

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461424

研究課題名(和文) BCR-ABL陽性白血病に対する新たな治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Targeting malignant stem cells in BCR-ABL positive leukemia

研究代表者

岩崎 浩己 (Iwasaki, Hiromi)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：20403925

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)：幹細胞分画のBCR-ABL陽性クローン比率は、100%から僅か1-2%と症例により様々である。このことは、すべてのCML幹細胞が増殖優位性を示すものではないことを意味している。一方、すべての症例でCMPが著明に増加しており、この分化レベルで増殖優位性が獲得される。CML由来CMPでは転写因子IRF8の発現が著明に低下しており、このことが増殖優位性獲得に関与している可能性がある。幹細胞分画中のBCR-ABL陽性クローン比率はSokal scoreと正の相関を示し、さらに巨核球前駆細胞数とも強い正の相関がある。従って、CML幹細胞のクローン拡大に巨核球ニッチが何らかの役割を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we got several important findings about the property of CML stem/progenitor cells. First, the frequencies of BCR-ABL positive clone in CD34+CD38- stem cell fraction varied from only 1% to 100% at diagnosis, suggesting that CML stem cells do not necessarily outgrow normal stem cells. On the other hand, the common myeloid progenitor (CMP) fraction markedly expanded in all cases, and the majority of these cells were positive for BCR-ABL FISH, indicating that the growth advantage of CML clone is obtained at the CMP stage. Importantly, leukemic CMPs suppressed the expression of IRF8, a transcription factor in the granulocyte lineage, which might play some role in the cell proliferation. The frequencies of BCR-ABL positive clone in the stem cell fraction strongly correlated with Sokal scores and, more interestingly, with the numbers of megakaryocyte progenitors, suggesting that "megakaryocyte niche" play some role in the survival and self-renewal of CML stem cells.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：慢性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

慢性期慢性骨髄性白血病 (CML-CP) に対するチロシンキナーゼインヒビター (TKI) の治療成績に関しては、IRIS 試験の 8 年間のフォローアップにおいて 90% 近い長期生存が報告されており、継続投与によって病期進行を阻止できる画期的な薬剤と言える。一方、2 年以上の分子生物学的完全寛解 (CMR) を維持している患者を対象とした Stop Imatinib (STIM) 試験の結果は、39% で drug free での寛解維持が得られるものの、61% に早期再発を認めており、Imatinib 単独では CML 幹細胞を駆逐できない可能性が示された。Nilotinib や Dasatinib といった第二世代 TKI によって、より早期により深い分子生物学的寛解が得られることが示されているが (ENESTnd 試験、DASISION 試験) CML 幹細胞を完全に駆逐することはやはり困難であると考えられている。CML 幹細胞が TKI の作用を免れて残存するメカニズムに関しては、薬剤取り込み低下および薬剤排出亢進の問題、BCR-ABL の mutation などが考えられている。しかし、最も重要な点は、骨髄球系前駆細胞以下の CML 細胞の生存が BCR-ABL キナーゼ活性に依存しているのに対し、CML 幹細胞の生存は必ずしもそれに依存しないという点である。例えば、PML (Nature, 2008)、Alox5 (Nat Genet, 2009)、TGF- β -Foxo3a (Nature, 2010) などの分子に関しては、BCR-ABL キナーゼ活性とは独立して CML 幹細胞の生存強化に寄与することが示されている。このような背景から、慢性期 CML に対する次世代の治療戦略として、TKI の効果が十分に及ばない CML 幹細胞における BCR-ABL キナーゼ活性非依存性の生存強化パスウェイを標的とした併用療法の開発が重要と考えられている。

2. 研究の目的

CML 幹細胞の生存・増殖に寄与する因子を抽出し、BCR-ABL キナーゼ活性に依存しないパスウェイを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

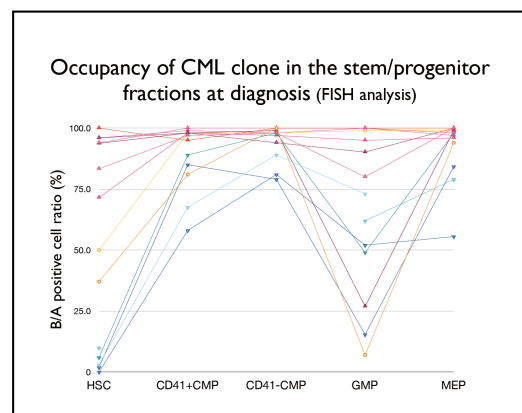
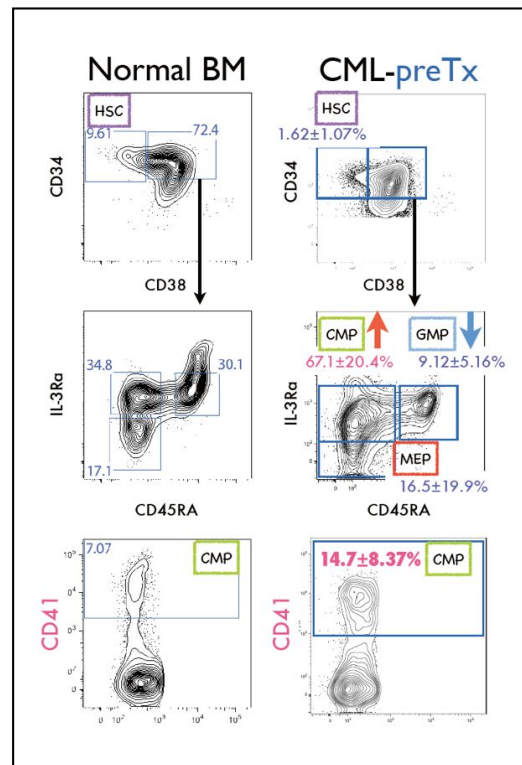
- (1) CML-CP 初発時骨髄中の CML 幹細胞クローンを同定し純化する。
- (2) CML 幹細胞クローン拡大に関与する因子を抽出する。
- (3) 純化した CML 幹/前駆細胞を正常造血幹/前駆細胞と対比させながら、特徴的発現パターンを示す分子を抽出して、その機能を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) CML-CP 初発時骨髄中の幹細胞分画 (CD34 陽性 CD38 陰性) における BCR-ABL 陽性クローン比率を FISH 法で

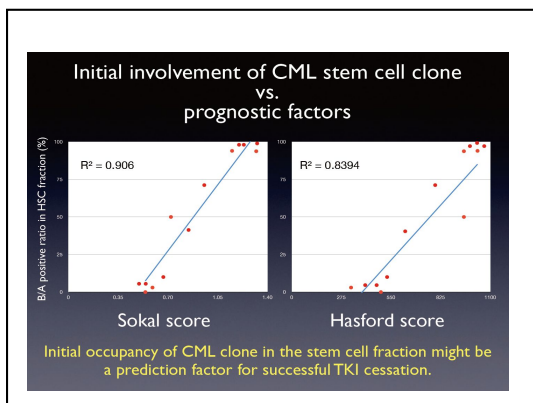
解析したところ、100% 陽性の症例から、僅か 1-2% の陽性クローンしか認めない症例まで様々存在することが明らかになった。このことは、すべての CML 幹細胞が正常造血幹細胞に対して増殖優位性を示すものではないことを意味している。臨床的には、治療前の CML 幹細胞量が治療レスポンスに関与する可能性が考えられ、stop TKI においても初発時 CML 幹細胞プールが小さい症例で有利となる可能性が高い。興味深いことに、初発時 CML 幹細胞プールサイズは、Sokal や Hasford といった予後因子と強く相関した。

一方、骨髄系前駆細胞の解析では、すべての症例で CMP 分画が著明に拡大しており、そのほとんどが CML クローンであった。つまり、CMP レベルで CML クローンの増殖優位性が獲得されることが明らかになった。



- (2) 幹細胞分画中の CML クローン比率と相関する因子として、Sokal や Hasford と

いった予後因子以外に、巨核球前駆細胞数が強い正の相関を示した。近年、巨核球が正常造血幹細胞ニッチを形成するとの報告がなされており、CML 造血においても CML 由来巨核球が CML 幹細胞の生存や自己複製に何らかの役割を担っている可能性が考えられる。巨核球から産生される液性因子の役割について検証を進めている。



(3) 増殖優位性を獲得した CML 由来 CMP 分画を純化して遺伝子発現プロファイルを見たところ、正常 CMP と比較して IRF8 の発現が著明に低下していることを見出した。IRF8 は顆粒球分化に重要な働きを担う転写因子であり、そのノックアウトマウスは CML に類似した骨髄増殖性腫瘍を発症することが知られている。つまり、CML における顆粒球系細胞の著しい増殖に IRF8 の発現抑制が関与する可能性が極めて高い。現在、IRF8 発現抑制のメカニズムについて、non-coding RNA の関与を中心に検討を進めている。

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 3 件)

- (1) Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K
The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell.
Exp Hematol. 42, 955-65, 2014
- (2) Miyawaki K, Arinobu Y, Iwasaki H, Kohno K, Tsuzuki H, Iino T, Shima T, Kikushige Y, Takenaka K, Miyamoto T, Akashi K
CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: redefinition of murine common myeloid progenitor.
Stem Cells. 33, 976-87, 2015
- (3) Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J,

Jabbarzadeh-Tabrizi S, Shima T, Takayanagi S, Niino H, Yurino A, Miyawaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Akashi K.

A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression.

Cell Stem Cell. 17, 341-52, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Hiromi Iwasaki
Initial occupancy of leukemic stem cell correlates with prognostic factor in chronic myeloid leukemia patients. 第 18 回ヨーロッパ血液学会, 2013, Stockholm
- (2) 岩崎浩己
転写因子による血球分化制御とその破綻としての白血病
第 75 回日本血液学会総会, 2013, 札幌
- (3) Kohta Miyawaki, Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi
Identification of the human unipotent megakaryocyte progenitor, and its pathophysiological roles in human thrombopoietic disorders.
第 56 回米国血液学会, 2014, San Francisco
- (4) Kohta Miyawaki, Hirotake Kusumoto, Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi
Human megakaryocyte progenitor emerges independent of megakaryocyte/erythrocyte progenitor.
第 76 回日本血液学会, 2014, 大阪

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 岩崎浩己, 赤司浩一
カラーテキスト血液病学第 2 版「白血病幹細胞」中外医学社, 2013
- (2) 岩崎浩己
血液専門医テキスト「造血幹細胞」「血球産生と分化」南江堂, 2015
- (3) Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi
Molecular pathogenesis and treatment of chronic myelogenous leukemia. Chapter 1; Identification and biology of CML stem cells.

〔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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岩崎浩己 (IWASAKI, Hiromi)

九州大学病院・遺伝子細胞療法部・准教授
研究者番号：20403925