

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460492

研究課題名(和文)慢性骨髄性白血病発症における正常骨髄細胞との相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological interaction with normal bone marrow cells during the development of chronic myeloid leukemia

研究代表者

馬場 智久 (BABA, Tomohisa)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00452095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(CML)の発症最初期段階においては、その主要病巣である骨髄内において、大多数が正常の造血細胞によって占められている中に、ごく少数出現した白血病細胞が徐々に増加すると考えられる。本研究を通して、正常造血系を背景に白血病細胞が増殖し、正常造血細胞との相互作用を詳細に観察できるCMLマウスモデルを新たに確立した。さらに、このモデルを用いた解析から、発症初期過程の骨髄内において、白血病細胞から高レベルに産生される炎症性ケモカインCCL3が、選択的に正常造血幹・前駆細胞の増殖を抑制することで、白血病細胞の優位な増殖を支持する結果、CML病態を増悪させていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the initiation process of chronic myeloid leukemia (CML), a small number of transformed leukemia cells coexist with a large number of normal hematopoietic cells, gradually increasing thereafter and eventually predominating in the bone marrow space. In this study, we newly established a mouse CML model, in which we can precisely observe the expansion of leukemia cells under the normal hematopoietic system. By using this CML model, we herein demonstrated that leukemia cells produce high levels of an inflammatory chemokine, CCL3, in the BM to selectively inhibit the proliferation of normal hematopoietic stem/progenitor cells. CCL3 eventually facilitates the dominant proliferation of leukemia cells, thereby contributing to CML progression.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 造血幹細胞 炎症性ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (CML) は造血幹細胞レベルにおける骨髄増殖性疾患である。90%以上の CML 患者において、9 番染色体と 22 番染色体間での転座により生成されるフィラデルフィア染色体が認められる。染色体転座の結果、22 番染色体上の *BCR* 遺伝子と 9 番染色体上の *ABL* 遺伝子の間で遺伝子融合が起こり、恒常的に活性化されたチロシンキナーゼ活性を持つ *BCR-ABL* 遺伝子産物が生じ、これが白血病細胞の腫瘍性増殖を引き起こすことが明らかになっている。また、*BCR-ABL* 遺伝子を発現し、悪性転換した造血幹細胞は白血病幹細胞として、白血病細胞の腫瘍性増殖を維持し、その起源となっている。

CML 発症の最初期段階の患者骨髄は、大多数が正常の造血細胞によって占められている中に、ごく少数の白血病細胞が出現し、その後徐々に増加すると考えられる。したがって、CML 発症・進展過程の細胞分子機構を考える上で、少数の白血病細胞と、それを取り囲む圧倒的に多数の正常造血細胞の相互作用・競合作用を理解することは必須である。

一方でこれまでの CML の研究では、*in vivo* において *BCR-ABL* チロシンキナーゼの分子生物学的働きや腫瘍増殖性遺伝子との細胞内相互作用を解析することを目的として、X 線照射によりレシピエントマウスの造血細胞を排除し、*BCR-ABL* を遺伝子導入した白血病幹細胞を移植する CML マウスモデルが用いられてきた。しかしながら、このモデルでは、一旦正常造血系を破壊してしまうため、白血病幹細胞、もしくは白血病細胞と正常造血細胞の相互作用・競合作用を解析することは困難であった。

CML 病態生理における、これらの解明すべき点と実験モデルにおける問題点を勘案して、我々は、X 線非照射マウスをレシピエントとして白血病幹細胞を移植することで、正常な造血能を保持した生体内で CML を発症させる実験モデルの樹立に着手した。さらに、本実験モデルを用いて、白血病細胞と正常造血細胞との相互作用・競合作用を明らかにすることを目的として、本研究計画を立案するに至った。

## 2. 研究の目的

CML 発症の最初期過程で起きていることが予想される白血病幹細胞、もしくは白血病細胞と正常造血細胞の相互作用・競合作用を、ヒト CML の病態により近似した環境条件で観察することを目的として、上述の X 線非照射 CML マウスモデルを樹立した。さらに、本実験モデルを用いた解析から、*BCR-ABL* 遺伝子導入白血病幹細胞の腫瘍性増殖過程における正常造血細胞と白血病細胞との相互作用を分子・細胞レベルで解析し、この相互作用が CML 病態形成に果たす役割の解明を目指し

た。これらの解析を通して、CML の進展機構に関わる新たな細胞分子機構を明らかにし、これらを標的とした新規治療戦略の確立・分子標的治療法の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) X 線非照射 CML マウスモデルの樹立

従来 CML マウスモデルでは、正常なマウスから骨髄造血幹細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いて *BCR-ABL* を遺伝子導入することで白血病幹細胞を作製する。作製した白血病幹細胞は、X 線照射により一旦骨髄細胞を破壊したレシピエントマウスの尾静脈に接種し、骨髄移植を行う。

一方で、X 線非照射マウスを用いた場合、一般的な白血病幹細胞の移植方法である静脈接種では、移植細胞が効率的に骨髄内へ浸潤・生着しない。また、ヒト由来遺伝子産物である *BCR-ABL* は、正常なマウスの免疫システムにより異種タンパクとして排除されてしまう。これらの問題点を解決するため、同様に作製した白血病幹細胞を免疫不全ヌードマウスの骨髄内に直接接種するという独自の工夫を行い、CML モデルの樹立を試みた。

### (2) CML 発症過程における白血病細胞と正常造血細胞の動態の解析

*BCR-ABL-ires-GFP* 遺伝子を導入した白血病幹細胞を放射線非照射のヌードマウスの骨髄内に移植した。骨髄移植後に経過的に末梢血・骨髄・脾臓を採取し、フローサイトメトリ解析により、*BCR-ABL* 陽性細胞 (GFP 陽性) と正常造血細胞 (GFP 陰性) に関して、種々の血球分化段階に分類し、CML 発症過程における経過的变化を観察した。

### (3) CML 発症過程における血清中サイトカイン・ケモカイン濃度変化の解析

白血病幹細胞移植前、移植後 2 週間、3 週間目に血清を採取し、サイトカインアレイ解析を用いて炎症性サイトカイン・ケモカインの濃度変化を測定した。

### (4) CML 骨髄内における CCL3 産生細胞の観察

(3)の実験から CML の発症に伴って、CCL3 の血清濃度の上昇が認められたため、CML 発症マウスの骨髄を採取し、フローサイトメトリ解析により、CCL3 産生細胞を観察した。

### (5) CCL3 の CML 病態生理における役割の解析

CCL3 欠損マウスから白血病幹細胞を樹立し、X 線非照射 CML モデルを作製した。また、野生型マウスから作製した白血病幹細胞を、CCL3 のレセプターである CCR1 と CCR5 をそれぞれ欠損したマウスから採取した正常造血幹・前駆細胞と等量混合し、骨髄移植した。それぞれのモデルにおいて、骨髄移植後、CML 病態変化を経過的に観察した。

#### (6) CCL3 の正常造血過程における生理的役割の解析

CCL3 欠損マウスと野生型マウスの生理的条件下、さらにはそれぞれの骨髄細胞をドナーとした骨髄移植後の血球再構築過程において、骨髄ならびに末梢血を採取し、造血過程における各血球画分の変化を比較検討した。

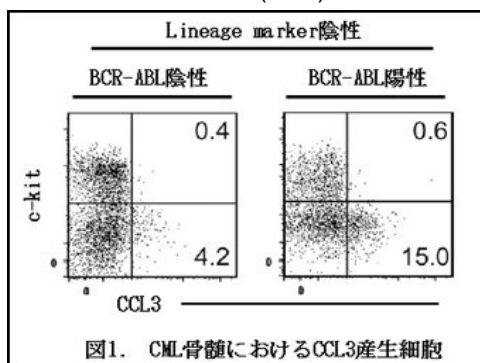
#### (7) CCL3 を分子標的とした、CML 治療・発症予防効果の検討

X 線非照射 CML モデルを作製し、CCL3 と CCR5 との結合阻害剤であるマラビロクを経口投与し、CML 治療、ならびに発症予防効果を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒト CML 患者の発症初期過程で起きていることが予想される、骨髄内における大多数の正常造血細胞とごく少数出現した白血病幹細胞、ならびに白血病細胞との相互作用・競合作用を、ヒト CML 病態により近似した環境条件で観察することを目的として、CML マウスモデルの樹立に着手した。X 線を照射し、一旦骨髄細胞を破壊したレシピエントマウスに対して白血病幹細胞を骨髄移植して CML 病態を発症させる従来のモデルを改変し、X 線非照射ヌードマウスの骨髄内に直接白血病幹細胞を移植することで、正常な造血能を保持した生体内で CML を発症させる実験モデルの樹立に成功した。

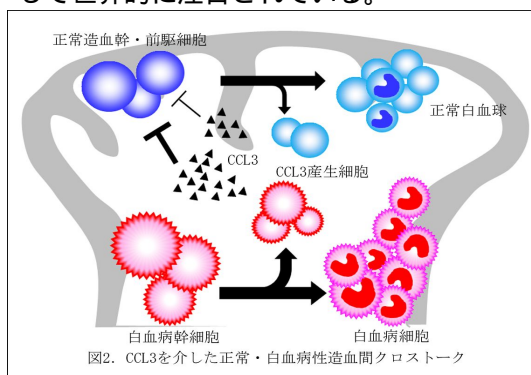
本 CML モデルを詳細に解析した結果、CML の発症過程の骨髄内において、炎症性ケモカイン CCL3 が白血病幹細胞から分化した特定の白血病細胞から高レベルに産生されていることを見出した。また、これと比較すると低レベルではあるが、同様の形態を示す BCR-ABL 陰性の正常骨髄細胞からも恒常的に CCL3 が産生されていた(図 1)。



正常な骨髄造血における CCL3 の役割を解析した結果、CCL3 を欠損したマウスをドナーとして骨髄移植を行うと、野生型と比較して末梢血白血球の過剰な再構築、ならびに骨髄内のドナー由来造血幹・前駆細胞の一過性の増殖期間が延長することを認めた。すなわち、正常造血過程で恒常的に産生される CCL3 は、骨髄移植後の血球再構築過程で誘導される造血幹・前駆細胞の増殖に対して、負のフィードバック作用を持つことを明らかにした

(図 2)。

CML モデルにおいては、CCL3 を欠損した白血病幹細胞を移植した場合、さらには正常造血幹・前駆細胞で CCL3 のレセプターを欠損した場合に CML 病態が顕著に減弱することを証明した。これらの結果から、CML の発症初期過程の骨髄内においては、白血病細胞から産生される高レベルの CCL3 が、選択的に正常造血幹・前駆細胞の増殖を抑制することで、間接的に白血病幹細胞の優位な増殖をサポートしていることが示唆された(図 2)。すなわち、この CCL3 による選択的な正常造血に対する抑制作用が、白血病細胞と正常造血細胞との間における競合拮抗メカニズムの主体となり、CML 病態を増悪させていると考えられる。これらの結果は、J Exp Med に報告し(発表論文)、炎症性ケモカインを介した CML の病態生理における新たなメカニズムとして世界的に注目されている。



これらの解析結果を踏まえ、CCL3 による細胞間競合拮抗を分子標的とした CML の新規治療戦略を検討するため、X 線非照射 CML マウスモデルに対して、CCL3 と CCR5 との結合阻害剤であるマラビロクを投与した。その結果、CML 発症前にマラビロクを経口投与すると CML 病態が明らかに減弱した。しかしながら、CML 発症後にマラビロクを経口投与しても顕著な治療効果は認められなかった。すなわち、CCL3 を分子標的とした薬剤の投与により、CML の発症・進展を効果的に予防できることが明らかとなった。このことから、CML の標準的治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤の治療効果の増強を目的として、CCL3 シグナル経路に対する阻害剤の併用療法の可能性が考えられる。

#### 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 10 件)

Baba T., Mukaida N.

Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 /CCL3 in leukemogenesis.

Mol Cell Oncol. 1:e29899. 2014. 査読有  
DOI: 10.4161/mco.29899

Hamano R., Baba T., Sasaki S., Tomaru U., Ishizu A., Kawano M., Yamagishi M.,

Mukaida N.  
Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses.  
Eur J Immunol. 44:1005-1015. 2014.  
査読有 DOI: 10.1002/eji.201343434

Baba T., Naka K., Morishita S., Komatsu N., Hirao A., Mukaida N.  
MIP-1 /CCL3-mediated maintenance of leukemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia.  
J Exp Med. 210:2661-2673. 2013. 査読有  
DOI: 10.1084/jem.20130112

〔学会発表〕(計6件)

Baba T., Mukaida N.  
Crucial role of MIP-1 /CCL3 in the crosstalk between normal and leukemic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia.  
2015年11月19日, 第44回日本免疫学会,  
Sapporo Convention Center (札幌)

Baba T., Mukaida N.  
Inflammatory chemokine, CCL3, conducts the dominant proliferation of leukemia cells in CML BM.  
2015年10月10日, 第74回日本癌学会,  
Nagoya Congress Center (名古屋)

Baba T., Mukaida N.  
Role of inflammatory chemokine, CCL3, in the dominant proliferation of leukemia initiating cells in CML BM.  
2015年8月10日, 12<sup>th</sup> World Congress on Inflammation, Boston (USA)

〔図書〕(計2件)

馬場智久  
炎症と免疫、先端医学社、2016年3月  
5頁(58-62)

Mukaida N., Sasaki S., Baba T.  
Cancer Targeted Drug Delivery.  
Springer Science. 2013. 22頁(97-118)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 慢性骨髄性白血病治療剤及び該治療剤  
をスクリーニングする方法

発明者: 向田直史, 馬場智久

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-25365

出願年月日: 2016年2月12日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/bunseisetai/JapContent.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 00452095