

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670186

研究課題名(和文) CXCL12をターゲットとした新規MDS治療モデルの開発

研究課題名(英文) Development of new strategy for MDS treatment targeting CXCL12 signaling

研究代表者

阿部 志保 (Abe, Shiho)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：30632111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞由来の腫瘍であるMDSにおいて、骨髄ニッチ細胞とされるCXCL12陽性細胞と腫瘍の相互作用、病態との関連性を検討した。結果、MDS骨髄ではCXCL12陽性細胞は有意に増加し、これと近接したCD34陽性の腫瘍細胞はアポトーシス耐性を有していた。またCXCL12陽性細胞の多いMDS症例で病期進行が早い傾向が認められた。細胞実験においてもCXCL12産生性間質細胞とMDS由来血球細胞の共培養にて血球細胞のアポトーシス耐性と薬剤耐性の獲得が示され、この相互作用にCXCL12-CXCR4シグナルの存在が示された。これらの結果から、CXCL12を標的としたMDS新規治療戦略の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the association between the CXCL12(+) stromal cells and CD34(+) tumor cells of myelodysplastic syndromes (MDS). In MDS bone marrow, CXCL12(+) cell density was higher than control bone marrow. The CXCL12(+) cells were in contact with CD34(+) tumor cells, which were positive for several anti-apoptotic markers. Furthermore, CXCL12-high MDS cases had the greater tendency to show rapid disease progression than CXCL12-low cases. In vitro analysis, MDS-derived hematopoietic cell line cells cocultured with CXCL12(+) stromal cell line cells showed upregulation of anti-apoptotic molecules and drug-resistance for Ara-C treatment. These phenomena were inhibited by CXCR4 antagonist, AMD3100, therefore CXCL12-CXCR4 signaling was essential for the interaction between MDS cells and CXCL12(+) stromal cells. Thus, CXCL12(+) stromal cells may represent a novel MDS therapeutic target.

研究分野：骨髄病理

キーワード：造血幹細胞ニッチ 骨髄異形成症候群 CXCL12 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) とは骨髄造血幹細胞の異常をきたす血液腫瘍であり、発症当初は腫瘍細胞の増殖とともにアポトーシスを起こして無効造血、汎血球減少を呈するが、病期進展に伴ってアポトーシス耐性獲得と芽球増加が起こり、やがて急性白血病へと進展する。白血化すると化学療法抵抗性であり、造血幹細胞移植以外には根本的な治療法が確立されていない。また、高齢者に多いため移植できる症例もごく限られており、予後は不良とされている。

一方、最近になり、正常組織および腫瘍組織におけるニッチの存在が脚光を浴びてきている。ニッチとは種々の幹細胞を維持するのに重要な微小環境のことであるが、なかでも骨髄造血幹細胞ニッチについてはマウス骨髄にて CXCL12 陽性細胞が重要であるといわれている。また腫瘍組織のニッチに関しては、ニッチの存在が腫瘍幹細胞の治療抵抗性に関与するという報告や、ニッチの異常が血液腫瘍の発症に関与するという報告もされている。

2. 研究の目的

研究者らはこれまでにヒト骨髄における CXCL12 陽性細胞の同定を行い造血幹細胞との密な関連性を明らかにしており、CXCL12 陽性細胞がヒトにおいても造血幹細胞ニッチの構成因子である可能性を示してきた。さらに造血幹細胞由来の血液腫瘍である MDS 骨髄において CXCL12 遺伝子発現が高いことも明らかにした (第 71 回日本癌学会総会記事 p301: 2012)。そこで本研究では、MDS 骨髄におけるニッチの同定および MDS 病態との関連性を解析し、治療への応用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄検体の選択と収集

ホルマリン固定パラフィン包埋骨髄検体は、東京医科歯科大学医学部附属病院で採取された MDS と MDS 由来の AML (AML-MRC) と、比較対象として *de novo* AML 骨髄検体、対照例として血液疾患のない骨髄検体とを選択し用いた。

(2) 免疫組織学的手法を用いた骨髄 CXCL12 陽性細胞の同定と定量、局在解析

ホルマリン固定パラフィン包埋骨髄検体から薄切した組織切片と抗 CXCL12 抗体を用いて免疫染色を行い、MDS と AML-MRC および *de novo* AML、対照症例の CXCL12 陽性細胞の同定を行った。さらに画像処理ソフト (ImageJ) を用いて CXCL12 陽性細胞の密度を定量し、各群で比較検討した。次に抗 CXCL12 抗体および、血管内皮と幼若な造血細胞を同時に標識する抗 CD34 抗体を用いて免疫二重染色を行い、MDS 骨髄における CXCL12 陽性細胞と血管や CD34 陽性造血細

胞との局在関連を解析した。

(3) CXCL12 産生性間質細胞と血球細胞を用いた共培養実験

MDS 骨髄における CXCL12 陽性細胞と血球細胞の相互作用について解析するため、CXCL12 産生性間質細胞と血球細胞の共培養実験を行い、アポトーシス応答や遺伝子発現解析、治療薬剤反応性などの検討を行った。

マウス間質細胞株とヒト骨髄球系血球細胞株を用いた共培養実験

ヒト CXCL12 を強制発現させたマウス線維芽細胞株 (3T3) と、ヒト骨髄球系血球細胞株 (HL60, THP-1, K562) を共培養することにより、CXCL12 発現細胞との共存が血球細胞に与える影響を解析した。具体的にはウェスタンブロット法を用いた BCL-2 などのアポトーシス関連分子の発現解析を行った。

ヒト骨髄間質細胞株と MDS 由来細胞株を用いた共培養実験

ヒト骨髄由来の CXCL12 産生性間葉系幹細胞である UE6E7T-2 細胞と、ヒト MDS 骨髄由来の血球細胞株である SKM-1 細胞を共培養して血球側のアポトーシス関連分子の発現解析を行った。さらに治療薬剤反応性の解析として、抗癌剤 Ara-C を投与した場合の、血球のアポトーシス頻度の変化を検討した。

(4) MDS 骨髄検体における血球のアポトーシス応答の解析

細胞実験の結果を踏まえ、MDS 骨髄において、CXCL12 陽性細胞と接する CD34 陽性血球細胞におけるアポトーシス応答を検討した。具体的には抗アポトーシス分子である BCL-2 およびアポトーシスを検出する cleaved caspase 3 の免疫染色を施行した。

(5) MDS 骨髄における CXCL12 発現と予後の関連性の検討

MDS 症例において、CXCL12 高発現群と低発現群で予後に差があるかどうか検討した。

(6) 統計解析

骨髄検体の免疫染色解析には Mann-Whitney の U 検定および Kruskal-Wallis 検定を用いた。免疫染色結果と予後の検定には 2 検定を用いた。細胞実験におけるアポトーシス頻度の解析には Student の *t* 検定を用いた。いずれの検定においても $P < 0.05$ を統計学的有意差として採用した。

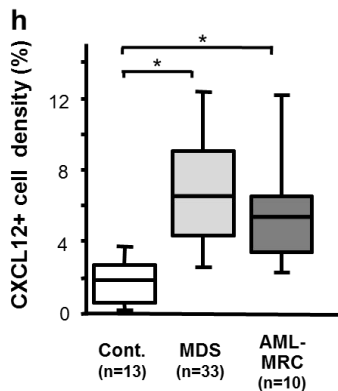
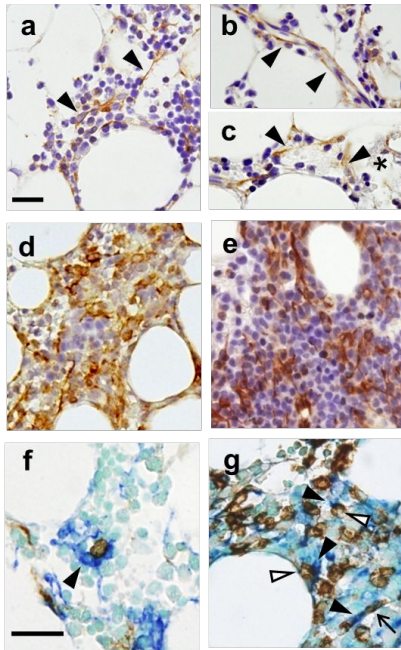
4. 研究成果

(1) 骨髄における CXCL12 陽性細胞の局在解析と定量

対照例の骨髄において CXCL12 陽性細胞は血管周囲および間質内に分布する細胞として同定され (図 1a-c)、MDS/AML-MRC の骨髄ではその密度は有意に増加していた (図 1d/1e, 図 1h)。また対照骨髄および MDS 骨髄において CXCL12 陽性細胞は CD34 陽性造血細

胞と近接して局在していた(図 1f 対照骨髓, 図 1g MDS 骨髓)。

図 1

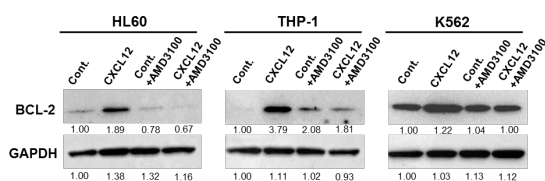


(注) 図 1a-e CXCL12: 茶
図 1f-g CXCL12: 青 CD34 : 茶

(2) CXCL12 産生性間質細胞と血球細胞を用いた共培養実験

ヒト CXCL12 を強制発現させたマウス線維芽細胞株 (3T3) と、ヒト骨髓系血球細胞株 (HL60, THP-1, K562) を共培養した結果、共培養下では血球細胞において抗アポトーシス分子である BCL-2 の発現亢進が認められた。この変化は CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 投与にて阻害され、アポトーシス耐性獲得における CXCL12-CXCR4 シグナルの関与が示唆された(図 2)。

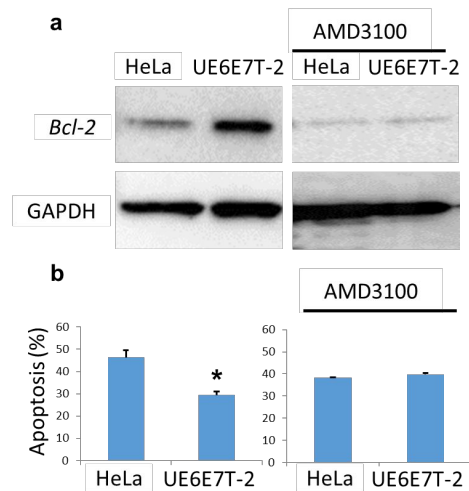
図 2



次に、ヒト骨髓由来の CXCL12 産生性間葉系幹細胞である UE6E7T-2 細胞と、ヒト MDS 骨髓由来の血球細胞株である SKM-1 細胞を共培養した結果、と同様に共培養下では SKM-1 細胞において BCL-2 発現亢進が認められた(図 3a 左)。

さらに治療薬剤反応性解析として、抗癌剤 Ara-C を投与下における血球のアポトーシス頻度の変化を検討したところ、共培養下では Ara-C により誘導される SKM-1 細胞のアポトーシス応答は抑制され、薬剤耐性が示された(図 3b 左)。これらの変化はともに AMD3100 投与にて阻害され(図 3a, b 右)、ヒト細胞株においても共培養におけるアポトーシス耐性獲得に CXCL12-CXCR4 シグナルが関与していることが示唆された。

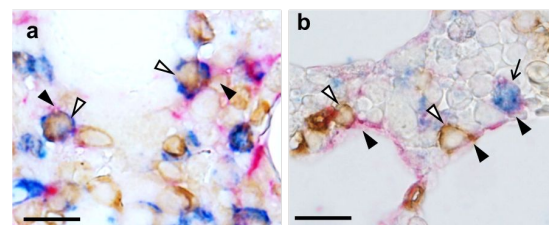
図 3



(3) MDS 骨髓検体における血球のアポトーシス応答の解析

MDS 骨髓において、CXCL12 陽性細胞と接する CD34 陽性血球細胞における BCL-2 およびアポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 の免疫染色を施行した。結果、CXCL12 陽性細胞と接する CD34 陽性造血細胞は BCL-2 高発現(図 4a) かつ cleaved caspase 3 陰性(図 4b)であり、アポトーシス耐性を有していることが判明した。

図 4



(注)
図 4a CXCL12: 赤, CD34 : 青, bcl-2: 茶
図 4b CXCL12: 赤, CD34: 茶, cleaved caspase 3: 青

(4) MDS 骨髄における CXCL12 発現と予後の関連性の検討

初期の MDS 症例 (RCMD) において、CXCL12 高発現群と低発現群で予後の検討を行ったところ、CXCL12 高発現群では 5 症例中の 4 症例がより 2 年以内に病期の進行したステージ (RAEB ないし AML-MRC) に至ったのにたいし、CXCL12 低発現群では 6 例中いずれの症例も病期進行が認められなかった ($P < 0.05$)。この結果から、CXCL12 陽性細胞の密度が初期 MDS 症例において予後と関連していることが示された。

(5) まとめ

これらの結果から、CXCL12-CXCR4 シグナルを介した CXCL12 陽性細胞と血球細胞との相互作用が、MDS 骨髄において腫瘍細胞のアポトーシス耐性獲得や病期進展に関与していることが示唆された。先に述べた通り、腫瘍ニッチの存在が注目を集めつつあるが、MDS におけるニッチに着目した研究は国内外を含めて現在のところほとんど報告がなく、ニッチの異常が腫瘍のアポトーシス耐性の獲得や病期進展に関与しているとの本研究結果は、MDS の新しい治療戦略開発につながる可能性があると思われる。

実際、MDS は化学療法に抵抗性であるが、これは、いわば「中身」である造血細胞が化学療法によりダメージを受けても、「容れ物」である腫瘍性ニッチが残存している限り、腫瘍性の造血幹細胞が残存ないし再度発生し増殖しやすい環境が整っており、腫瘍再発をきたしているのかもしれない。腫瘍細胞のみにターゲットを絞った従来の治療法では MDS において根本的な治療が得られなかった理由が、腫瘍ニッチの存在を無視していたことによるとすれば、本研究結果が根本的な MDS 治療法の開発に大きく貢献できると考えられる。今後の展望としては、この CXCL12 をターゲットとした新規治療モデルの開発のため、本研究期間では成し遂げられなかった異種骨髄移植モデルマウスの実験系を確立し、*in vivo* でより詳細な解析を行なうことが必要と思われる。

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 1 件)

Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Nashimoto M, Murayama T, Hidaka M, Kitagawa M. CXCL12+ stromal cells as bone marrow niche for CD34+ hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. *Laboratory Investigation*. 査読有. 94, 2014, 1212-23, 10.1038/labinvest.2014.110.

[学会発表](計 5 件)

北川昌伸、阿部志保、阿部晋也、大西威一郎、桐村進、倉田盛人、山本浩平. 骨髄異形成症候群における造血幹細胞ニッチの関与. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年 5 月 13 日. 仙台国際センター(仙台)

北川昌伸、阿部志保、倉田盛人、阿部晋也、大西威一郎、桐村進、山本浩平. CXCL12+ stromal cells as none marrow niche and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. 第 74 回日本癌学会総会. 2015 年 10 月 9 日. 名古屋国際会議場(名古屋).

阿部志保、山本浩平、阿部晋也、桐村進、村山寿彦、北川昌伸. Expression analysis of CXCL12 in myelodysplastic syndromes. 第 73 回日本癌学会総会. 2014 年 9 月 26 日. パシフィコ横浜(横浜)

阿部志保、山本浩平、阿部晋也、桐村進、北川昌伸. 骨髄異形成症候群における CXCL12 陽性細胞の定量および局在解析. 第 11 回日本病理学会カンファレンス. 2014 年 8 月 1 日. 六甲山ホテル(神戸)

阿部志保、山本浩平、阿部晋也、大西威一郎、桐村進、村山寿彦、北川昌伸. 骨髄異形成症候群における CXCL12 陽性細胞の定量および局在解析. 第 103 回日本病理学会総会. 2014 年 4 月 25 日. 広島国際会議場(広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部志保 (ABE, Shiho)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号: 30632111