

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461425

研究課題名(和文) CML幹細胞化因子の同定とその制御

研究課題名(英文) Identification and control of factors which regulate CML stem cells

研究代表者

木村 晋也 (Kimura, Shinya)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359794

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)：低酸素で誘導されるHIF-1 α の高発現が、リンパ腫発症の誘因となることを明らかとし、低酸素と発がんの関係に新知見を加えた、さらにシクロデキストリンやBMI-1阻害剤が正常造血幹細胞より白血病幹細胞に対する効果が大きいことを明らかにし、創薬シーズとなり得ることを示した。低酸素が血液悪性疾患の病態に密接に関連していることを明らかとし、低酸素を標的とした創薬の必要性をさらに明確にした。

研究成果の概要(英文)：We reported that higher expression of HIF-1 α became a trigger of lymphoma. In addition, we reported that cyclodextrin and BIM-1 inhibitor showed higher efficacy against leukemic stem cells than normal hematopoietic stem cells and these compounds were promising candidates for novel agents for hematological malignancies. We made it clear that hypoxemia was closely related to hematological malignancies and novel agents which targeted for hypoxemia were very important.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病 幹細胞 低酸素 シクロデキストリン BMI-1 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

ABL チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) イマチニブにより、CML の予後は劇的に改善した。しかし一部の症例では耐性を来すため、我々は新規 ABL TKI、パフェチニブを開発し (*Blood* 2005, 2007, *PNAS* 2006)、臨床第 I 相試験も完了した (*Cancer* 2010)。さらに全ての ABL TKIs が無効である T315I に対しては、オーロラキナーゼ阻害剤 AT9283 が有効であると報告した (*Blood* 2010)。しかし、種々の分子標的薬を用いても CML の根治は難しく、CML 幹細胞の殲滅を目指さなければならない。

急性白血病幹細胞は骨端部骨内膜近傍に存在しており (Ishikawa et al. *Nat Biotechnol* 2007)、CML 幹細胞も同様の部位に存在すると推測される。骨端部骨内膜近傍は、低酸素 (酸素分圧 1% 前後) で破骨細胞が豊富な領域である。そこで我々は、低酸素と破骨細胞が CML 幹細胞のニッチ構成に重要であると考え、i) 低酸素適応によって CML 細胞が幹細胞様形質を示し (幹細胞化) 低酸素下では glyoxylase-I (Glo-I) が活性化すること (*Cell Death Diff* 2010)、ii) 破骨細胞と骨との共培養で白血病細胞は静止期に入ること (*Leuk Res* 2010) や、破骨細胞を破壊するゾレドロン酸が CML モデルマウスの生存期間を延長すること (*Blood* 2003) を報告してきた。これらの結果から、CML 幹細胞という静的な細胞が常在するのではなく、ある特殊なニッチ環境 (低酸素や破骨細胞近傍) に捕捉された際に、幹細胞化すると考えるに至った。CML 幹細胞殲滅のためには、a) CML 幹細胞化因子の同定、b) CML 幹細胞化因子阻害薬剤の探索、が必要である。

我々はすでに、低酸素耐性 CML 細胞に特異性高く作用する化合物として、Glo-I 阻害剤 (*Cell Death Diff* 2010)、Rakicidin A (*Cancer Sci* 2011) や β -catenin 阻害剤

AV65 (*Cancer Lett* in press) を報告してきた。またブラジルオトギリ草に含まれる 3 環形クマリン (GUT-70 と命名) が強力な抗がん作用を有することを発見し (*Int J Cancer* 2005)、その作用が HSP90 阻害を介することを報告した (*Br J Cancer* 2011)。最近、GUT-70 も低酸素適応性 CML 細胞に対し、より高い効果を示すことを明らかとした (2012 年米国血液学会で発表)。臨床応用にはさらに化合物を最適化するために、本研究で低酸素適応による CML 幹細胞化因子を明らかにすることが必要不可欠である。

2. 研究の目的

低酸素環境が白血病幹細胞を含む血液悪性疾患に及ぼす影響を明らかにする。そしてその影響をもたらす因子を同定し、白血病幹細胞に特異的に殺細胞効果を示す薬剤を見出す。

3. 研究の方法

1. 低酸素誘導性遺伝子を shRNA あるいは低酸素指向性化合物で抑制し形質変化を検討する。
2. 患者 CML 幹細胞における低酸素誘導性遺伝子の発現レベルを測定し、生理的意義を明らかにする。患者細胞を得る際には、佐賀大学医学部の倫理委員会の承認を受け、文書によるインフォームドコンセントを取得のうえ行う。
3. TRPC1 KO マウスあるいは HIF-1 α TG マウスの表現型質および定常状態と *bcr-abl* 遺伝子導入時の幹細胞性を測定する。これらマウスに高圧酸素療法を行い、低酸素誘導性遺伝子の発現を検討する。
4. 低酸素適応によって CML 幹細胞様形質を獲得した K562HA 細胞株を用いて、CML 幹細胞にも有効な薬剤を

探索する。

5. 幹細胞に重要な意義を有する BMI-1 に対する阻害剤の効果を各種白血病細胞株および患者白血病細胞を用いて検討する。
6. これらの研究から明らかとなった幹細胞性獲得に関与する低酸素誘導性因子を特異的に阻害するシズ化合物を、局在表面プラズモン共鳴を応用したシステムで探索する。

4 . 研究成果

4-1,2,3: 低酸素適応によって CML 幹細胞様形質を獲得した細胞株 K562HA で発現の高い 10 種類の遺伝子を同定した。しかし最も発現レベルの高かった TRPC 1 を白血病細胞株でノックダウンしても、幹細胞性に大きな変化はなかった。また TRPC1 ノックアウトマウスを用いた実験でも、その正常造血細胞の性状に野生型と大きな差は認めなかった。以上から、現時点において我々の高発現であることを見出した TRPC1 に関して、幹細胞性に大きなインパクトはないと考えられた。しかし幹細胞性の検討において、いまだ行っていない実験もあり、さらに TRPC1 の幹細胞性および機能について検討を行っていく。現在のところ TRPC1 の意義が不明なため、患者検体による発現レベルの検討は行っていない。HIF-1 トランスジェニックマウスでは、リンパ腫の発生が多いことを報告した (PLoS One 2013)

4-4: 慢性骨髄性白血病 (CML) 幹細胞様形質を示し、抗がん剤や ABL 阻害剤に多剤耐性をきたす低酸素適応性 CML 細胞株にも 2-Hydroxypropyl - β -cyclodextrin (CyD) が有効であることを明らかにした(PLoS 2015)。

4-5 : 幹細胞で重要な役割を有する BMI-1 が高発現をしている急性骨髄性白血病(AML)患

者の予後が悪いこと、そして BMI-1 阻害剤 PTC-209 が細胞株のみならず患者 AML 細胞にも有効であることを報告した(Cancer Sci 2015)。

4-6 : 局在性表面プラズモン共鳴を利用して、抗原抗体反応を簡便に測定する方法を確立し報告した(Anal Bioanal Chem 2014)

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 17 件) (全て査読あり)

1. Nemoto A, Saida D, Kato I, Kikuchi J, Furukawa Y, Maeda Y, Akahane K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Kimura S, Sato Y, Okabe S, Niwa A, Watanabe K, Nakahata T, Heike T, Sugita K, Inukai T. Specific anti-leukemic activity of PD0332991, a CDK4/6 inhibitor, against Philadelphia-chromosome positive lymphoid leukemia. *Mol Cancer Ther*, in press. Watanabe T, Sato A, Kobayashi-Watanabe N, Sueoka-Aragane N, Kimura S, Sueoka E. Torin2 potentiates anti-cancer effects for adult T-cell leukemia/lymphoma by inhibiting mammalian target of rapamycin. *Anticancer Res*, 36: 95-102, 2016.
2. Yokoo M, Kubota Y, Motoyama K, Higashi T, Taniyoshi M, Tokumaru H, Nishiyama R, Tabe Y, Mochinaga S, Sato A, Sueoka-Aragane N, Sueoka E, Arima H, Irie T, Kimura S. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLoS One* 10: e0141946, 2015.
3. Nishida Y, Maeda A, Chachad D, Ishizawa J, Kornblau M, Kimura S, Andreef M, Kojima K. Preclinical activity of the novel BMI-1 inhibitor PTC-209 in acute myeloid leukemia: implications for leukemia therapy. *Cancer Sci* 106: 1705-1713, 2015.
4. Imagawa J, Tanaka H, Okada M, Nakamae H, Hino M, Murai K, Ishida Y, Kumagai T, Sato S, Ohashi K, Sakamaki H, Wakita H, Uoshima N, Nakagawa Y, Minami Y, Ogasawara M, Takeoka T, Akasaka H, Utsumi T, Uike N, Sato T, Ando S, Usuki K, Morita S, Sakamoto J, Kimura S. Discontinuation of dasatinib in chronic myeloid leukaemia patients who have maintained deep molecular response for

- more than 1 year: the prospective, multicentre Dasatinib Discontinuation (DADI) Trial. *Lancet Haematology*, 2: e528-523, 2015.
5. Ahihara E, Munaka T, Kimura S, Nakagawa S, Naakagawa Y, Kanai M, Hirai H, Abe H, Miida T, Yamato S, Shoji S, Maekawa T. Isopentenyl Pyrophosphate Secreted from Zoledronate-Stimulated Myeloma Cells, Activates the Chemotaxis of $\gamma\delta$ T Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 463: 650-655, 2015.
 6. Hosoya K, Mochinaga S, Emoto A, Yokoo H, Tokushima H, Egoshi M, Sueoka-Aragane N, Kimura S. Failure mode and effects analysis of medication adherence in patients with chronic myeloid leukemia. *Int J Clin Oncol* 20:1203-1210, 2015.
 7. Matsuda K, Hattori S, Kariya R, Komizu Y, Kudo E, Goto H, Taura M, Ueoka R, Kimura S, Okada S. Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. *Biochem Biophys Res Commun* 457: 288-294, 2015.
 8. Yokoo M, Kubota Y, Tabe Y, Kimura S. Comparative study of the anti-leukemic effects of imatinib mesylate, Glivec™ tablet and its generic formulation, OHK9511. *Biol Pharma Bulletin* 38: 411-416, 2015.
 9. Tabe Y, Jin L, Konopleva M, Shikami M, Kimura S, Andreeff M, Raffeld M, Miida T. Class IA PI3K inhibition inhibits cell growth and proliferation in mantle cell lymphoma. *Acta Haematol* 131: 59-69, 2014
 10. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K, Combining the ABL1 kinase inhibitor ponatinib and the histone deacetylase inhibitor vorinostat: A potential treatment for BCR-ABL positive leukemia. *PLOS One* 9: e89080, 2014.
 11. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation. *Cancer Biol Ther* 15: 207-215, 2014.
 12. Yamamichi J, Ojima T, Iida M, Yurugi K, Imamura T, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T. Surface chemical approach to single-step measurement of antibody in human serum using localized surface plasmon resonance biosensor on microtiter plate system. *Anal Bioanal Chem* 406: 4527-4533, 2014.
 13. Imam SZ, Trickler W, Kimura S, Binienda ZK, Paule MG, Slikker W, Li S, Clark RA, Ali SF. Neuroprotective efficacy of a new brain-penetrating c-Abl inhibitor in a murine Parkinson's disease model. *PLOS One* 8: 65129, 2013.
 14. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Activity of histone deacetylase inhibitors and an Aurora kinase inhibitor in BCR-ABL-expressing leukemia cells. *Cancer Cell Int* 13: 32-41, 2013.
 15. Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ide M, Nakamura H, Sotomaru Y, Taya C, Yonekawa H, Kitagawa T, Kubota Y, Kimura S, Nakamichi K, Tanimoto K. Development of lymphoproliferative diseases by hypoxia inducible factor-1 α is associated with prolonged lymphocyte survival. *PLOS One*, 8: e57833, 2013.
 16. Katagiri S, Tauchi T, Okabe S, Minami Y, Kimura S, Maekawa T, Naoe T, Ohyashiki K. Targeting the hedgehog signaling pathway in therapy-resistant BCR-ABL1 positive leukemia with ponatinib. *Clin Cancer Res* 19: 1422-1432, 2013.
 17. Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, Hattori S, Kimura S, Okada S. Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells. *Bioorgan Med Chem Lett*, 23: 606-609, 2013.
- 〔学会発表〕(計2件)
1. Kubota Y, Yokoo M, Motoyama K, Higashi T, Taniyoshi M, Tokumaru H, Tabe Y, Mochinaga S, Sato A, Sueoka-Aragane N, Sueoka E, Arima H, Irie T, Kimura S" 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin acts as a novel anticancer agent. The 19th European Hematology Association Congress "June 12 - 15, 2014. Milano Congressi in Milan, Italy.
 2. 久保田 寧、山田麻里江、山田尚友、東谷孝徳、木村晋也、末岡榮三朗 佐賀大学病院における輸血後鉄過剰症への deferasirox 投与例の検討 - その効果と安全性について - 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 2014.5.15 - 17.奈良県文化会館、奈良市
- 〔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：

〔その他〕

ホームページ等
佐賀大学医学部 血液・呼吸器・腫瘍内科
<http://www.saga-hor.jp/main/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 晋也 (Kimura Shinya) (佐賀大学・医学部・教授)

研究者番号：80359794

(2) 研究分担者

久保田 寧 (Kubota, Yasuhi) (佐賀大学・医学部・講師)

研究者番号：60570413

(3) 連携研究者

()

研究者番号：