

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860404

研究課題名(和文) 骨髄ニッチを再現した低酸素環境での白血病幹細胞の病態解析に基づく分子標的治療

研究課題名(英文) Molecular target treatment based on the pathological analysis of leukemia stem cells under mimicking bone marrow microenvironment in hypoxia

研究代表者

伊藤 真以 (ITO, Mai)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70415545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性白血病の治療率の向上には、白血病幹細胞を制御する治療戦略が必要である。骨髄ニッチを再現した *in vitro* 低酸素培養系にて白血病細胞を培養すると、HIF蛋白の発現が誘導され、幹細胞制御シグナルに關与するNotch、mTORシグナル、あるいはNF- $\kappa$ Bシグナルは抑制される傾向にあることが分かった。Notchリガンド刺激によりNotchシグナルを強制的に活性化させた場合、低酸素培養では活性化Notchシグナルが抑制されることが分かった。正常血液細胞または白血病細胞の低酸素刺激に対する反応性は、HIF蛋白の発現において違いが見られた。

研究成果の概要(英文)：For treatment of acute leukemia, it is necessary to eradicate leukemia stem cells which reside in bone marrow microenvironment in hypoxia. We found that HIF protein expression was upregulated, in association with downregulating of Notch, mTOR, or NF- $\kappa$ B signals when leukemia cell lines were cultured in hypoxia. Activated Notch signal was also downregulated in hypoxia. The reactivity in hypoxia was different between normal blood cells and leukemia cell lines with respect to the expression of HIF protein.

研究分野：医歯薬学

キーワード：急性白血病 白血病幹細胞 低酸素培養 骨髄ニッチ

### 1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、正常造血幹細胞が腫瘍化して生じた白血病幹細胞が、正常造血幹細胞の増殖能を上回る自己複製能を獲得し、無制限に白血病細胞の増殖をきたす疾患である。治療率を向上させるには、単なる白血病細胞の増殖抑制ではなく、白血病幹細胞を制御する治療戦略が必要である。そのためには、骨髓低酸素環境（骨髓ニッチ）で、自己複製能を獲得した白血病幹細胞が、正常造血幹細胞を凌駕して増殖し続ける機構を解析することが重要である。

### 2. 研究の目的

骨髓ニッチを再現した *in vitro* 低酸素環境で細胞培養を行うことにより、骨髓において白血病幹細胞が正常造血幹細胞の増殖能を上回る自己複製能を獲得する分子メカニズムを明らかにする。また、白血病幹細胞の病態解析を行い、これに基づく分子標的治療戦略を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト白血病細胞株を材料とする。通常酸素濃度下あるいは低酸素細胞培養インキュベータを用いた低酸素環境（酸素濃度 1%）にて細胞培養を行い、両者で見られる細胞内蛋白の発現の違いを、ウェスタンブロット法にて解析する。

(2) 骨髓ニッチを再現するため、骨髓支持細胞の代用として遺伝子組換え Notch リガンド蛋白 (Delta1) を底面にコーティングした培養プレートを用い、白血病細胞株を低酸素下にて培養する。このときの細胞内蛋白の発現の様子をウェスタンブロット法にて解析する。また、siRNA により HIF の発現を抑制することで、HIF、Notch シグナルの相互作用を検討する。

(3) 正常血液細胞と白血病細胞において、低酸素下で示す反応性を比較検討するため、

健常者末梢血より単核球を分離し、低酸素培養を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 白血病細胞における HIF、Notch、mTOR、NF- $\kappa$ B シグナルへの効果

白血病細胞を低酸素環境にて培養すると、mTOR 上流の Akt は低酸素により活性化される傾向を示したが、その他のシグナルは抑制される傾向にあった。また、Notch シグナルの標的遺伝子である HES1 の発現は、HIF 蛋白の持続的な発現にも関わらず、ネガティブフィードバック機構が働く細胞株があることが分かった。

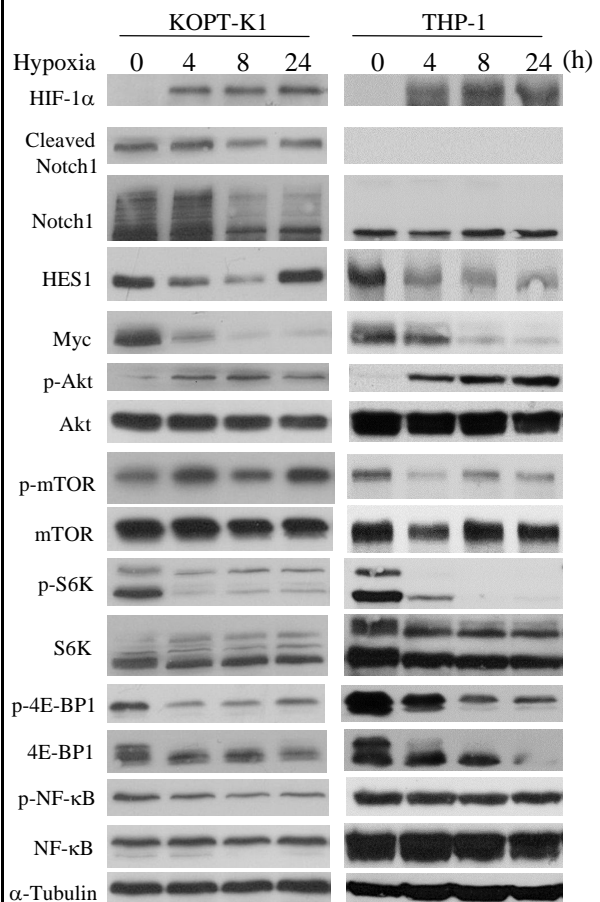


図. 低酸素刺激による白血病細胞株の蛋白発現への効果

#### (2) HIF と Notch との相互作用の検討

骨髓ニッチを再現するため、骨髓支持細胞の代用として遺伝子組換え Notch リガンド

ド蛋白 (Delta1) を底面にコーティングした培養プレートを用い、低酸素下にて培養を行った。その結果、Delta1 により活性化された Notch シグナルは、低酸素培養によって抑制されることが分かった。この現象が、低酸素刺激により発現が誘導される HIF に依存するか否かを調べるため、HIF に対する siRNA を用いて検討を行ったが、HIF の有意なノックダウン効果が見られず、両者の相互作用を明らかにすることはできなかった。

(3) 正常血液細胞における HIF、Notch、mTOR、NF-κB シグナルへの効果

正常血液細胞を酸素下にて培養すると、Notch または mTOR シグナルに明瞭な変化は見られなかったが、HIF の発現において白血病細胞とは異なる現象が見られた。この発現の違いが、正常血液細胞と白血病細胞との性質の違いの一因である可能性が示唆された。

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 5 件)

Kawaguchi-Ihara N, Itoh M, Murohashi I, Tohda S. Establishment of a quenching probe method for detection of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia cells. *Oncology Letters* 2016;11:2429-2432. DOI 10.3892/ol.2016.4225 (査読あり)

Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effect of EPH-Ephrin signaling on the growth of human leukemia cells. *Anticancer Research* 2014;34:2913-2918. (査読あり)

Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. *NOTCH* knockdown affects the proliferation and mTOR signaling of leukemia cells. *Anticancer Research*

2013;33:4293-4298. (査読あり)

Yonekura S, Itoh M, Okuhashi Y, Takahashi Y, Ono A, Nara N, Tohda S. Effects of the HIF1 inhibitor, echinomycin, on growth and NOTCH signalling in leukaemia cells. *Anticancer Research* 2013;33:3099-3103. (査読あり)

Ono A, Oike R, Okuhashi Y, Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Comparative effects of PP242 and rapamycin on mTOR signalling and NOTCH signalling in Leukemia cells. *Anticancer Research* 2013;33:809-814. (査読あり)

〔学会発表〕(計 16 件)

Shohei Nogami, Mai Itoh, Shuji Tohda : Highly sensitive detection of *MYD88* mutation by combination of allele-specific PCR and quenching probe method. The 14<sup>th</sup> Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine Congress. Taipei, Taiwan. 2016.3.26

白鳥恵理香、野上祥平、王詩淳、大高美香、伊藤真以、東田修二：リンパ腫・白血病細胞株の増殖に対する MYD88 阻害薬と BTK 阻害薬の作用. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) 2015.11.20

野上祥平、井原寛子、王詩淳、白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二：リンパ系腫瘍における MYD88 遺伝子変異の新規検査法の開発. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) 2015.11.21

王詩淳、野上祥平、白鳥恵理香、大高美香、伊藤真以、東田修二：白血病細胞における糖転移酵素の発現と Notch シグナル活性化との関連. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) 2015.11.20

奥橋佑基、伊藤真以、細萱茂実、東田修二：Notch シグナル阻害剤に耐性を示す白血病細胞の分子病態. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 長良川国際会議場 ( 岐阜県岐阜市 ) 2015.11.20

大高美香、白鳥恵理香、王詩淳、野上祥平、伊藤真以、東田修二：白血病・リンパ腫細胞に対する BMI1 阻害剤の細胞分子生物学的作用. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会. 長良川国際会議場 ( 岐阜県岐阜市 ) 2015.11.20

Yuki Okuhashi, Yusuke Takahashi, Mika Ohtaka, Erika Shiratori, Shijun O, Mai Itoh, Shuji Tohda: Effects of GLI1 and CTNBN1 knockdown on Notch signaling and proliferation of AML and T-ALL cell lines. The 56<sup>th</sup> American Society of Hematology. San Francisco, USA. 2014.12.6

大高美香、高橋祐介、白鳥恵理香、伊藤真以、東田修二：白血病細胞の増殖に対する Bmi1 阻害剤の作用. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡国際会議場 ( 福岡県福岡市 ) 2014.11.24

井原寛子、伊藤真以、室橋郁生、東田修二：Quenching probe 法を用いた NPM1 遺伝子変異の検出. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡国際会議場 ( 福岡県福岡市 ) 2014.11.24

奥橋佑基、高橋祐介、伊藤真以、東田修二：Wnt シグナル、Hedgehog シグナル関連遺伝子のノックダウンが及ぼす白血病への効果. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡国際会議場 ( 福岡県福岡市 ) 2014.11.24

白鳥恵理香、大高美香、高橋祐介、伊藤真以、東田修二：BCR-ABL 融合遺伝子の定量 RT-PCR 法と定性 RT-Nested PCR 法での検出感度の比較. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡国際

会議場 ( 福岡県福岡市 ) 2014.11.24

Mai Itoh, Yusuke Takahashi, Yuki Okuhashi, Shuji Tohda : Effects of hypoxia on HIF, Notch, Akt, and NF- $\kappa$ B signaling in leukemia cell lines. The 55<sup>th</sup> American Society of Hematology. New Orleans, LA, USA. 2013.12.9

Yuki Okuhashi, Mai Itoh, Nobuo Nara, Shuji Tohda : Effects of *NOTCH* knockdown on the proliferation and mTOR signaling of T-ALL and AML cell lines. The 55<sup>th</sup> American Society of Hematology. New Orleans, LA, USA. 2013.12.7

伊藤真以、奥橋佑基、高橋祐介、東田修二：白血病細胞の生存に対する HIF 蛋白の役割. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸国際会議場 ( 兵庫県神戸市 ) 2013.11.3

奥橋佑基、高橋祐介、伊藤真以、東田修二：Notch を標的とする siRNA を用いた白血病細胞の増殖に対する効果の検討. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸国際会議場 ( 兵庫県神戸市 ) 2013.11.3

高橋祐介、奥橋佑基、伊藤真以、東田修二：白血病細胞における Eph/ephrin 系と Notch 系との相互作用. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸国際会議場 ( 兵庫県神戸市 ) 2013.11.3

〔図書〕(計 0 件)

〔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

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
臨床検査医学分野

<http://www.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab-J.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 真以 ( ITOH, Mai )

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・助教

研究者番号 : 70415545

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし