

機関番号： 32620

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009～2011

課題番号： 21591223

研究課題名 (和文) C X C R 4 に関連する C M L 前駆細胞の骨髄遊走、定着機構の解明とその治療的応用

研究課題名 (英文) Tyrosine kinase inhibitor induce CML migration to stromal microenvironment through Lyn/CXCR4 interactions in lipid rafts

研究代表者

田部 陽子 (TABE YOKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 70306968

研究成果の概要 (和文)：骨髄間質細胞 (MSC) 共培養条件下でチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) を投与した慢性骨髄性白血病 (CML)細胞の膜上脂質ラフト内では、CXCR4 と活性型 Lyn の発現が認められ、CXCL12/CXCR4 依存性遊走能は、脂質ラフトの破壊や Lyn 阻害によって抑制された。一方、TKI によって CML 細胞の接着能は変化しなかった。以上より、TKI は、骨髄間質細胞共存下の CML 細胞中の骨髄間質細胞への遊走能亢進に作用し、脂質ラフトと Lyn が CXCL12/CXCR4 シグナル依存性の細胞遊走に関わると考えられた。脂質ラフトの破壊や Lyn 阻害が、CML 前駆細胞の骨髄間質細胞への遊走を抑制し、骨髄微小環境内の CML 細胞の残存阻止に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：p210Bcr-Abl tyrosine kinase inhibits CXCR4-mediated migration of chronic myeloid leukemia (CML) cells to bone marrow stroma. In turn, exposure of CML cells to a tyrosine kinase inhibitor (TKI) enhances migration of CML cells toward stromal cell layers and promotes nonpharmacological resistance to imatinib. Src-related kinase Lyn is known to interact with CXCL12/CXCR4 signaling and is directly activated by p210Bcr-Abl. TKI treatment under co-culture with mesenchymal stromal cells induced CXCR4 localization in the lipid raft fraction, which further co-localized with active phosphorylated form of Lyn (LynTyr396) in CML cells. Lyn inhibition or cholesterol depletion abrogated imatinib-induced migration. These findings demonstrate the critical role of lipid rafts in imatinib-induced CML migration and lodging within the bone marrow microenvironment through the compartmental changes of the multivalent CXCR4 and Lyn complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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： 慢性骨髄性白血病, イマチニブ, CXCR4, Lyn

## 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病(CML)は、幹細胞異常に由来する疾患である。CML 前駆細胞の大多

数は、正常造血細胞よりも増殖能が高く、細胞周期が活性化された状態にあるが、一部は静止期にある。この静止期細胞は、CML 幹

細胞の候補と考えられる。イマチニブに代表されるチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)によるCML治療は、細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導に主眼が置かれており、静止期にあるCML前駆細胞や幹細胞には効果を期待できない。骨髄ニッチ内で、静止期にあるCD34+CML前駆細胞は一般的に様々なアポトーシス刺激に耐性であり、かつ、骨髄の間質細胞は、白血病細胞の生存と化学療法剤抵抗性に関与する。

## 2. 研究の目的

CXCR4とインテグリンを介したCML細胞と骨髄微小環境との相互作用を明らかにし、CML細胞の骨髄残存をめぐる分子作用機序に基づいた新たな治療戦略を提示することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- ① TKI(イマチニブ)を添加したCML細胞株(KBM-5, K562)をヒト骨髄間質細胞: Mesenchymal stem cell(MSC)と共培養し、CXCR4の発現の変化と脂質ラフトへの集積、Lynとの共局在の有無を検出した(共焦点イメージ法)。さらに、活性化p-Lynの発現量の変化(キナーゼアッセイ、ウェスタンブロット(WB))と局在の変化(共焦点イメージ)を検討した。
- ② 脂質ラフト分画内でのCXCR4とLyn, p-Lynの発現とCXCR4とLynの結合の有無を調べた。(超遠心法、免疫沈降法(IP))。
- ③ メチル-β-シクロデキストリンを用いてCML細胞の脂質ラフトを破壊、あるいは、Src阻害剤およびsiRNA法(リポフェクション法)を用いてLynを阻害した後、各々CXCR4発現量の変化を検出した。
- ④ トランスウェルプレートを用いた細胞遊走試験を行い、遊走能の変化についても検討した。脂質ラフトマーカには、FlotillinおよびGM1を用いた。

## 4. 研究成果

上記の検討の結果、下記の知見を得た。

- ① チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)によるCML細胞のCXCR4の発現上昇および活性化は、細胞膜の脂質ラフト上でのインテグリンやLynとの相互作用によって生じる。インテグリン阻害、Lyn阻害あるいは脂質ラフトの破壊は、CXCR4の発現および活性を抑制する。
- ② CXCR4阻害剤とインテグリン阻害剤は、骨髄微小環境の重要な要素である低酸素条件下でCML細胞と骨髄間質細胞間の遊走・定着シグナルを遮断し、骨髄微小環境内でのCML細胞のアポトーシス抵抗性を抑制する。

## 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8件)

1. Tabe Y, Jin L, Iwabuchi K, Wang R, Ichikawa N, Miida T, Cortes J, Andreeff M, Konopleva M. Role of stromal microenvironment in nonpharmacological resistance of CML to imatinib through Lyn/CXCR4 interactions in lipid rafts. *Leukemia* 2012;26:883-92.(査読有)
2. Tabe Y, Konopleva M, Andreeff M, Ohsaka A. Effects of PPAR $\gamma$  Ligands on Leukemia. *PPAR research* 2012 (review, in press, 査読有).
3. 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. *Br J Cancer*. 2011;104:91-100. (査読有)
4. Jin L, Tabe Y, Kojima K, Zhou Y, Pittaluga S, Konopleva M, Miida T, Raffeld M. MDM2 antagonist Nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma. *Cancer Lett*. 2010;229: 161-170. (査読有)
5. Kojima K, Konopleva M, Tsao T, Andreeff M, Ishida H, Shiotsu Y, Jin L, Tabe Y, Nakakuma H. Selective FLT3 inhibitor FI-700 neutralizes Mcl-1 and enhances p53-mediated apoptosis in AML cells with activating mutations of FLT3 via Mcl-1/Noxa axis. *Leukemia* 2010; 24: 33-43. (査読有)
6. Tabe Y, Sebasigari D, Jin L, Rudelius M, Davies-Hill T, Miyake K, Miida T, Pittaluga S, Raffeld M. The MDM2 antagonist Nutlin-3 displays anti-proliferative and pro-apoptotic activity in mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res*. 2009;15: 933-942. (査読有)
7. Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: Mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat*. 2009;13:103-113. (査読有)
8. 田部陽子: 白血病診断と分子標的療法に関する検討. *臨床病理* Vol. 57 No. 2: 137-145. 2009 (査読有)

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Tabe Y, Jin L, Konopleva M, Andreeff M, Ohsaka A, Miida T. Bone marrow-derived adipocytes promote differentiation, proliferation and survival of acute monoblastic leukemia cells. American Society of Hematology Annual Meeting, December 2011(San Diego, USA) (査読有)
2. Jin L, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Miida T, Konopleva M, Andreeff M, Tabe Y. The anti-proliferative effects of tricyclic coumarin GUT-70 as an Hsp90 inhibitor in mantle cell lymphoma. American Society of Hematology Annual Meeting, December 2011(San Diego, USA) (査読有)
3. Tabe Y, Shi Y, Zeng Z, Jin L, Zhou Y, Miida T, Andreeff M, Konopleva M. TGF- $\beta$  neutralizing antibody 1D11 inhibits LIF-JAK-Stat3 signaling and enhances cytarabine induced apoptosis in AML cells in bone marrow microenvironment. American Society of Hematology Annual Meeting, December 2011(San Diego, USA) (査読有)
4. Tabe Y, Jin L, Miida T, Andreeff M, Konopleva M. Growth-inhibitory effects of a Class IA PI3K inhibitor GDC-0941 are modulated by hypoxia-induced mTOR pathway activation in mantle cell lymphoma. American Society of Hematology Annual Meeting, December 2011(San Diego, USA) (査読有)
5. Jin L, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Andreeff M, Miida T, Tabe Y. The Anti-Proliferative Effects of Tricyclic Coumarin GUT-70 as An Hsp90 Inhibitor In Mantle Cell Lymphoma. American Society of Hematology Annual Meeting. December 2010(Orlando, USA) (査読有)
6. Tabe Y, Jin L, Kojima K, Zhou Y, Pittaluga S, Konopleva M, Miida T, Raffeld M. MDM2 antagonist nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma American Society of Hematology Annual Meeting. December 2010(Orlando, USA) (査読有)
7. Jin L, Tabe Y, Miida T, Andreeff M, Konopleva M. Efficacy and Mechanisms of Apoptosis Induction by Simultaneous Inhibition of PI3K with GDC-0941 and Blockade of Bcl-2 (ABT-737) or FLT3 (Sorafenib) In AML Cells In the Hypoxic Bone Marrow Microenvironment. American Society of Hematology Annual Meeting. December 2010(Orlando, USA) (査読有)
8. Zhou Y, Tabe Y, Jin L, Miida T, Zeng Z, Andreeff M, Konopleva M. Inhibition of TGF- $\beta$  and CXCR4 signaling promotes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells co-cultured with stromal cells American Society of Hematology Annual Meeting. December 2010(Orlando, USA) (査読有)
9. Jin L, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Andreeff M, Miida T, Tabe Y. The Tricyclic Coumarin GUT-70 Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Preferentially in Mantle Cell Lymphomas with Mutant p53 New Orleans, U.S.A. (12/5-8), Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), San Francisco, 2009 (査読有)
10. Rudelius M, Pittaluga S, Sebasigari D, Davies-Hill T, Klier M, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Tabe Y, Raffeld M. PTEN Regulates SYK-Directed AKT Activation in MCL New Orleans, U.S.A. (12/5-8), Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), San Francisco, 2009 (査読有)
11. Kojima K, Konopleva M, Tsao T, Andreeff M, Ishida H, Shiotsu Y, Jin L, Tabe Y, Nakakuma H. Selective FLT3 Inhibitor FI-700 Neutralizes Mcl-1 and Enhances p53-Mediated Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells with Activating Mutations of FLT3 Via Mcl-1/Noxa Axis New Orleans, U.S.A. (12/5-8), Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), San Francisco, 2009 (査読有)
12. 田部陽子, 金林花, 三井田孝. 低酸素骨髄微小環境下での残存白血病に対するPI3KとFLT3阻害の抗腫瘍作用機序. 日本臨床検査医学会学術集会; 岡山, 11月2011年(査読有)
13. 田部陽子. 白血病細胞の増殖、分化、細胞死および骨髄微小循環. 前臨床血液研究会; 東京, 11月2011年
14. 田部陽子. 白血病細胞の増殖、分化、細胞死および骨髄微小環境. 日本検査血液学会学術集会; 岡山, 7月2011年
15. 田部陽子. マントル細胞リンパ腫の分子標的. 東海大学悪性リンパ腫研究会; 神奈川, 7月2011年
16. 金林花, 周奕欣, 田部陽子, 三井田孝. チ

ロシニキナーゼ阻害剤による慢性骨髄性白血病のCXCR4 シグナル活性化と骨髄定着. 第72回日本血液学会学術集会; 横浜、9月2009年(査読有)

17. 田部陽子, 金林花, 周奕欣, 三井田孝. マントル細胞リンパ腫に対するプロテアソーム阻害剤BortezomibとMDM2 阻害剤Nutlin-3 の抗腫瘍相乗効果. 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 札幌市 (8/26-29), 臨床病理 Vol.57 補冊: 201, 2009 (査読有)

〔図書〕(計1件)

1. 田部陽子, 佐藤尚武, 田中千晶. 白血球分類のナビゲータ. 61 ページ, シスメックス株式会社. 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/labobyotaikaiseki/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田部 陽子 (TABE YOKO)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70306968

### (2) 研究分担者

金 林花 (JIN LINHUA)  
順天堂大学・医学部・ポスドクフェロー  
研究者番号: 90531955

岩渕 和久 (IWABUCHI KAZUHISA)  
順天堂大学・医療看護学部・教授  
研究者番号: 10184897

富川 (市川) 直樹 (TOMIKAWA NAOKI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80468587