

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461412

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病の微小環境における治療抵抗性機序の解明および克服療法の基礎研究

研究課題名(英文)Circumventing resistance at bone marrow microenvironment in acute myeloid leukemia

研究代表者

南陽介(Minami, Yosuke)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60513752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SMO阻害剤の効果について、ストローマ共培養系等を含めて検討を継続し、ヘッジホッグ(Hh)シグナルを介した効果であることを裏付ける実験を進めた。SMO阻害剤投与に関わるシグナル経路について、マイクロアレイを用いた遺伝子プロファイルの網羅的解析を行った。標的分子の定量PCR、Western blotting、細胞内FACSなどを用いた詳細な作用機序・サロゲートバイオマーカーの確立についての基礎実験を継続した。そのなかで、多能性を示す転写因子であるNANOGが、妥当なバイオマーカーとなることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Smoothed (SMO) regulates the Hedgehog (Hh) pathway. Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed that SMO inhibitor treatment induced effects on the self-renewal signatures and the cell-cycling regulations associated with leukemic stem cells (LSCs)-like properties. I examined the pluripotency factor, NANOG expression in bone marrow cells, based on the previous report that downstream effectors in the Hh pathway, GLI directly binds to the NANOG promoter and that the GLI- NANOG axis promotes stemness and growth in several cancers. Change of NANOG transcripts was closely associated with the GLI-target genes. Furthermore, by backing to the pre-clinical experimental systems, NANOG transcript level decreased during SMO inhibitor treatment. GSEA revealed that treatment with SMO inhibitor modulates self-renewal and cell-cycling signatures in AML. NANOG transcript can be a responsive biomarker during the therapy.

研究分野：白血病分子標的療法

キーワード：白血病 分子標的療法 ヘッジホッグシグナル

1. 研究開始当初の背景

少数の白血病幹細胞 (leukemia stem cells; LSC) が、正常細胞に類似した分化過程を経て多彩な腫瘍組織を生み出すことや (Bonnet D, *et al. Nature Med*, 1997)、従来の治療法 (抗がん剤やキナーゼ阻害剤) に対して骨髄微小環境下における治療抵抗性が示され (Ishikawa F, *et al. Nat Biotechnol*, 2007)、その機序には、分子の発現異常・oncogene-addiction (がん遺伝子依存) の差異・薬物動態・生存シグナルの亢進・ニッチからのシグナルなどのメカニズムが複雑に絡み合っていると考えられている。これらの特性を共有する細胞群に対する有効な治療法が、近年画期的な治療法が見出されていない再発・難治性の急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia; AML) に対する突破口となることが期待されている。

申請者らは、これまでに免疫不全マウス (NOG、NOD マウス) を用いた BCR-ABL 陽性白血病などの白血病マウスモデルや、ストローマ共培養系を用いた微小環境培養モデルを確立し、白血病の病態・分子標的療法についての論文発表を継続的に多数行なっている (Minami Y, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008、Kuwatsuka Y, *et al. Blood Cancer J*, 2011 等)。これまでの研究から得られている知見に基づき、AML 細胞株やプライマリー細胞を用いて、抗がん剤やキナーゼ阻害剤に対する微小環境における治療抵抗性 AML モデルを既に樹立しつつある。その抵抗性を担っている分子やシグナル経路を解明することによって、克服療法の新規標的候補を浮き彫りにすることが期待される。

ヘッジホッグ (Hedgehog; Hh) シグナル伝達経路は胎生期の臓器形成において重要な機能を担うとして研究が進められてきたが、近年、癌における当該シグナル分子のアベラントな活性化や癌幹細胞への関わりが見出されている。Hh シグナル伝達経路上の

Smoothened (SMO) を標的とする阻害剤は、基底細胞癌などに対して治療効果を示し、AML を含めた造血器腫瘍に対しても臨床試験が進行中であるが、治療の詳細な作用機序や治療効果を裏付ける (POC; principle of concept を示す) バイオマーカー等については明らかにされていない。Hh シグナルの微小環境における白血病への病態関与および、SMO 阻害剤による治療抵抗性克服の可能性を示唆する基礎データが得られつつあり (第 74 回日本血液学会発表, 2012)、克服療法の有力な候補として、基礎的な実験系におけるトランスレーショナル研究を進めている。

2. 研究の目的

LSC 特性を持つ細胞群に選択性の高い標的治療開発の基盤となる研究を目指す。AML 細胞株やプライマリー細胞のストローマ細胞との共培養系や免疫不全マウス (NOG、NOD マウス) への移植・継代する実験系を用いて、Ara-C 等の抗がん剤や FLT3 阻害剤等のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) に対する微小環境における治療抵抗性モデルを樹立し、より詳細な機序を検討する為のアッセイ系への最適化を図る為に改良を重ねる。また、標準阻害剤キット・阻害剤および抗体ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを、ストローマ共培養系や低酸素下培養系を用いて施行し、正常幹細胞 (臍帯血細胞等) と白血病細胞の感受性を比較検討することによって新規候補を探索し、マウス投与系における評価に繋げていく。

微小環境下の残存白血病の生存等における、Hh シグナルの病態関与について、網羅的な遺伝子解析結果の評価や、関連分子発現の knock-down 手法を用いて検討する。また、SMO 阻害剤 (PF-04449913、LDE225、Cyclopamine) の治療効果についての検討を行う。投与中の GLI1・GLI2・GLI3 等 Hh シグナル分子の発現変化や、CD34・CD38・CD33・CD11b・CD14・CD15 等の

細胞分化に関わる表面マーカーの変化を中心に、適切な治療関連バイオマーカーの探索を行なう。また、抗がん剤やTKIとの併用効果等も検討し、残存白血病に対するSMO阻害剤による克服療法の可能性について明らかにしていく。

3. 研究の方法

AML細胞株やプライマリー細胞のストローマ細胞との共培養系や免疫不全マウス(NOD、NOGマウス)への移植・継代する実験系において、抗がん剤やTKI治療後残存腫瘍細胞のレーザーマイクロダイセクションを用いた遺伝子プロファイルを含めた特性を明らかにする。構築した微小環境における治療抵抗性AMLモデル系において、標準阻害剤キット・阻害剤および抗体ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを行い、抵抗性克服療法の新規候補シーズを見出し、機能解析を進める。また、Hhシグナル伝達経路の微小環境下における治療抵抗性への関与について検討し、SMO阻害剤(PF-04449913、LDE225)の残存白血病に対する克服も含めた治療効果、および治療関連バイオマーカーを明らかにする。

4. 研究成果

1) 微小環境における治療抵抗性急性骨髄性白血病(AML)モデル(ストローマ共培養系)について、得られた残存メカニズムに関する結果やその解釈に基づいて、更に妥当な評価モデル系を確立した。

2) SMO阻害剤の効果について、ストローマ共培養系等を含めて検討を継続し、得られた効果が、ヘッジホッグ(Hh)シグナルを介した効果であることを裏付ける実験(Hhリガンドや中和抗体、シグナル分子のsiRNAによるknock-down method等)を進めた。また近年、SMO/GLIs-axisを介さないnon-canonicalなHhシグナル経路の存在を示唆する報告も多数あり、SMO阻害剤投与に関

わるシグナル経路について、マイクロアレイを用いた遺伝子プロファイルの網羅的解析を行った。標的分子の定量PCR、Western blotting、細胞内FACSなどを用いた詳細な作用機序・サロゲートバイオマーカーの確立についての基礎実験を継続した。

そのなかで、多能性を示す転写因子であるNANOGが、妥当なバイオマーカーとなることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計21件)

1) H Shinohara, M Kumazaki, Y Minami, N Sugito, Y Kuranaga, K Taniguchi, N Yamada, T Naoe, and Y Akao. *Cancer Letter*, 371 (1): 1-11, 2016

2) Wnt signaling is associated with cell survival in the interaction between acute myeloid leukemia cells and stromal cells
Y Niwa, Y Minami, A Abe, F Hayakawa, K Yamada, and T Naoe
Leukemia and Lymphoma, e-publication, 2016

3) H Shinohara, K Taniguchi, M Kumazaki, N Yamada, Y Ito, Y Otsuki, B Uno, F Hayakawa, Y Minami, and T Naoe. *Cancer Letter*, 360 (1): 28-38, 2015

4) Y Minami. *Oncology*, 89 (Suppl 1): 22-24, 2015

5) J Imagawa, H Tanaka, M Okada, H Nakamae, M Hino, K Murai, Y Ishida, T Kumagai, S Sato, K Ohashi, H Sakamaki, H Wakita, N Uoshima, Y Nakagawa, Y Minami, M Ogasawara, T Takeoka, H Akasaka, T Utsumi, N Uike, T Sato, H Sakai, K Usuki, S Morita, J Sakamoto, and S Kimura, on behalf of the DADI Trial Group, JAPAN

Lancet Haematology, 2 (12): e528-535, 2015

6) T Shibata, Y Minami, A Mitsuma, S Morita,

M Inoue, T Shimokata, M Sugishita, T Oguri, T Naoe, and Y Ando. *Int J Clin Oncol*: 19 (2): 391-396, 2014

7) Y Nishida, N Mizutani, M Inoue, Y Omori, K Tamiya-Koizumi, A Takagi, T Kojima, M Suzuki, M Nozawa, Y Minami, K Ohnishi, T Naoe, and T Murate. *Biochim Biophys Acta*, 1839 (4): 265-274, 2014

8) Y Minami. *J Hematol Transfus*, 2 (3): 1025-1029, 2014

9) Y Minami, N Fukushima, S Kakiuchi, H Minami, and T Naoe. *Annals of Oncology*, 25 (Suppl 5), 2014

10) S Katagiri, T Tauchi, S Okabe, Y Minami, S Kimura, T Maekawa, T Naoe, and K Ohyashiki. *Clin Cancer Res*, 19 (6): 1422-1432, 2013

11) K Yamamoto, S Tsuzuki, Y Minami, Y Yamamoto, A Abe, K Ohshima, M Seto, and T Naoe. *PLoS One*, 8 (9): e74864, 2013

12) 南陽介 腫瘍内科 第17巻 第1号: 56-59、2016年

13) 南陽介 がん分子標的治療 第13巻 第3号: 40-45、2015年

14) 南陽介 垣内誠司 血液内科 第71巻 第5号: 656-659、2015年

15) 南陽介 がん分子標的治療 第12巻 第1号: 57-60、2014年

16) 直江知樹 南陽介 がん分子標的治療 第12巻 第2号: 33-37、2014年

17) 南陽介 血液フロンティア 第24巻 第7号: 67-72、2014年

18) 南陽介 直江知樹 血液フロンティア 第24巻 第12号: 63-71、2014年

19) 南陽介 臨床血液 第54巻 第6号: 552-558、2013年

20) 南陽介 血液内科 第67巻 第2号: 131-137、2013年

21) 南陽介 腫瘍内科 第12巻 第6号: 640-644、2013年

〔学会発表〕(計7件)

1) 急性骨髄性白血病におけるヘッジホッグ阻害剤による白血病幹細胞に対する効果と耐性克服
南陽介 福島庸晃 垣内誠司 清井仁 南博信 直江知樹
第74回日本癌学会総会(コアシンポジウム) 名古屋国際会議場(愛知県) 2015.10.8

2) 急性骨髄性白血病におけるヘッジホッグ阻害剤投与のバイオマーカーおよび遺伝子プロファイリング解析
南陽介 垣内誠司 福島庸晃 南博信 直江知樹
第19回日本がん分子標的療法学会(ワークショップ) 松山全日空ホテル(愛媛県) 2015.6.11

3) Treatment with Hedgehog inhibitor, PF-913, attenuates leukemia-initiation potential in AML cells
南陽介 福島庸晃 直江知樹
第12回幹細胞シンポジウム(一般口演) 九州大学(福岡) 2014.5.30

4) ヘッジホッグ阻害剤 PF-913 による AML 幹細胞に対する効果とバイオマーカー
南陽介 福島庸晃 垣内誠司 南博信 直江知樹
第18回日本がん分子標的療法学会(ワークショップ) 仙台国際センター(宮城県) 2014.6.25

5) ヘッジホッグ阻害剤 PF-913 による AML 幹細胞に対する効果とバイオマーカー
南陽介 福島庸晃 垣内誠司 南博信 直江知樹
第12回臨床腫瘍学会総会(一般口演) アクロス福岡(福岡県) 2014.7.18

6) 急性骨髄性白血病に対するヘッジホッグ阻害剤 PF-913 による効果とバイオマーカーの検討
南陽介 福島庸晃 鎌塚八千代 早川文彦 垣内誠司 南博信 C Jamieson 清井仁 直

江知樹

第76回日本血液学会総会(一般口演) 大阪国際会議場(大阪府) 2014.11.1

7) CML 幹細胞の残存解析と治療戦略

南陽介 直江知樹

第11回臨床腫瘍学会総会(シンポジウム) 仙台国際センター(宮城県) 2013.8.29

〔図書〕(計4件)

1) 南陽介 血液科研修ノート: 271-273、2016年

2) 南陽介 診断と治療のABC 113 慢性骨髄性白血・骨髄増殖性腫瘍: 119-121,210、2016年

3) 南陽介 慢性骨髄性白血の基礎と臨床: 43-48、2015年

4) 南陽介 インフォームドコンセントのための図説シリーズ: 74-77、2013年

6. 研究組織

(1)研究代表者

南陽介(MINAMI, Yosuke)

神戸大学医学部附属病院・輸血細胞治療部・講師

研究者番号: 60513752