

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591382

研究課題名(和文) 血液悪性腫瘍幹細胞 - ニッチを破綻させる FGF2 の創薬を目標とした最小活性部位同定

研究課題名(英文) Effects of FGF2 on the leukemia microenvironment in the bone marrow

研究代表者

中山 享之 (Nakayama, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：00456659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、FGF2で間葉系幹細胞を処理すると複数の因子発現が変化しその造血支持能力が消失することを見いだした。本研究では白血病細胞-間葉系幹細胞におけるFGF2の効果を検討した。FGF2で処理された間葉系幹細胞は、白血病細胞を支持する能力や薬剤抵抗性を付与する能力が低下した。抗がん剤とFGF2の併用効果をヒト白血病マウスにて検討したところ抗がん剤単独群と比較して脾臓サイズ及び白血病細胞の減少を認めた。しかし骨髄では残存白血病細胞は骨近くに多数集簇して逆の結果であった。以上より間葉系幹細胞に対する負の効果より骨芽細胞への正の効果が強く骨髄全体の白血病支持効果は、FGF2により増加すると結論した。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of FGF2 on interaction between leukemia cells and its microenvironment. Significantly fewer AML cells were recovered from cocultures with murine stromal monolayers treated with FGF2 than from control. FGF2 also facilitate the sensitivity of CML cells toward imatinib in the coculture. Accordingly, AML cells in cell cycle quiescent are less in FGF2-treated monolayers than control. We next treated human AML mouse model with Ara-C in combination w/wo FGF2. BM sections from FGF2-treated mice displayed thickened bone trabeculae and an increased number of leukemia cells compared to control. FGF2 did not help leukemia cells survive from Ara-C in the spleen. These observations suggest that the endosteal region consisting of osteoblasts is important for leukemia cells to survive from chemotherapy, and that FGF2 favors leukemia cell in the BM via promoting osteoblast functions.

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：血液腫瘍学 血液悪性腫瘍幹細胞 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法技術の向上により急性白血病の寛解率は、80%程度にまで向上した。しかしながら再発率が高く5年生存率は、約40%に留まる。慢性骨髄性白血病に対する治療戦略は、イマチニブの登場後、大きく変貌したがイマチニブを中止すると再燃する症例も存在することが報告されている。近年の研究から、血液悪性腫瘍幹細胞が骨髄の特定部位(微小環境:ニッチ)に存在し静止期にあることが明らかとなった。その結果、薬剤耐性を獲得し再発の原因となっている。したがって治療成績を向上させるためには血液悪性細胞に対する直接的な療法だけでは、限界があり微小環境を標的にする必要があることは明らかである。

骨髄微小環境は、CXCL12-abundant reticular (CAR) cell と名付けられた間葉系細胞から構築される。文字通り CXCL12 をはじめとする、血液細胞の未分化能の維持、もしくは分化・成熟に必要な因子を分泌するのみならず、それに最適な場をも提供する。つまり複雑なメカニズムによって造血を維持している。我々は、すでに FGF2 が間葉系幹細胞は、我々は、fibroblast growth factor (FGF) 2 が、間葉系幹細胞を神経系細胞へ可逆的に移行させることを見いだした。それと同時に造血に必須である CXCL2 をはじめとする複数の因子発現を変化させ間葉系幹細胞の造血支持能力を喪失させることを見いだした。

2. 研究の目的

以上は、正常造血幹細胞-骨髄微小環境における観察であったが、この現象が白血病幹細胞-骨髄微小環境にもあてはまるかどうかは不明である。もし FGF2 が、骨髄微小環境を変化させることによって白血病細胞に対するその支持能力を失わせるのであれば化学療法への感受性を高める併用療法として有望と考えられる。そこで in vitro および in vivo での研究を遂行した。

3. 研究の方法

in vitro では、白血病細胞-間葉系幹細胞の共培養システムを用いた。そこに FGF2 のみ、FGF2+抗腫瘍剤を添加し白血病細胞の viability や細胞周期がどのように変化するかを解析した。Viability は、トレパンブルー染色などで検討し、細胞周期は、FACS などで解析した。In vivo の解析は、ヒト白血病マウスモデル (NOG マウスにヒト ALL 細胞を移植したもの) を用いて行った。このマウスモデルに FGF2 のみ、FGF2+抗腫瘍剤を投与し各臓器(脾臓、骨髄など)の病理的变化や白血病細胞の増減等を検討した。

4. 研究成果

FGF2 で処理された間葉系幹細胞は、スト

ローマ依存性の急性白血病 cell line である TRL-01 を支持する能力が低下していた (Figure 1)。

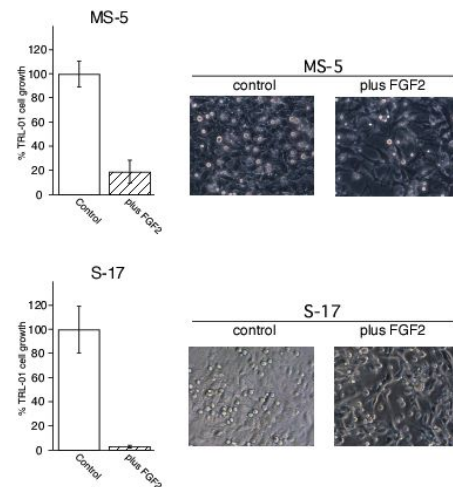


Figure 1

また慢性骨髄性白血病 cell line である NCO2 は、間葉系幹細胞上ではイマチニブ耐性となるが、FGF2 処理間葉系幹細胞上では、その抵抗性が克服された (Figure 2)。

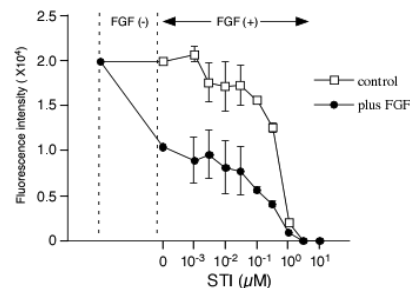


Figure 2

機序を解明するため cell cycle を調べたところ FGF2 処理間葉系幹細胞上の NCO2 では、静止期の細胞が減少していた

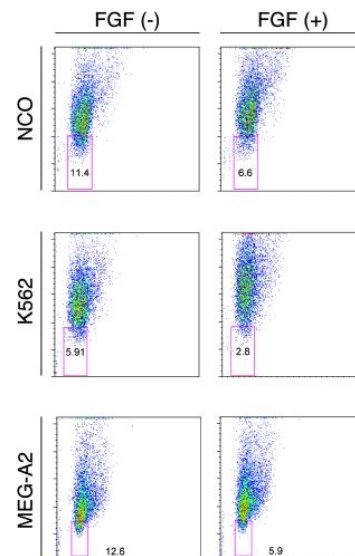


Figure 3

(Figure 3)

次にAra-cとFGF 2の併用効果をヒト白血病マウスモデルにて検討したところ併用群では、Ara-c 単独群と比較して脾臓サイズの縮小を認めた(Figure 4A, left panel)。脾臓における白血病細胞数も有意差をもって減少していた(Figure 4A, right panel)。

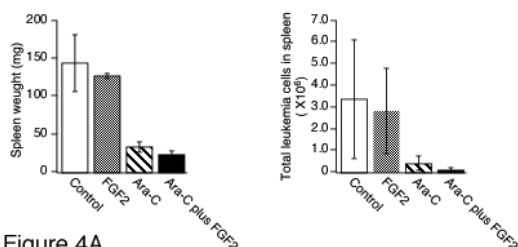


Figure 4A

しかしながら骨髄においてはAra-cとFGF 2併用群においては、Ara-c 単独群よりも残存している白血病細胞数は、多かった(Figure 4B)。

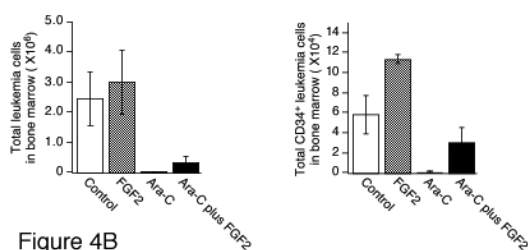


Figure 4B

骨髄における白血病細胞を免疫染色して検討したところ骨近くにある endosteal region に多数集ゾクしていた。また endosteal region 自体もコントロール群に較べて増加していた(Figure 4D)。

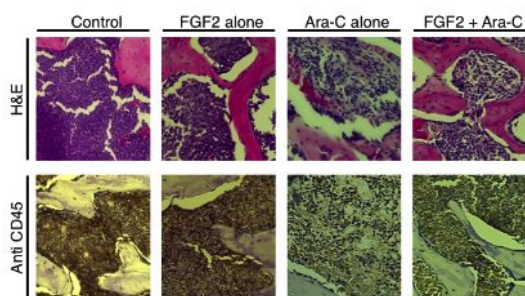


Figure 4C

以上の結果より FGF2 は、間葉系幹細胞の造血支持能力においては負の効果を示すが、骨芽細胞においてはその増殖を促すことにより正の効果を示すものと考えられた。よって骨髄自体の白血病支持効果は、FGF2 によって増加するものと結論した。

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 9 件)

Saito S, Nakayama T*, Naoe T. (10 名中 2 番目) * corresponding author
Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant negative inhibitor of CCL2 greatly attenuate bleomycin-induced lung damage.
Am J Pathol.2011; 179(3): 1088-94.
Impact factor: 5.224(査読あり)
doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.027.

Kikuchi R, Takeshita K, Nakayama T. (10 名中 6 番目)
Pitavastatin-induced angiogenesis and arteriogenesis is mediated by Notch1 in a murine hindlimb ischemiamodel without induction of VEGF.
Lab Invest. 2011; 91(5): 691-703.
Impact factor: 3.961(査読あり)
doi: 10.1038/labinvest.2011.5.

Iwase A, Goto M, Nakayama T. (14 名中 11 番目) .
Successful fertility management of a patient with factor V deficiency: planned transfusion of fresh frozen plasma under infertility treatment.
Fertil Steril. 2011; 95(6): 2124.e5-7.
Impact factor: 4.174(査読あり)
doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.011.

Mizuno H, Nakayama T*, Naoe T. (8 名中 2 番目) * corresponding author
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.
Impact factor: 8.966(査読あり)
doi: 10.1038/leu.2012.81.

Nishiwaki S, Nakayama T*, Naoe T. (1 1 名中 2 番目) * corresponding author
Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis.
Int J Hematol.2012; 96(3): 295-300.
Impact factor: 1.681(査読あり)
doi: 10.1007/s12185-012-1140-8.

Nishiwaki S, Nakayama T*, Naoe T. (1 9 名中 2 番目) * corresponding author
Dexamethasone Palmitate Successfully Attenuates Hemophagocytic Syndrome after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Macrophage-Targeted Steroid Therapy. Int J Haematol.2012; 95(4): 428-33.
Impact factor: 1.681(査読あり)
doi: 10.1007/s12185-012-1023-z.

Uchida Y, Takeshita K, Yamamoto K, Kikuchi R, Nakayama T. (11名中5番目) Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: role of visceral adipose-derived monocyte chemoattractant protein-1. Diabetes.2012; 61(6): 1552-61. Impact factor: 7.895(査読あり) doi: 10.2337/db11-0828.

Nakayama T* and Kato H. * corresponding author Cell therapy using adipose-derived mesenchymal stromal cells: current status and perspectives. Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy.2013; 59(3): 450-456. (査読あり) URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjtc/59/3/59_450/_article/-char/ja/

Nishiwaki S, Nakayama T*, Naoe T. (19名中2番目)* corresponding author Dexamethasone Palmitate Ameliorates Macrophages-Rich Graft-versus-Host Disease by Inhibiting Macrophage Functions. PLoS One. 2014; 9(5):e96252. Impact factor: 3.730 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0096252.

〔学会発表〕(計 6件)

造血支持を目的としたヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の有効性、安全性の検討 中山享之、中尾典彦、直江知樹 第73回 日本血液学会学術集会 2011年10月 名古屋

The effectiveness of macrophage-targeted therapy by dexamethasone palmitate for refractory GVHD.

Nishiwaki S, Nakayama T., Naoe T. (19名中2番目) 第74回 日本血液学会学術集会 2012年10月 京都

Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib.

Nakayama T., Mizuno H., Naoe T. 第34回 日本血栓止血学会学術集会 2012年6月 東京

Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib.

Nakayama T., Mizuno H., Naoe T.

Keystone Symposia, Vancouver, BC, Canada

Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant negative inhibitor of CCL2 greatly attenuate bleomycin-induced lung damage.

Nakayama T., Saito S., Naoe T. 第61回 日本輸血・細胞療法学会学術集会 2013年5月 横浜

Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: role of visceral adipose-derived CCL2.

Uchida Y, Takeshita K, Nakayama T. (11名中5番目) 第75回 日本血液学会学術集会 2013年10月 札幌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山享之 (NAKAYAMA Takayuki)

愛知医科大学・輸血細胞療法部・講師

研究者番号：00456659

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

直江知樹 (NAOE Tomoki)

名古屋医療センター・血液内科・院長

研究者番号：50217634