

## 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25年 5月 23日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790523

研究課題名（和文） 白血病幹細胞に対する骨髄微小環境を模した抗白血病薬感受性検査法の開発

研究課題名（英文） New drug sensitivity test for leukemia mimicking bone marrow microenvironment in hypoxia

研究代表者

伊藤 真以（ITO MAI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70415545

研究成果の概要（和文）：白血病の治療には、抗白血病薬の的確な薬剤感受性検査法による評価が必要である。従来の通常酸素下での細胞培養系ではなく、生体内の骨髄微小環境を模した低酸素培養系の方が白血病幹細胞の薬剤感受性を的確に評価できるのではないかと考えた。本研究では、低酸素培養系が白血病幹細胞における HIF 蛋白の発現誘導および Notch シグナル、NF-κB シグナルおよび mTOR シグナルに影響を及ぼすことを明らかにし、新規培養法を用いた薬剤感受性試験の基礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：For treatment of leukemia, it is necessary to assess antileukemia agent by precise drug sensitivity test. We assumed that cell culture system in hypoxia mimicking bone marrow microenvironment is useful for assess the effect than the system in normoxia. In this study, we found that hypoxia culture system upregulated HIF protein expression as well as affected Notch, NF-κB, and mTOR signaling in leukemia stem cells. We established a basis for a new drug sensitivity test in hypoxia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学、白血病、低酸素

### 1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、造血幹細胞が腫瘍化して生じた白血病幹細胞の自己複製能亢進と分化停止により、無制限に白血病細胞の増殖をきたす疾患である。治癒率を向上させるには、白血病細胞の単なる増殖抑制ではなく、白血

病幹細胞を制御する治療戦略が必要である。従来の薬剤感受性試験は、細胞培養装置（炭酸ガス5%、酸素濃度21%）内の培養プレートを用い、種々の濃度の抗白血病薬を添加した液体培地で白血病細胞を培養して、数日後に細胞数測定などにより、増殖に対する効果を評価した。しかしながら、この結果と

実際の臨床効果とは必ずしも一致しないことが知られている。

## 2. 研究の目的

近年、白血病幹細胞は、骨髄の内骨膜領域の骨髄ニッチと呼ばれる微小環境に存在することが明らかにされた。この領域は酸素濃度が5%以下と低酸素状態であり、白血病幹細胞はNotchリガンド蛋白などを発現する骨髄支持細胞に接して存在すると言われている。

従来法による薬剤感受性試験の結果と、実際の臨床効果とに乖離が見られることの原因は、従来の21%酸素下での培養系では、実際の骨髄ニッチを反映していないためではないかと考えた。そこで、白血病幹細胞の培養条件を骨髄ニッチに近い条件にした新規培養法、即ち、低酸素環境下、かつNotchリガンド刺激が入った状態において、薬剤感受性試験を行う方が、より生体内での現象を正しく反映するのではないかと考えた。

本研究は、骨髄微小環境を模した低酸素培養が、白血病幹細胞に及ぼす効果について解析を行う。更に、低酸素下でNotchリガンド刺激のある新規培養法にて、白血病幹細胞に対する治療薬の効果を予測する薬剤感受性検査法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄性白血病細胞株4種およびリンパ性白血病細胞株3種を材料とする。低酸素骨髄微小環境を模するため、低酸素細胞培養インキュベータを使用し、骨髄支持細胞の代用として遺伝子組み換えNotchリガンド蛋白(Delta1)を底面にコーティングした培養プレートを用いる。このように、低酸素下(酸素濃度1%)で、Notchリガンド刺激がある新規培養法にて、短期的な細胞増殖能、あるいは白血病幹細胞の自己複製能を評価する二次コロニーの形成能を検討する。従来法と比較し、新規培養法では、白血病幹細胞の自己複製能の亢進が認められるか否かを調べる。また、この時に生じる遺伝子発現の変化を定量RT-PCR法を用いて調べ、更に細胞内シグナル伝達因子の発現量および活性化の変化をイムノブロット法で解析し、差異をもたらした分子機序を明らかにする。

(2) 新規培養法と、従来の培養法とで、Notch阻害薬(ガンマセクレターゼインヒビター)や抗白血病薬を添加し、薬剤感受性検査を行うことにより、細胞増殖や感受性に差異が生じるかどうか、即ち従来法と比較し、新規培養法が生体内の状態をより反映しているか否かを検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素培養系およびNotchリガンド(Delta1)刺激による細胞増殖に対する作用

通常酸素(Normoxia)と低酸素(Hypoxia)を比較すると、低酸素により増殖が抑制されたもの、変化がなかったもの、あるいは増殖が促進されたものがあり、細胞によって多様な反応を示した。この結果は、Delta1をコーティングした培養プレートを用いても、細胞増殖効果に変化は見られなかった。

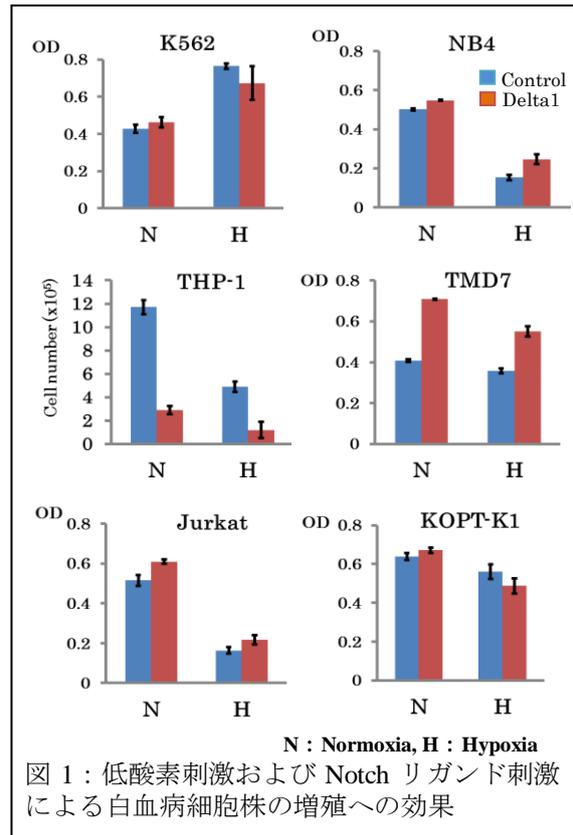


図1: 低酸素刺激およびNotchリガンド刺激による白血病細胞株の増殖への効果

### (2) 低酸素培養系およびNotchリガンド(Delta1)刺激による自己複製能への効果

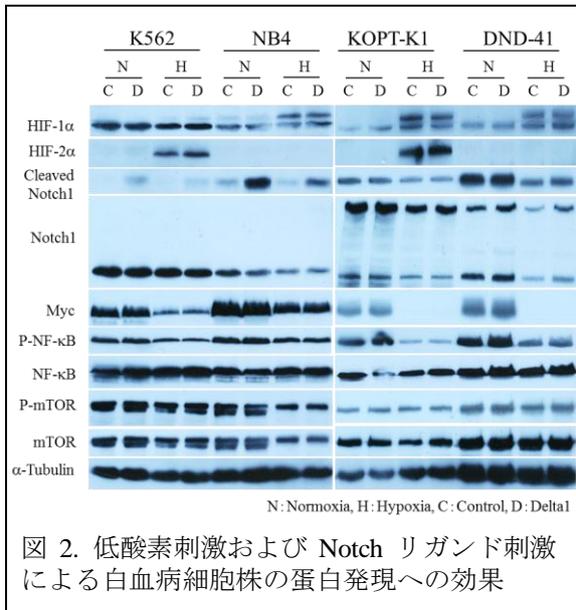
通常酸素または低酸素下において液体培養を行った後、メチルセルロース培地によるコロニーアッセイを開始し、形成されたコロニー数をカウントした。また、コロニー形成率からCCR(Clonogenic Cell Recovered)を求めることにより、自己複製能の評価を行った。その結果、メチルセルロース培地中でコロニーが形成された細胞株すべてにおいて、低酸素刺激ではコロニーの形成が抑制され、自己複製能が抑制される結果となった。この結果は、Delta1があっても違いは見られなかった。

### (3) 低酸素培養系およびNotchリガンド(Delta1)による蛋白発現および細胞内シグ

## ナル伝達系に対する作用

低酸素条件下にて白血病細胞株を培養し、蛋白発現および細胞内シグナル伝達系への変化をイムノブロット法により解析した。その結果、低酸素刺激によりすべての細胞株において HIF-1 $\alpha$  の発現誘導が認められ、一部の細胞株では、HIF-2 $\alpha$  の発現が著増するものがあった。Notch シグナルに関しては、低酸素刺激により活性型分子である Cleaved Notch 蛋白および Notch シグナルの標的遺伝子である Myc 蛋白の発現低下が認められた。また、NF- $\kappa$ B シグナル経路および mTOR シグナル経路についても抑制傾向を示すものがあった。この培養系に Delta1 を作用させ骨髄微小環境を模した培養系においても、結果に違いは見られなかった。

以上より、低酸素刺激は、白血病細胞に対し、HIF 蛋白の発現誘導をもたらす一方、Notch シグナル、NF- $\kappa$ B シグナル、mTOR シグナルを抑制する傾向にあることがわかった。



### (4) 薬剤感受性検査

骨髄ニッチを再現するため、骨髄支持細胞の代用として Notch リガンド蛋白をコーティングした培養プレートを用い、低酸素環境下にて細胞培養を行ったが、白血病幹細胞の自己複製能の亢進は見られなかった。in vitro において、より生体内の骨髄を模した条件で白血病細胞の薬剤感受性を評価するには、Notch リガンド蛋白だけではなく、細胞外マトリックスの存在など、更なる工夫が必要であることがわかった。

### 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 7 件)

- ① Ono A, Oike R, Okuhashi Y, Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Comparative effects of PP242 and rapamycin on mTOR signalling and NOTCH signalling in leukemia cells. *Anticancer Res* 33; 809-13: 2013. 査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482748>
- ② Kanamori E, Itoh M, Tojo N, Koyama T, Nara N, Tohda S. Flow cytometric analysis of Notch1 and Jagged1 expression in normal blood cells and leukemia cells. *Exp Ther Med* 4; 397-400: 2012. 査読有.  
DOI: 10.3892/etm.2012.633
- ③ Ono A, Okuhashi Y, Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncology Lett* 4; 205-8: 2012. 査読有.  
DOI: 10.3892/ol.2012.741
- ④ Takahashi Y, Ishigaki T, Okuhashi Y, Ono A, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effects of BMP4 on the growth and clonogenicity of human leukemia and lymphoma cells. *Anticancer Res* 32; 2813-7: 2012. 査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753742>
- ⑤ Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effects of combination of Notch inhibitor plus Hedgehog inhibitor or Wnt inhibitor on growth of leukemia cells. *Anticancer Res* 31; 893-6: 2011. 査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498710>
- ⑥ Kawaguchi-Ihara N, Okuhashi Y, Itoh M, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the self-renewal capacity of human leukemia cells by sonic hedgehog protein. *Anticancer Res* 31; 781-4: 2011. 査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498696>
- ⑦ Okuhashi Y, Itoh M, Arai A, Nara N, Tohda S.  $\gamma$ -Secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. *Anticancer Res* 30; 4071-4: 2010. 査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036721>

[学会発表] (計 8 件)

研究者番号：70415545

- ① 伊藤真以、奥橋佑基、高橋祐介、大野彩、東田修二. 骨髓微小環境を再現した低酸素培養が白血病細胞に及ぼす影響. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 2012 年 12 月 2 日.
- ② 東田修二、大野彩、高橋祐介、奥橋佑基、伊藤真以. チロシンキナーゼ阻害薬投与中の慢性骨髄性白血病患者における微少残存病変検出の 3 種の遺伝子検査法の比較. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 2012 年 12 月 2 日.
- ③ 奥橋佑基、大野彩、高橋祐介、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞における Notch シグナルの mTOR シグナルへの作用. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 2012 年 12 月 2 日.
- ④ 高橋祐介、奥橋佑基、大野彩、伊藤真以、東田修二. Eph/ephrin の白血病細胞の増殖に対する作用. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 2012 年 12 月 2 日.
- ⑤ 大野彩、奥橋佑基、高橋祐介、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞の増殖に対する mTOR 阻害剤の作用. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 2012 年 12 月 2 日.
- ⑥ 奥橋佑基、大野彩、高橋祐介、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞の増殖における Hedgehog シグナルと Notch シグナルの相互作用. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. 岡山. 2011 年 11 月 19 日.
- ⑦ 高橋祐介、石垣智寛、奥橋佑基、大野彩、伊藤真以、東田修二. BMP4 の白血病細胞の増殖に対する作用. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. 岡山. 2011 年 11 月 19 日.
- ⑧ 大野彩、高橋祐介、奥橋佑基、伊藤真以、東田修二. 骨髓増殖性腫瘍における JAK2 V617F 変異の種々の検査法の比較. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. 岡山. 2011 年 11 月 20 日.

- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし

[図書] (計 0 件)

[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.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab-J.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 真以 (ITO MAI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教