

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860795

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群(MDS)におけるIL-2受容体 鎖を標的とした新規治療の検討

研究課題名(英文) New treatment strategy for myelodysplastic syndromes targeting the interleukin-2 receptor alpha-chain

研究代表者

小野寺 麻加(近藤麻加)(Onodera-Kondo, Asaka)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80468769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)の一部の症例においてMDS芽球上にIL-2受容体 鎖(IL-2R $\alpha$ 、CD25)の発現を認め、また血漿中可溶性IL-2R $\alpha$ 高値例では予後不良であることが明らかとなった。しかし、CD25陽性MDS芽球は陰性芽球と比較し、細胞周期やアポトーシス、薬剤耐性に差を認めなかった。一方、MDS患者骨髄中に白血病幹様細胞(LSCs)は0.1～6.4%と若干存在しており、一部の症例ではLSCs上にCD25分子が発現し、その発現強度は他の芽球と比較して高かった。これらの結果より、MDS患者において、CD25分子標的薬が腫瘍細胞根絶の治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndromes (MDS) are incurable diseases for transplant-ineligible patients. Our results showed that the interleukin-2 receptor alpha-chain (sIL-2R $\alpha$ , CD25) was expressed on blasts obtained from some patients, and that a high plasma level of soluble IL-2R $\alpha$  was independently associated with poor prognosis in MDS. There was no difference in degrees of cell apoptosis, cell proliferation, and drug resistance between CD25+ and CD25- cells; MDS blasts. Interestingly, 0.1-6.4% of bone marrow mononuclear cells had the same phenotype as lineage-CD34+CD38- leukemia stem cells (LSCs), and CD25 expression was increased on LSCs compared with that of other blasts in MDS patients. Thus, CD25-targeting therapy might be effective even for cancer stem cells in MDS.

研究分野：血液内科

キーワード：MDS CD25 IL2R

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes, MDS)は、血球減少を特徴とし、しばしば急性白血病に進展する予後不良の造血器腫瘍である。申請者グループはMDS芽球の細胞表面分子(補助抑制分子B7-H1等)が病勢進行に關与する知見を蓄積してきた<sup>1)</sup>また、一部の高リスクMDSにおいてCD34陽性芽球上にIL-2R (CD25)が発現していること、血漿中可溶性IL-2R 高値例は予後不良であることを明らかにした<sup>2)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究ではIL-2R に着目し、芽球上のCD25発現とMDS芽球の細胞増殖能や薬剤耐性を解析し、IL-2R と病勢との關連を検討する。また、CD25は白血病幹細胞マーカー分子としても注目されているため<sup>3)4)</sup>、MDS患者における白血病幹細胞(LSCs)におけるCD25発現も解析する。

得られた知見をもとに、抗IL-2R 抗体等を使用したMDSの新規治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1)MDS細胞株4種類(F-36P、SKM-1、MDS-L、HNT34)のCD25発現をFCM法で解析した。
- (2) Human elongation factor 1 alpha (EF1)のプロモーターを用いたIL-2R 発現ベクター(pEF1-IL-2R)を作成し、エレクトロポレーション法によりIL-2R 陰性F-36P細胞へ遺伝子導入を行った。
- (3) 安定型CD25発現F-36P細胞において、フローサイトメトリー(FCM)法を用いてPI染色による細胞周期、BrdU取り込み、Ki-67発現を解析した。
- (4) 安定型CD25発現F-36P細胞にAra-Cあるいはazacitidineを添加培養し、FCMを用いてアポトーシス細胞の割合を解析した。
- (5) 安定型CD25発現細胞にIL-2を添加し、細胞増殖能をFCMにおいて解析した。
- (6) F-36PにAra-Cを添加しCD25分子の発現

誘導をFCMにて解析した。

(7) MDSまたは白血病化MDS患者の骨髄液または末梢血を用いてCD34陽性芽球上のCD25発現をFCM法で解析した。

(8) MDS細胞株4種類においてLSCs(Lin(-)CD34(+)CD38(-)分画をフローサイトメトリー法で解析し、MDS細胞株のLSCsの同定を行った。またLSCsにおけるCD25の発現をFCMで解析した。

(9)MDS患者5例におけるLSCs比率およびLSCs細胞上のCD25発現をFCMにて解析した。

## 4. 研究成果

- (1) MDS細胞4種類のうちMDS-LにおいてCD25の発現を認めた。
- (2)CD25陰性MDS細胞株F-36Pへ遺伝子導入し、安定型CD25発現細胞を樹立した。
- (3)安定型CD25発現F-36Pにおいて、コントロール細胞と比較して細胞増殖能に差を認めなかった。
- (4) 安定型CD25発現F-36P細胞にazacitidine添加するも細胞のアポトーシスは起こらなかった。Ara-C添加においては濃度依存的にCD25発現細胞のアポトーシスが誘導された。しかし、コントロール細胞と比較して薬剤感受性に差はなかった。
- (5) IL-2添加による安定型CD25発現F-36Pの細胞増殖能に変化は認めなかった。
- (6)F-36PにAra-C添加するもCD25分子の発現は誘導されなかった。
- (7)MDSまたは白血化MDS患者において18人中10人の患者でCD25発現を認めた。
- (8)MDS4細胞株において、F36-P、HNT34ではほとんどの腫瘍細胞がLin(-)CD34(+)CD38(-)であり、SKM-1では細胞集団は同定されなかった。MDSLにおいてはLin(-)CD34(+)CD38(-)細胞集団はわずかに認めたものの、細胞集団の割合が一定とならず細胞株における白血病幹細胞LSCsの同定は困難であり、LSCsのCD25発現解析も困難

であった。

(9)MDS 患者における骨髓中の LCSs は単核球の 0.1~6.4%であり、LCSs における CD25 発現は 12.5-30%であり、CD34+芽球上の CD25 発現と比較して発現上昇を認めた。

MDS における芽球上の CD25 発現は、腫瘍細胞における細胞増殖能や薬剤耐性に差を認めず、本研究において CD25 発現による腫瘍増殖能の獲得の機序は同定されなかった。一方で MDS 患者において LSCs 上の CD25 分子が病勢に関連している可能性が考えられ、CD25 分子標的薬が、MDS における腫瘍細胞根絶の治療法となり得る可能性が示唆された。

#### <引用文献>

1) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes.

Kondo A, et al.

Blood. 2010 Aug 19;116(7):1124-31.

2) Elevated plasma soluble interleukin 2 receptor level correlates with defective natural killer and CD8+ T-cells in myelodysplastic syndromes.

Yokose N. et al. Leukemia Research 1994;18:777-782

3) Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells.

Saito Y, et al. Sci Transl Med. 2010 Feb 3;2(17):17ra9.

4) Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML.

Sadovnik I, et al. Clin Cancer Res. 2016 Apr 15;22(8):2051-61.

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

学会名: Myelodysplastic Syndromes Symposium

日時: May 8-11, 2013

場所: Berlin, Germany

題名: Clinical significance of the interleukin-2 receptor alpha-chain expressed by blasts in myelodysplastic syndromes

発表者: M. Ishibashi, H. Tamura, K. Ogata

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺（近藤）麻加  
(Onodera-Kondo Asaka)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号：80468769

(2)研究分担者

(3)連携研究者

田村 秀人  
(Tamura Hideto)

日本医科大学 医学部 准教授

研究者番号：70256949

石橋 真理子

(Mariko Ishibashi)

日本医科大学 大学院医学研究科 ポスト  
ドクター

研究者番号：20599047