培養系内でも破骨細胞は死滅した。そしてニッチを構成すると考えられる破骨細胞が死滅したことにより、白血病細胞はニロチニブに対する感受性を回復した。以上の結果から、破骨細胞がくみ出す TGF- β 1 がニロチニブの治療抵抗性に重要であることが明らかとなったため、単純な *in vitro* 実験系で TGF- β 1 の関与について再検討を行った。骨関連細胞を含まない培養系において、ゾレドロン酸はニロチニブの作用を相乗的に増強したが、TGF- β 1 を添加することで、この併用効果はキャンセルされ、逆にゾレドロン酸はニロチニブと拮抗作用を示した。本結果は、白血病細胞に対する併用効果を検討する際に、単純な *in vitro* の系だけでは不十分であり、今回我々が用いたような共培養系下での検討も必要であることが示唆された。

過去の報告と以上の結果を合わせ、白血病細胞の殲滅には破骨細胞を除去することが不可欠と考え、特に破骨細胞がその病態と密接に関与する成人 T 細胞性白血病に対して、抗がん剤治療にゾレドロン酸を併用する臨床試験を開始した。

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 35 件)

1. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. Co-existence of MET FISH positive with EGFR mutations causes poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*, 75: 89-94, 2012.
2. Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Mitobe Y, Horikawa S, Hatake K, Fukui I, Kimura S, Maekawa T, Habuchi T. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. *Int J Cancer* 130: 677-684, 2012.
3. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kunimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase IIa and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 117: 3575-3584, 2011.
4. Fukushima N, Itamura H, Urata C,

- Tanaka M, Hisatomi T, Kunota Y, Sueoka E, Kimura S. Clinical presentation and outcome in patients of over 75 years old with malignant lymphoma. *Int J Clin Med*, 2: 246-253, 2011.
5. Tanaka R, Kimura S, Ashihara E, Yoshimura M, Takahashi N, Wakita H, Itoh K, Nishiwaki K, Suzuki K, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Satake S, Hirai H, Sawada K, Ottmann OG, Melo JV, Maekawa T. Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. *Cancer Lett*, 312: 228-234, 2011.
 6. Nagao R, Ashihara E, Kimura S, Strovel JW, Yao H, Takeuchi M, Tanaka R, Hayashi Y, Hirai H, Padia J, Strand K, Maekawa T. Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia adaptation by AV65, a novel Wnt/ β -catenin signaling inhibitor. *Cancer Lett*, 312: 91-100, 2011.
 7. Urata C, Yoshimura M, Itamura H, Hisatomi T, Kubota Y, Fukushima N, Sueoka E, Kimura S. Lenalidomide in combination with dexamethasone induced rhabdomyolysis in a multiple myeloma patient treated with pravastatin. *Int J Hematol* 94: 216-217, 2011.
 8. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, Ureshino N, Hayashi S, Hosomi T, Hirai M, Sueoka E, Kimura S. A non-invasive system for monitoring resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* 6: 1639-1648, 2011.
 9. Ureshino N, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Sato A, Komiya K, Iwanaga K, Mitsuoka M, Takeda Y, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. Fully Integrated, Automated and Rapid Detection System for *KRAS* Mutations. *Oncol Rep* 26: 609-613, 2011.
 10. Kawatani M, Takayama H, Muroi M, Kimura S, Maekawa T, Osada H. Identification of a small molecule inhibitor of DNA topoisomerase II by proteomic profiling. *Chem Biol* 18: 743-751, 2011.
 11. Yamamichi J, Ojima T, Yurugi K, Iida M, Imamura T, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T. Single-step, label-free quantification of antibody in human serum for clinical applications based on localized surface plasmon resonance. *Nanomedicine* 7: 889-895, 2011.
 12. Tauchi T, Okabe S, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. *Oncogene* 30: 2789-2797, 2011.
 13. Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, Kimura S, Nakagawa Y, Tanaka R, Yao H, Nagao R, Hayashi Y, Hirai H, Maekawa T. Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci* 102: 591-596, 2011.
 14. Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Brit J Cancer* 104: 91-100, 2011.
 15. Sakai K, Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Yamauchi A, Yao H, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Hirai H, Kimura S, Hirashima M, Yoshimura N, Maekawa T. Galectin-9 ameliorates acute GVH disease through the induction of T-cell apoptosis. *Eur J Immunol* 41: 67-75, 2011.
 16. Ureshino N, Aragane N, Nakamura T, Ide M, Mochinaga S, Fukushima N, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. A Fully Integrated and Automated Detection System for Single Nucleotide Polymorphisms of *UGT1A1* and *CYP2C19*. *Oncol Res* 19: 111-114, 2011.
 17. Kuroda J, Kobayashi T, Nagoshi H, Yamamoto M, Sasaki N, Taki T, Kimura S, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Targeting ATF-3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Res* 8: 994-1001, 2011.
 18. Ushiki T, Kizaki-Kondoh S, Ashihara E, Tanaka S, Nasuko M, Hirai H, Kimura S, Aizawa Y, Maekawa T, Hiraoka M. Noninvasive tracking of donor cell homing by near-infrared fluorescence imaging shortly after bone marrow transplantation. *PLoS One* 5: e11114, 2010.

19. Tanaka M, Fukushima N, Yamasaki F, Ohshima K, Sueoka E, Kimura S. Primary hepatic extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type is associated with chronic inflammatory process. *Open J Hematol* 1-5, 2010.
20. Ryu K, Murata H, Koto K, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Sakabe T, Takeshita H, Itoi M, Kimura S, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Res* 30: 2713-2720, 2010.
21. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Ryu K, Sakabe T, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep* 24: 233-239, 2010.
22. Tanaka R, Squires MS, Kimura S, Yokota A, Nagao R, Yamauchi T, Takeuchi M, Yao H, Reule M, Smyth T, Lyon JF, Thompson NT, Ashihara E, Ottmann OG, Maekawa T. Activity of the multi-targeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL positive leukemic cells. *Blood*, 116: 2089-2095, 2010.
23. Ide M, Kuwahara N, Matsuishi E, Kimura S, Gondo H. Uncommon case of chronic myeloid leukemia with multiple myeloma. *Int J Hemmatol* 91: 699-704, 2010.
24. Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T. A combination of a DNA-chimera 1 siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells *in vitro*. *Cancer Lett* 294: 245-253, 2010.
25. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Yokota A, Tanaka R, Nagao R, Nakahara T, Fujiyama Y, Maekawa T. Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment. *Cell Death Diff* 17: 1211-1220, 2010.
26. Tanaka M, Fukushima N, Urata C, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Tomimasu R, Sueoka E, Kimura S. Gangrenous cheilitis associated with all-trans retinoic acid therapy for acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 91: 132-135, 2010.
27. Ozaki K, Kosugi M, Baba N, Fujio K, Sakamoto T, Kimura S, Tanimura S, Kohno M. Blockade of the ERK or PI3K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 1610-1615, 2010.
28. Kantarjian H, le Coutre P, Cortes J, Pinilla-Ibarz J, Nagler A, Hochhaus A, Kimura S, Ottmann O. Phase I study of INNO-406, a dual Abl/Lyn kinase inhibitor, in Philadelphia chromosome-positive leukemias post-imatinib resistance or intolerance. *Cancer* 16: 2665-2672, 2010.
29. Yokota A, Kimura S, Tanaka R, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Nagao R, Kuroda J, Kamitsuji Y, Kawata E, Ashihara E, Maekawa T. Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res*. 34: 793-799, 2010.
30. Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow in the closed system using a new device made by non-woven fabrics. *Tissue Eng Part C Methods* 16: 81-91, 2010.
31. Hamaguchi M, Seno T, Yamamoto A, Kohno M, Kadoya M, Ishino H, Ashihara E, Kimura S, Tsubakimoto Y, Takata H, Yoshikawa T, Maekawa T, Kawahito Y. Loxoprofen Sodium, a Non-Selective NSAID, Reduces Atherosclerosis in Mice by Reducing Inflammation. *J Clin Biochem Nutr* 47: 138-147, 2010.
32. Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Tanaka R, Yokota A, Murotani Y, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki T, Kimura S, Maekawa T. β -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model.

- Clin Cancer Res*, 15:2731-2738, 2009.
33. Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, Kimura S, Maekawa T, Hasegawa S, Wada. Monitoring with a non-invasive bioluminescent *in vivo* imaging system of successful treatment of disseminated pleural tumors by intra-pleural docetaxel administration. *Lung Cancer* 66: 75-79, 2009.
 34. Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, Watanabe M, Adachi S, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett* 274: 271-278, 2009.
 35. Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T, Kimura S. Intravesical administration of . . . T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immun* 58: 493-502, 2009.

[学会発表] (計4件)

1. Kimura S. Wnt/b-catenin signaling inhibitors in combination with TKI. 13th International Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy. 平成23年9月23日. Estoril, Portugal.
2. 木村 晋也. 新規 HSP90 阻害剤の発見と創薬展開. 化学療法基盤支援第2回シンポジウム. 平成23年2月22日. 横浜市.
3. Kimura S. ABL tyrosine kinase inhibitors. The15th JFCR-International Symposium on Cancer Chemotherapy. 平成22年12月2日. 東京都.
4. 木村晋也. ABL 阻害剤の新展開. 第71回日本血液学会学術集会. 平成21年10月23日. 京都市.

[図書] (計3件)

- 1) 木村 晋也. 羊土社. 秒進分歩する癌研究の最前線. 実験医学増刊(分担執筆). 2011年. 総ページ数、8頁.
- 2) 福島 伯泰、木村 晋也. 先端医学社. がん骨転移治療(分担執筆) 2011年. 総ページ数、7頁
- 3) 木村 晋也. 日本医事新報社. 造血腫瘍アトラス(分担執筆). 2009年. 総ページ数、5頁.

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.intmed.med.saga-u.ac.jp/kenkyugroup/group/blood-hp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 晋也 (KIMURA SHINYA)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359794

(2) 研究分担者

福島 伯泰 (FUKUSHIMA NORIYASU)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：20346894

久富 崇 (HISATOMI TAKASHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：10398125