

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590662

研究課題名(和文) 症例に応じた分子標的治療を目指した急性白血病幹細胞の定量と特性の検査法の開発

研究課題名(英文) Tests for quantity and characteristics of acute leukemia stem cells to search molecular-targeted therapies suitable for each case

研究代表者

東田 修二 (Shuji, TOHDA)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80251510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞の培養系で、種々の幹細胞制御シグナルをリガンドで活性化、もしくは阻害薬や siRNA で抑制して、増殖や蛋白活性化を解析し、各シグナルの役割を調べた。Hedgehog 活性化は短期増殖に影響を与えないが、コロニー形成能を有する細胞の自己複製を促進した。BMP 活性化は、一部の細胞の短期増殖を促進したが、コロニー形成能を抑制した。阻害薬や siRNA による Notch、Hedgehog、Wnt、mTOR、HIF シグナルの抑制は細胞増殖を抑制した。これらのシグナル間には相互に関連があることが分かった。フローサイトメトリーによる Notch の発現解析では幹細胞の定量はできなかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of stemness-related signals in the growth of leukemia cells, the signals were activated by the ligand-stimulation and were suppressed by adding the inhibitors or siRNA (small interfering RNA) in culture systems of leukemia cells. Activation of Hedgehog signal did not affect the short-term growth while it promoted the self-renewal of clonogenic cells. Activation of BMP (Bone Morphogenetic Protein) signal promoted the growth of some samples while it suppressed the colony formation. Suppression of Notch, Hedgehog, Wnt, mTOR (mammalian Target of Rapamycin), and HIF (Hypoxia Inducible Factor) signals by adding each inhibitor or siRNA suppressed the growth. We found the cross-talk between these signals. The analysis of Notch expression by flow cytometry could not quantitate the leukemia stem cells.

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：急性白血病 白血病幹細胞 分子標的治療 薬剤感受性検査 Notch

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性白血病を治癒させるには、白血病細胞の単なる増殖抑制だけでなく、白血病幹細胞を根絶する必要がある。そのためには白血病幹細胞の特性を理解し、それに関わる分子を標的とする治療戦略が必要である。

(2) 正常造血幹細胞を制御する分子は、いくつか報告されているが、白血病細胞でのこれらの分子の役割は明らかではなく、また、白血病幹細胞の特性や数を調べる検査法は確立していない。

2. 研究の目的

(1) 造血幹細胞の制御シグナルを構成する Notch, Hedgehog, Wnt, BMP, mTOR, HIF などの分子が、白血病幹細胞の自己複製や増殖、分化に与える影響を明らかにする。

(2) 上記の目的のために、白血病幹細胞の特性の検査法や定量法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株の培養系に、上記の各シグナルを活性化するリガンドを添加して、細胞増殖、コロニー形成、遺伝子発現、細胞内蛋白の発現や活性化を調べ、そのシグナル活性化がこれらの与える作用を明らかにする。

(2) 逆に、白血病細胞株の培養系に、上記の各シグナルを抑制するシグナル阻害薬や siRNA を添加し、そのシグナルの抑制が与える作用を明らかにする。

(3) 幹細胞を定量する検査法として、液体培養後の細胞数とコロニー形成能を掛け合わせた数値を求める。さらに、フローサイトによる CD34+CD38- 分画や Notch1 陽性分画の計測を行う。

4. 研究成果

(1) Hedgehog シグナルの白血病幹細胞に対する作用 (論文 9): Sonic hedgehog 蛋白刺激による白血病細胞の Hedgehog シグナル

活性化は、短期的増殖能には有意な影響は与えないが、一部の細胞株でコロニー形成能を有する細胞の自己複製を促進することを報告した。

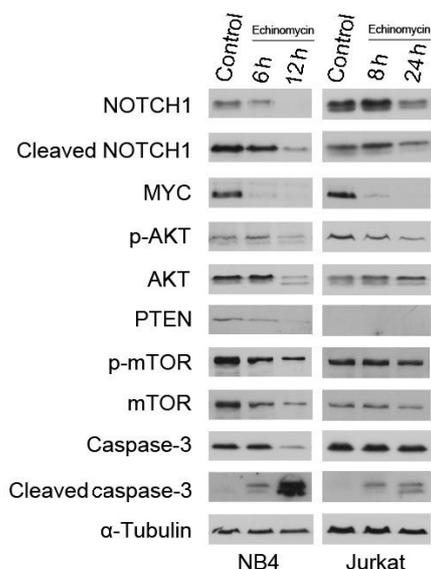
(2) BMP シグナルの白血病幹細胞に対する作用 (論文 5): BMP 4 蛋白刺激による BMP シグナル活性化は、一部の細胞株の短期増殖は促進するが、多くの細胞株ではコロニー形成能を抑制し、幹細胞レベルには抑制的に作用することを見出した。

(3) Notch, Hedgehog, Wnt シグナルの抑制による白血病細胞の増殖に対する作用 (論文 10): Notch 阻害薬であるガンマセクレターゼインヒビターに、Hedgehog 阻害薬シクロパミンもしくは Wnt 阻害薬ケルセチンと一緒に白血病細胞培養系に添加し、増殖に対する効果を調べた。両者の添加は増殖抑制効果を相加的に増強すること、シクロパミンやケルセチンの添加は Hedgehog や Wnt シグナルの阻害だけでなく、Notch シグナルをも抑制することを明らかにした。

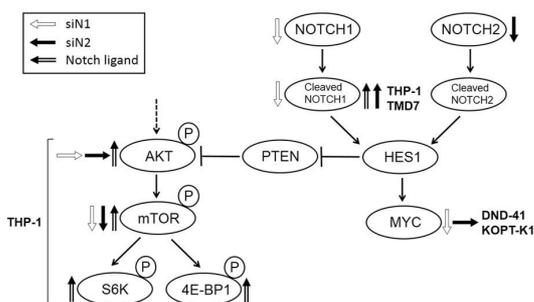
(4) mTOR シグナル抑制による白血病細胞の増殖に対する作用 (論文 3): mTOR シグナル阻害剤であるラパマイシンや PP242 を白血病細胞の培養系に添加すると、白血病細胞のアポトーシス誘導を介した増殖抑制をきたした。一部の細胞では PP242 添加により、Notch シグナルが活性化することを見出した。なお、上記の種々のシグナル活性化や抑制の実験を、患者由来の白血病細胞を用いて行ったが、検討数が不十分であり、まとまった結果は出ていない。

(5) HIF シグナル抑制による白血病細胞の増殖に対する作用 (論文 2): 白血病幹細胞は骨髄の低酸素環境下に存在する。白血病細胞は通常酸素下でも HIF (低酸素誘導因子) を発現することを見出した。HIF の機能阻害薬であるエキノマイシンを白血病細胞の培養系に添加すると、細胞増殖を抑制してアポトーシスを誘導し、さらには Notch シグナル

をも抑制した（下図）。



(6) siRNA による *NOTCH* 遺伝子のノックダウンの白血病細胞の増殖に対する作用（論文 1）： (3)で示したように Notch 阻害薬は白血病細胞の増殖を抑制したが、その作用の特異性を確認するため、*NOTCH* 遺伝子の siRNA による *NOTCH* のノックダウンの効果調べた。*NOTCH* のノックダウンは Notch 阻害薬と同様の抑制効果を示した。*NOTCH* のノックダウンに伴い、一部の細胞株では mTOR シグナルも抑制されることを見出した（下図）。



(7) フローサイトメトリーによる Notch 蛋白の発現解析（論文 6）： 幹細胞の指標の候補である Notch 関連蛋白の、種々の白血病細胞における発現をフローサイトメトリーで解析した。白血病の病型によりその発現パターンが異なることがわかったが、Notch 発

現の強弱と幹細胞性とは関係がないと考えられた。また、CD34+CD38-分画と Notch の発現との関連もみられなかった。

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 10 件)

- Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. *NOTCH* Knockdown affects the proliferation and mTOR signaling of leukemia cells. *Anticancer Res.* 2013; 33: 4293-4298. (査読あり)
- Yonekura S, Itoh M, Okuhashi Y, Takahashi Y, Ono A, Nara N, Tohda S. Effects of the HIF1 inhibitor, echinomycin, on growth and NOTCH signalling in leukaemia cells. *Anticancer Res.* 2013; 33: 3099-3103. (査読あり)
- 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.* 2013 33:809-813. (査読あり)
- 東田修二：微少残存白血病の検出法。検査と技術。2013; 41:19-24. (査読なし)
- Takahashi Y, Ishigaki T, Okuhashi Y, Ono A, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effect of BMP4 on the growth and clonogenicity of human leukemia and lymphoma cells. *Anticancer Research.* 2012;32: 2813-2817. (査読あり)
- 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. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2012; 4: 397-400. DOI 10.3892/etm.2012.633 (査読あり)
- 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 Letters*. 2012;4:205-208 DOI 10.3892/ol.2012.741 (査読あり)

8. 東田修二：リンパ系腫瘍：造血器腫瘍の最新展開 WHO分類第4版. *臨床病理*. 2012; 60:560-564. (査読なし)

9. 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 Research* 2011;31:781-784. (査読あり)

10. 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 Research* 2011;31:893-896. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Yuki Okuhashi, Mai Itoh, Nobuo Nara, Shuji Tohda. Effects of *NOTCH* knockdown on the proliferation and mTOR signaling of mTOR signaling of T-ALL and AML cell lines. The 55th American Society of Hematology. New Orleans, LA, USA. 2013.12.7

2. Mai Itoh, Yusuke Takahashi, Yuki Okuhashi, Shuji Tohda. Effects of hypoxia on HIF, Notch, Akt, and NF- κ B signaling in leukemia cell lines. The 55th American Society of Hematology. New Orleans, LA, USA. 2013.12.9

3. 高橋祐介、奥橋佑基、伊藤真以、東田修二. 白血病細胞における Eph/ephrin 系と Notch 系との相互作用. 第60回日本臨床検査医学会学術集会、神戸、2013.11.3.

4. 東田修二. シンポジウム「血液疾患遺伝子解析の読み方のポイント」: 悪性リンパ腫の診断に必要な遺伝子解析と結果の読み方. 第13

回日本検査血液学会学術集会、高槻、2012.7.29.

5. 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小残存病変検出の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、2012.12.2.

6. 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、2012.12.2.

7. 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、2012.12.2.

8. 伊藤真以、奥橋佑基、高橋祐介、大野彩、東田修二. 骨髄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、2012.12.2.

9. 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、2012.12.2.

10. 東田修二、奈良信雄. レナリドミド著効例を含む5q-症候群の3例. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011.10.14.

11. 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、2011.11.19.

12. 高橋祐介、石垣知寛、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、2011.11.19.

13. 大野彩、高橋祐介、奥橋佑基、伊藤真以、東田修二. 骨髄増殖性腫瘍における JAK2V617F変異の種々の検出法の比較. 第58

回日本臨床検査医学会学術集会、岡山、
2011.11.20.

〔図書〕(計 1 件)

1. 東田修二：造血器腫瘍、染色体・遺伝子
検査、造血器腫瘍の検査結果の評価・解釈。
血液検査学、医学書院、東京、2012、pp27-31、
pp104-113、pp208-224.

〔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

東田 修二 (TOHDA, Shuji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授

研究者番号： 80251510

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし