

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461593

研究課題名(和文) 小児白血病の中樞神経浸潤に対する分子基盤解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Molecular basis of central nervous invasion of pediatric leukemia

研究代表者

福田 誠司 (FUKUDA, SEIJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30273147

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)：急性白血病の進展には骨髄内での白血病細胞の増殖と骨髄外への細胞浸潤が必要である。

この中で、中樞神経への浸潤は患者予後に悪影響を及ぼすが、その分子機構は充分解明されていない。しかし、ケモカインに対する異常な遊走反応がその原因の一つであることは報告されている。本研究では、急性骨髄性白血病患者の予後不良因子として知られるFLT3/ITD変異が、血球細胞をケモカインCXCL12に対して過剰反応させ、細胞遊走を促進する分子機構を明らかにし、その機構に対する標的治療応用の可能性を解析した。

研究成果の概要(英文)：One of the major indicators of poor prognosis in leukemia patients is extramedullary infiltration or dissemination of leukemia cells. In particular, leukemia cell infiltration into the central nervous system is one of the major complications negatively influencing prognosis. However, little is known about the mechanisms responsible for extramedullary dissemination of leukemia cells compared to those responsible for solid tumor metastasis. In the present study, we have identified molecular mechanism responsible for the enhanced chemotaxis towards chemokine CXCL12 that is induced by the Internal Tandem Duplication mutation of FLT3 gene (FLT3/ITD) associated with extremely poor prognosis. We subsequently investigated if antagonizing this particular molecular mechanism can be utilized for the treatment to block the unnecessary migration of the hematopoietic cells with FLT3/ITD.

研究分野：小児科学

キーワード：急性骨髄性白血病 細胞遊走 浸潤

1. 研究開始当初の背景

小児、成人に関わらず予後不良である中枢神経白血病に対しては、脊髄内への抗がん剤投与や全脳照射が行われる。しかし、これは侵入した細胞に対する非特異的治療であり、2次癌の危険を伴う上に、効果は必ずしも芳しくない¹。小児に多いT-ALLのCNS浸潤にケモカイン受容体CCR7が関わるのが唯一明らかにされた以外は、いずれの白血病でもCNSへの浸潤メカニズムは不明である。したがって、難治白血病の克服のためには、「白血病が脳や脊髄などの中枢神経へ浸潤する」という大変悩ましい課題を克服しなければならない。

白血病細胞の多くは、CNS内でも発現するケモカインCXCL12に対する受容体CXCR4を持ち、CXCL12に対して遊走する。この点に関して私たちは、MLL白血病や急性骨髄性白血病にも存在する活性型Flt3変異(FLT3/ITD)が、造血細胞の遊走異常と腹部臓器への集積亢進を引き起こすことを報告した²。HSCの増殖や分化に重要なチロシンキナーゼ受容体「Flt3遺伝子」にDNAの繰り返し配列が挿入されるInternal Tandem Duplication(FLT3/ITD)変異は、小児で10-15%、成人で30%と高頻度に見られる²。

そしてFLT3/ITD+細胞内ではCXCL12/CXCR4によって生ずる細胞内情報伝達経路が正常細胞とは質的に異なることを見出した。FLT3/ITDが、CXCL12/CXCR4機能を修飾し遊走機能を亢進するという事実は、白血病細胞のCNS浸潤は偶発的なものではなく、白血病関連分子とCXCL12/CXCR4シグナルの相互作用を介するプロセスであることを示唆する。これは固形癌の転移にCXCL12/CXCR4が関与し、乳がんエストロゲン経路がCXCR4機能に働き、その遊走を制御する事実と一致する。これらの結果から、私たちは白血病細胞のCNSへの浸潤は偶発的ではなく、白血病遺伝子により生ずる能動的プロセスであると推測される。したがって、CXCL12/CXCR4に対して細胞が遊走浸潤するプロセスを阻害することは中枢神経などへの白血病細胞浸潤を阻害することに結びつく。しかし、その分子機構を解明する必要がある。

2. 研究の目的

- (1)FLT3/ITD+細胞がケモカインCXCL12に反応した際に特異的に変動するシグナル経路を同定する。
- (2)その経路の中でFLT3/ITD+細胞がケモカインCXCL12に遊走亢進をもたらす責任分子を同定する
- (3)上記で同定された分子が過剰な細胞遊走を阻害できるか検討する
- (4)逆にCXCL12がFLT3/ITDシグナルへ及ぼす影響を明らかにする

3. 研究の方法

ヒト患者由来のFLT3/ITD変異または正常FLT3を持つプラスミドを強制発現させた造血細胞株Ba/F3をケモカインCXCL12で刺激し、細胞内の遺伝子発現の変化を刺激前後でmRNAマイクロアレイを用いて比較した。変化した遺伝子を機能的に分類し、どのような細胞内シグナル経路が変動するのかを明らかにした。そして、同定された細胞機能の中で過剰遊走の原因となる分子を同定し、治療応用が可能かどうかに関してin vitroで検討した。

4. 研究成果

FLT3/ITD陽性細胞と陰性細胞のCXCL12に対する試験管内での遊走を比較すると、FLT3/ITD陽性細胞で有意に細胞遊走が上昇した(図1)。次にFLT3/ITDによって生ずるCXCL12に対する過剰な細胞遊走の原因を明らかにした。

図1 FLT3/ITD陽性細胞のCXCL12に対する細胞遊走

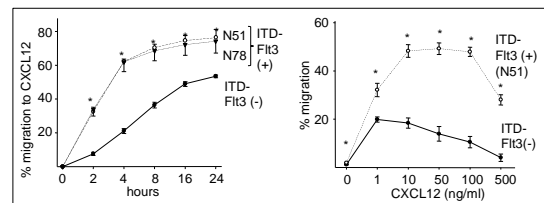


図2: FLT3/ITD陽性細胞と陰性細胞でCXCL12刺激後に変動する遺伝子群の機能的分類

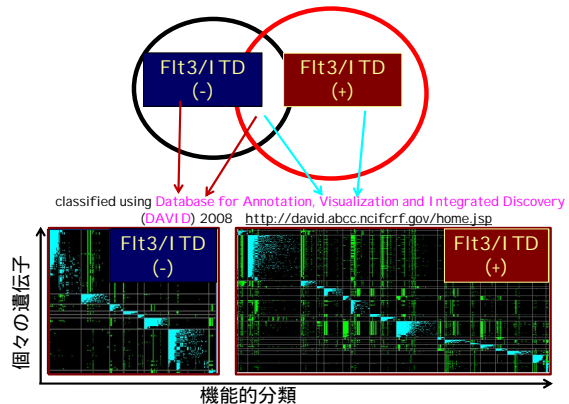
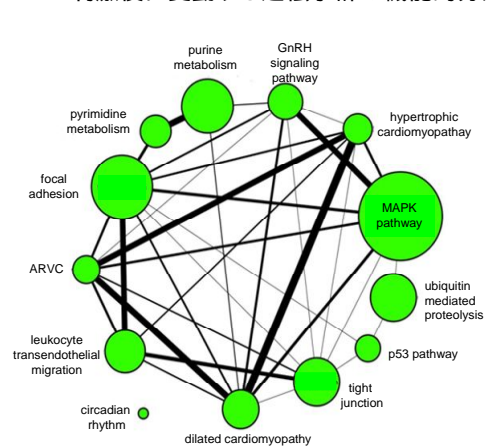


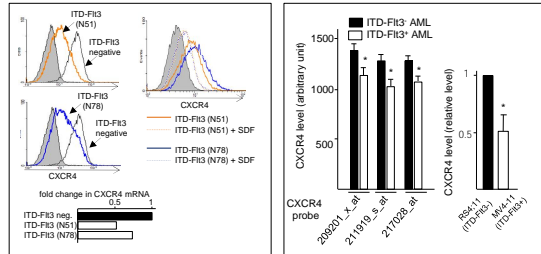
図3: FLT3/ITD陽性細胞特異的にCXCL12刺激後に変動する遺伝子群の機能的分類



FLT3/ITD存在下と非存在下においてCXCL12

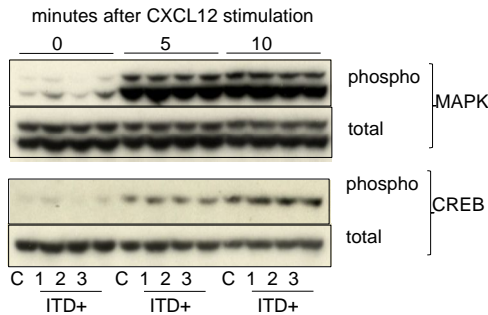
によって変化する遺伝子群を比較するとお共通して変動する分子と FLT3/ITD 特異的に変化する分子群、と非存在下特異的に変化する分子群に分類できた。これら分子を機能的に分類すると機能的に異なるグループに分けられることが明らかになった(図2, 図3)。一方, CXCL12 の細胞上の受容体である CXCR4 の発現は FLT3/ITD 陽性細胞で蛋白量、mRNA ともに有意に低下していた(図4)。さらに

図4: FLT3/ITD陽性細胞のCXCL12受容体 CXCR4の発現



CXCL12 刺激直後に生ずる細胞内へのカルシウム流入量も FLT3/ITD 陽性細胞では有意に低下していた。また、通常 CXCL12 刺激直後から、細胞内の Map-kinase p42/p44 や Creb 分子がリン酸化されるがこれら分子に対するリン酸化の程度は FLT3/ITD 存在下、非存在下でも変わりなかった(図5)。この結果は、FLT3/ITD 陽性細胞において CXCL12 によって生ずる過剰な細胞遊走反応は CXCL12 シグナルの量的な増大によるものではなく、質的な変化が原因であることを示す。

図5: CXCL12刺激後のFLT3/ITD陽性細胞でのMapkとCrebのリン酸化



CXCL12 の刺激を受けた際に FLT3/ITD 陽性細胞に特異的に変動する分子群の一つが Focal adhesion 経路であった。この中を構成する分子の一つが Rho-kinase 1 であり、FLT3/ITD 陰性細胞では CXCL12 刺激によって減少したのに対して FLT3/ITD 陽性細胞では減少しなかった(図6)。そこで FLT3/ITD 陽性細胞において Rho-kinase 1 発現を shRNA によって発現低下させると、CXCL12 に対する過剰な細胞遊走が抑制された(図7)。これらの結果は FLT3/ITD によって生ずる Rho-kinase 1 発現上昇の結果、CXCL12 に対する細胞遊走が亢進することを示す。

更に、FLT3/ITD によって生ずる CXCL12 への過剰な細胞遊走が中枢神経や他の臓器への細胞浸潤にかかわるとするならば、その過剰

図6: FLT3/ITD陽性細胞と陰性細胞でCXCL12刺激後のRho-kinase-1の発現

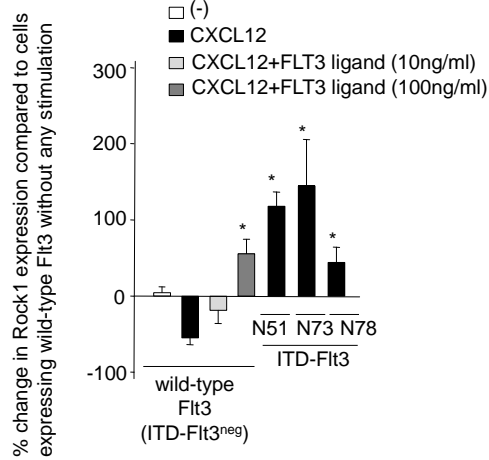


図7: FLT3/ITD陽性細胞においてRho-kinase-1に対するshRNA導入後の細胞遊走

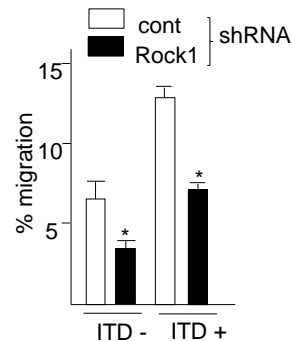
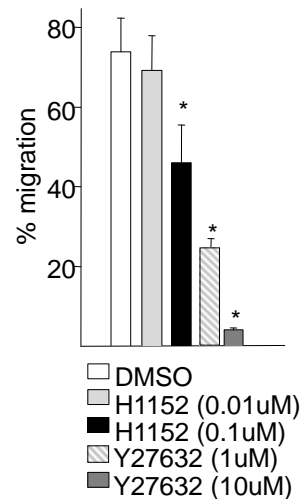


図8: FLT3/ITD陽性細胞においてRho-kinase-1阻害薬存在下での細胞遊走



遊走を抑制することが治療方法として用いることができるのではないかと考え、Rho-kinase 抑制剤を用いて細胞遊走を阻害できるかどうか検討した。その結果、Rho-kinase 抑制剤は FLT3/ITD 陽性細胞の CXCL12 への過剰な細胞遊走を有意に抑制することができた(図8)。これらの結果は、現在市販され、臨床で血管拡張薬として用い

られている Rho-kinase 抑制剤が FLT3/ITD 陽性白血病の浸潤を抑制する効果があることを示唆する。

ここまで述べた研究結果は、FLT3/ITD によって生ずるシグナルが CXCL12/CXCR4 シグナルへ及ぼす影響の解析であった。そこで次に CXCL12/CXCR4 シグナルが FLT3/ITD シグナルへ及ぼす影響を解析した。これまでの研究で CXCL12 は白血病細胞を細胞死から保護する役割があると報告されているが、一方で急性骨髄性白血病細胞の細胞死を誘導するという全く相反する機能も示されている。そこで、FLT3/ITD 陽性細胞を CXCL12 存在下で 1 週間培養した。その結果 CXCL12 存在下では FLT3/ITD 陽性細胞が有意に減少したが、FLT3/ITD 陰性細胞では変化なかった。さらに FLT3/ITD によって変化する分子群の一部は CXCL12 によって発現量が逆転または正常化した。すなわち、FLT3/ITD によって生ずる遺伝子発現の異常の一部は CXCL12 刺激によって正常化または逆転することを示す。これは FLT3/ITD によって生ずる細胞増殖が、CXCL12 によって減少することと一致し、CXCL12/CXCR4 シグナルの一部は FLT3/ITD シグナルを負に制御することを示す。

したがって、これらの研究結果は FLT3/ITD シグナルと CXCL12/CXCR4 シグナルは相互に影響を及ぼしあうことを示す。そして、FLT3/ITD によって生ずるシグナルは Rho-kinase を介して CXCL12/CXCR4 シグナルを活性化し、その抑制は過剰な細胞遊走を阻害する。したがって、Rho-kinase の阻害剤は FLT3/ITD 陽性白血病の CXCL12 に対する過剰遊走を阻害することを通して中枢神経や腹部臓器への浸潤を解消する可能性がある。また、Rho-kinase は FLT3/ITD 陽性細胞の増殖も制御しており、その阻害が FLT3/ITD 陽性細胞の遊走だけでなく、増殖も阻害することができるという点において、有用性がより期待できる。その阻害薬は肺高血圧症に対して用いられており、FLT3/ITD 陽性白血病に用いる有用性を証明したい。

文献

- 1: CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia
Nature. 2009 459(7249):1000-4
- 2: Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1 α (CXCL12)/CXCR4 axis.
Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM.
Blood. 2005 Apr 15;105(8):3117-2

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 7件)

1. Abe M, Pelus LM, Singh P, Hirade T, Onishi C, Purevsuren J, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S.
Internal Tandem Duplication in FLT3 Attenuates Proliferation and Regulates Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Modulating p21^{Cdkn1a} and Pbx1 in Hematopoietic Cells
PLOS ONE 2016.
DOI:10.1371/journal.pone.0158290. 1-26
2. Hirade T, Abe M, Onishi C, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S.
Internal Tandem Duplication of FLT3 Deregulates Proliferation and Differentiation and Confers Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Up-regulating RUNX1 Expression in Hematopoietic Cells
International Journal of Hematology 2016. 103: 95-106
DOI:10.1007/s12185-015-1908-8
3. Fukuda S, Hoggatt J, Singh P, Abe M, Speth JM, Hu P, et al.
Survivin Modulates Genes with Divergent Molecular Functions and Regulates Proliferation of Hematopoietic Stem Cells through Evi-1
Leukemia 29: 433-440, 2015
DOI:10.1038/leu.2014.183
4. Onishi C, Mori-Kimachi S, Hirade T, Abe M, Taketani T, Sugimoto T, Suzumiya J, Yamaguchi S, Kapur R, Fukuda S.
Internal Tandem Duplication Mutations in Flt3 augment Chemotaxis by Blocking the Down-Regulation of Rho-Associated Kinase via the CXCL12/CXCR4 signaling axis
Journal of Biological Chemistry 289: 31053-31065, 2014
DOI:10.1074/jbc.M114.568287
5. Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S.
Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth.
J Pediatr Hematol Oncol. 36:166-8, 2014
DOI:10.1097/MPH.0b013e318290c686

6. Nabinger SC, Li X, Ramdas B, He Y, Zhang X, Zeng L, Richine B, Bowling JD, **Fukuda S**, et al.
The Protein Tyrosine Phosphatase, Shp2, Positively Contributes to FLT3-ITD-Induced Hematopoietic Progenitor Hyperproliferation and Malignant Disease In Vivo.
Leukemia 27(2):398-408: 2013
DOI:10.1038/leu.2012.308
7. Taketani T, Kanai R, Abe M, Mishima S, Tadokoro M, Katsube Y, Yuba S, Ogushi H, **Fukuda S**, Yamaguchi S.
Therapy-related Ph+ leukemia after both bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation for hypophosphatasia.
Pediatrics International
55: e52-5: 2013
DOI:10.1111/ped.12012

〔学会発表〕(計 3件)

1. **福田誠司** Flt3/ITD によって生ずる細胞の増殖、遊走、分化の異常機構の解析
第 21 回小児血液フォーラム in Okayama 教育講演 岡山コンベンションセンター (岡山) 2014 年 2 月 8 日
2. 大西千恵、平出智裕、山口清次、**福田誠司**
ITD-Flt3 accentuates cell migration by antagonizing the reduction of ROCK1 induced by SDF1
第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン 札幌 (札幌) 2013 年 10 月 11 日
3. **福田誠司**、平出智裕、山口清次、大西千恵
Flt3-ligand enhances chemotaxis to SDF1 by blocking the down-regulation of Rock1 that is induced by SDF1
第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン 札幌 (札幌) 2013 年 10 月 11 日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 誠司 (FUKUDA Seiji)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：30273147

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()