

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 6月20日現在

機関番号：83904

研究種目：若手B

研究期間：2010～2012

課題番号：22790907

研究課題名（和文） 骨髄微小環境での白血病幹細胞の治療抵抗性の機序解明とそれに基づく新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a new therapeutic approach against chemo-resistance of leukemic stem cells by bone marrow microenvironment

研究代表者

宮田 泰彦 (MIYATA YASUHIKO)

名古屋医療センター 血液内科医長

研究者番号：40467303

研究成果の概要（和文）：CML由来細胞株は骨髄間葉系細胞と接着することにより幹細胞に類似した dormancy を獲得し薬剤耐性が誘導された。これらの細胞においては抗アポトーシス活性を持つ BCL-2 や p53 の高発現が認められ、これが薬剤耐性の機序として考えられ、これらを標的とする分子標的療法の可能性が示された。

また骨髄間葉系細胞との接着により BCR-ABL 蛋白の高発現および BCR-ABL mRNA の半減期延長が認められた。このことは細胞接着が mRNA の post-transcriptional regulation に関与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Direct contact with bone marrow stromal cells provides CML-derived cell lines with dormancy similar to stem cells and induced-drug resistance. In these cells, up-regulation of anti-apoptotic protein BCL-2 and p53 was observed and was thought to lead to this resistance, suggesting that the molecular targeted therapy toward these proteins could be reasonable. Moreover, up-regulation of BCR-ABL protein and elongation of BCR-ABL mRNA were observed by contact with stromal cells. This indicates that cell-to-cell contact may be involved in post-transcriptional regulation of mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

白血病に対する治療は新規抗癌剤の開発やその投与方法の改良により、8割以上の患者で完全寛解を達成できるようになった。しかしながらその半数以上で再発を来し、長期予後は不良である。再発は治療後にもわずか

に残存する白血病幹細胞 (leukemic stem cell:LSC) より生じると考えられている。LSC は正常造血幹細胞と同様に、間葉系細胞や骨芽細胞などに囲まれた骨髄ニッチェに局在している。そこで接着因子や液性因子からシグナル伝達を受け、環境依存性薬

剤耐性 (Environment-mediated Drug Resistance:EMDR) による“一次性”治療抵抗性を示す。そしてEMDRにより治療を生き延びたLSCには遺伝子異常が加わりやすいため、“二次性”治療抵抗性を獲得してさらに治療抵抗性なる。そしてこのLSCから増殖しニッシュから離れた非LSC白血病細胞も耐性化する。以上より、治療早期からEMDRによるLSCの治療抵抗性を解除することがLSCの耐性化抑制、そして根絶に重要である。これまでLSCを含む微小残存病変を根絶するため、抗腫瘍薬を増量することや多剤併用することで治療強度を上げることが行われてきた。しかし、これらは骨髄抑制を始めとする副作用を強めるため時には致命的な合併症を引き起こしてしまう。そこで治療強度を上げることなく効率的にLSCの根絶を行うLSC特異的治療法が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、治療強度を上げることなく効率的にLSCの根絶を行うLSC特異的治療法を可能とするために、LSCに治療抵抗性をもたらしめている機序を明らかにし、白血病のさらなる治療率向上に貢献する。

3. 研究の方法

LSCの検討には免疫不全動物が用いられるが、時間や手間が非常にかかる。そこで分子細胞学的にLSCの耐性化の機序を明らかにするために、*in vitro*で簡便に評価できる実験系の構築を検討した。骨髄の微小環境を再現するため、マウス骨髄間葉系細胞由来ストローマ細胞株MS-5などを用いてヒト白血病由来細胞株との共培養を行い、EMDRの機序の検討を行った。

4. 研究成果

ヒト慢性骨髄性白血病(Chronic Myeloid Leukemia:CML)由来細胞株で、共培養により殆どの細胞がHSCのようにMS-5の下に潜り込む現象“pseudoemperipolesis”を示す細胞株NC02を見いだした。この細胞株の細胞周期解析では静止期分画と考えられるHoechst33342 low/Pyronin Y low分画の増加も認めた。Pseudoemperipolesisおよび静止期分画の増加はLSCの特徴であり、これらは“pseudoemperipolesis”を示さないCML細胞株K562では認めなかった。以上よりこの共培養系はLSCのEMDRを検討する*in vitro*モデルになりうると考えられた。そこで共培養下でCML細胞株の薬剤感受性が低下するかを検討した。MS-5との共培養下ではCMLに対する分子標的薬イマチニブ(STI)のIC50はNC02において3倍程度上昇していた。このIC50上昇はアポトーシス抑制によるものかどうか検討した。MS-5と

共培養を開始24時間後、ほとんどの細胞がpseudoemperipolesisをきたした状態でSTIを添加した。48時間後にフローサイトメーターを用いてCML細胞株でのアポトーシスについて調べた。MS-5と共培養したNC02ではK562と比べ有意にアポトーシスの抑制を認めた。このアポトーシス抑制は孔付きチャンバーで接着を阻害することにより認められなくなった。以上よりMS-5より産生される液性成分は薬剤耐性をもたらさず、MS-5と腫瘍細胞の直接の接着により薬剤耐性が誘導されると考えられた。

①BCL2発現亢進を伴うアポトーシス抑制による薬剤耐性

そこでMS-5の下にpseudoemperipolesisを起こしている細胞におけるアポトーシス関連蛋白の発現量を検討したところ、抗アポトーシス分子であるBCL2の発現が接着依存的に亢進しており、BCL2の高発現が薬剤耐性に関わっている可能性が考えられた。BCL2阻害薬であるABT-737併用によりpseudoemperipolesisを起こしている細胞のアポトーシスを回復させることができ、BCL-2阻害薬によるLSCを標的とした分子標的療法の可能性が示された。

②p53-p21経路の活性化による細胞周期を介した薬剤耐性

近年、造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell:HSC)の幹細胞性についての制御機構が明らかにされつつあるが、これらはLSCにも共通する可能性がある。p53やp21といったアポトーシスや細胞周期の制御に重要な役割を担っている分子がHSCの幹細胞性、特に静止性に関わっていることが報告されている。MS-5との共培養においても静止期細胞の増加を認めたことから、これらの分子の発現量について検討した。MS-5との共培養によりp53およびp21の発現量は増加していたが、同じくCDK inhibitorであるp27の発現量は変わらなかった。CML細胞株におけるp53およびp21には変異は認められなかった。

③CML特異的キメラ蛋白BCR-ABL量の増加による薬剤耐性

CMLの薬剤耐性の機序の一つとしてCMLにおける責任分子であるBCR-ABLキメラ蛋白の発現について検討した。BCR-ABLの発現は接着により亢進していた。しかしながらMS-5培養液上清による培養下においても軽度の発現が認められた。このBCR-ABL発現量がどのように制御されているかを検討するためにBCR-ABL mRNA量を定量的PCR法にて測定したところ、MS-5との接着によりBCR-ABL mRNA量は増加していた。RNA

の合成が亢進するのかそれとも分解が抑制されるのかを検討するために RNA Polymerase II 阻害薬である α -Amatinin 処理を行い定量的 PCR 法にて BCR-ABL mRNA 量を測定した。MS-5 との接着により BCR-ABL mRNA の半減期は著明に延長し、BCR-ABL mRNA の分解が抑制されている可能性が示された。

考察：薬剤耐性には様々な分子や機序が関わっていることが示されている。今回は MS-5 への影響を抑えるため、抗腫瘍効果が腫瘍細胞特異的となるような CML 細胞株とイマチニブ (STI) を用いた実験系にて検討を行った。そのため、BCR-ABL の発現量の制御は CML において特異的な現象と考えられるが、他の病型の白血病や腫瘍でもこのような機序により腫瘍の生存や増殖にとって重要な分子の制御を行っている可能性はある。RNA 干渉法やエピジェネティックな手法を含めこれらの分子の制御を解除するような治療法により治療抵抗性を克服出来るかもしれない。また BCL2 による抗アポトーシス効果については最も臨床応用に向いていると思われる。現在、BCL2 阻害薬やアンチセンス RNA による臨床試験が行われており、他の抗腫瘍薬との併用により LSC のアポトーシス感受性を高め薬剤耐性を解除出来る可能性がある。

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 5 件)

倉橋 信悟

PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*. 2011 30:1822-30.

中尾 典彦

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol*. 2010 177(2):547-54.

水野 紘樹

Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib. *Leukemia*. 2012 26(10):2269-76

萩原 和美

PROX1 overexpression inhibits protein kinase C beta II transcription through

promoter DNA methylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 51(36): 1024-36.

Liu Yan

Akt phosphorylates the transcriptional repressor bml1 to block its effects on the tumor-suppressing ink4a- arf locus. *Science Signaling*. 2012 5:ra77

[学会発表] (計 12 件)

齊藤 繁紀

Mesenchymal stem cells overexpressing a dominant negative inhibitor of CCL2 attenuated lung injury. 第72会日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜 (横浜)

倉橋 信悟

PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. 第72会日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜 (横浜)

安田 貴彦

Lymphoid transcription factor Pax5 is regulated by MAP kinase signal. 第72会日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜 (横浜)

中山 享之

Mast cells promote the growth of Hodgkin tumor by modifying the tumor microenvironment. 第72会日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜 (横浜)

倉橋 伸悟

PAX5-PML Acts as a Dual Dominant-Negative Form of PAX5 and PML 52nd ASH Annual Meeting 2010年12月4-7日 オーランド

宮田 泰彦

Clinical characteristics of adult AML refractory to the first induction therapy in our institute 第73会日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋

山口 高弘

Phase I Study of Clofarabine (JC0707) in Adult Japanese Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) 53th ASH Annual Meeting 2011年12月10-12日 サンディエゴ

宮田 泰彦

白血病細胞株において Bcl-2 の発現はストローマ細胞との接着により亢進し、薬剤耐性を誘導する. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 ロイトン札幌(札幌)

萩原 和美
血液腫瘍細胞に対するベンダマスチンとキナーゼ阻害剤併用による殺細胞効果の検討. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 ロイトン札幌 (札幌)

宮田 泰彦
Retrospective analysis of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma in rituximab era. 第 74 回日本血液学会 2012 年 10 月 19-21 日 京都国際会議場 (京都)

萩原 和美
Cytotoxicity of bendamustine combined with new generation kinase inhibitors in lymphoid cell lines. 第 74 回日本血液学会 2012 年 10 月 19-21 日 京都国際会議場 (京都)

萩原和美
Cytotoxic Effect of Bendamustine Combined with Kinase Inhibitors in Hematologic Cell Lines. 54th American Society of Hematology Annual Meeting 2012 年 12 月 8-11 日 アトランタ (米国)

[図書] (計 2 件)
症例から学ぶ メディカルオンコロジー
医学ジャーナル社 2011 年 10 月発行
血液癌 ホジキンリンパ腫 (臨床病期 II)
ABVD 療法で長期寛解例

血液内科 第 64 巻第 1 号 (2012 年 1 月発行)
特集 血液腫瘍に対する重要な臨床試験の意義と診療・研究へのインパクト
Rituximab 併用化学療法が奏効した進行期濾胞性リンパ腫患者に対する rituximab 維持療法の比較試験: PRIMA Study

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
宮田 泰彦 (MIYATA YASUHIKO)