様 式 Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９ （共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年 ５ 月 １９ 日現在

機関番号：１４１０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９１５４６
研究課題名（和文）白血病微小環境（骨髄及び中枢神経系）におけるＮ－カドヘリン分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the N- cadherin molecular mechanism in the leukemia microenvironment in bone marrow and the central nervous system

研究代表者
岩本　彰太郎（IWAMOTO, Shotaro）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：２０４５６７３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：N－カドヘリンは、カルシウム依存性細胞間接着分子の一つで、細胞骨格形成に関わるとともに、正常造血において重要な役割を担っている。今回、小児急性白血病に注目し、白血病－骨髄ニッチにおける同分子の臨床的意義を検討した。N－カドヘリンはprimary/hTERT不死化骨髄由来ストローマ細胞（BMSCs)で高発現し、急性白血病の細胞株及び初発時検体のなかにも発現することを認めた。更に、BMSCsと白血病細胞との共培養実験で、同分子の接着抑制抗体を用いると、白血病細胞の薬剤感受が増強した。以上から、N－カドヘリンは、骨髄微小環境における小児急性白血病細胞の薬剤耐性機序に関与することが予想された。

研究成果の概要（英文）：N-cadherin, a family of Ca2+-dependent intercellular adhesion molecules, plays key roles in controlling morphogenetic movements during development and hematopoiesis in bone marrow (BM). Recently, it has been reported that this molecule might be associated with drug resistance in adult leukemia. Then we studied the clinical significance of N-cadherin in BM niche in acute childhood leukemia.
We found that N-cadherin was highly expressed on primary / hTERT immortalized BM stroma cells (BMSCs). Several kinds of leukemic cell lines and primary childhood leukemia cells also expressed different levels of N-cadherin. In addition, drug sensitivity in leukemic cells for anti-leukemic agents in co-culture system between leukemic cells and BMSCs increased in the presence of GC-4 antibody that can inhibit N-cadherin adherens junction formation .Taken together, these results supported that N-cadherin might be related to drug resistance in childhood acute leukemic cells in BM microenvironments.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：N-カドヘリン　白血病微小環境　急性白血病

1．研究開始当初の背景

小児急性白血病の治療成績は向上してきているものの、依然 2～3 割の患児に再発例を認める。更なる治療成績の向上には、白血病細胞のみを捉えた視点での研究では不十分であり、白血病細胞とそれらを支持する細胞・組織間に形成される“白血病微小環境”に注目し、それらに関わる分子機構解明が望まれる。

白血病細胞と骨髄ストローマ細胞との細胞間接着に関しては、ケモカイン及びインテグリン関連分子が盛んに研究されているが、カルシウム依存性細胞接着分子であるカドヘリンに着眼した報告は少ない。

カドヘリンは、細胞表面においてカルシウム依存的に結びつく膜タンパク質で、細胞間接着形成及び細胞構造の安定性に関与し、その種類は百以上にのぼる。その内、約 20 種類のサブファミリーから構成されるクラシックカドヘリンの一つに N-カドヘリンがある。Zhang らは造血幹細胞の自己複製能を支持するのは骨芽細胞であり、その中でも骨表面に並ぶ N-カドヘリン陽性紡錘形細胞が造血幹細胞と接着し、正常造血幹細胞のニッチを形成していることを報告した（Nature.2003;425:836）。更に、Hosokawa らは造血幹細胞の long-term engraftment には骨髄ニッチにおける N-カドヘリンが不可欠であることを示した（Blood. 2010;116:554）。この骨芽細胞を裏打ちし、かつ同細胞へ分化可能な細胞こそがストローマ細胞である。

N-カドヘリンは、近年様々な癌細胞に高発現していることが示され、白血病細胞においても、いくつかの報告が散見される。急性リンパ性白血病（ALL）に関しては、Nygren らが E2A/PBX1 キメラ蛋白を誘導する t(1;19)転座を有する N-カドヘリン陽性リンパ性白血病ヒト細胞株(697)を用いて、白血病細胞と骨髄ストローマとの接着に N-カドヘリン分子が関与し、β-カテニンが同分子の発現調整に影響していることを示した（Exp Hematol. 2009;37:225）。また、Zhang らはマウスモデルにおいて N-カドヘリンを発現するフィラデルフィア陽性リンパ性白血病細胞株を mouse embryonic fibroblast と共培養すると、白血病細胞株に薬剤耐性が生ずることを報告した（Leukemia. 2007;21:1189）。一方、急性骨髄性白血病（AML）に関しては、Zhi らが成人 AML63 名の初発時及び治療後骨髄検体における N-カドヘリン蛋白の発現変化をフローサイトメトリーで検討し、初発時検体では CD34+/CD38-/CD123+/N-カドヘリン+分画を 0～49.8%に認め、その頻度は予後不良染色体異常（complex, -5,-7）を有する群で有意に高く、治療抵抗群では治療後検体で同分画の増加を認めた（Cancer letter. 2010 ;296:65）。これらの報告から、急性白血病細胞と骨髄ストローマ細胞とが接着することで誘導される薬剤耐性機構に N-カドヘリン分子が関与することが示唆されたが、依然解決すべき問題点が残されている。

本研究では骨髄ストローマ細胞に高発現している接着分子の一つである N-カドヘリンを研究標的分子とし、“白血病微小環境”における役割と同分子の発現抑制剤の抗白血病効果を検討することとした。

2．研究の目的

急性白血病及び骨髄ストローマにおける N-カドヘリン分子に関する既報は、①成人症例のみの検討で、かつ急性白血病の一部のサブタイプに限られたものであったこと、②白血病―骨髄ストローマ細胞間における N-カドヘリン分子の役割を実証する方法が中和抗体を用いた間接的手法であったことが課題として挙げられる。

本研究では、上記課題に従い、かつ小児急性白血病の骨髄微小環境における N-カド

ヘリン分子機構をについて検討することとした。

①について、小児急性白血病でのN-カドヘリン抗原の発現を検討すること。②については、白血病―骨髄間に形成される白血病微小環境及びそれに関連する薬剤耐性機序にN-カドヘリン分子が関与しているかを検証するために、遺伝子改変システムを用いヒト *in vitro* 実験系で検討することとした。

３．研究の方法

本研究では、①小児急性白血病細胞でのN-カドヘリン抗原の発現頻度、②“ *in vitro* ヒト白血病－骨髄微小環境モデル ”を用いた、白血病微小環境におけるN-カドヘリン分子の臨床的意義について検討する。

①に関しては、まず米国小児がん専門病院（セントジュードこども病院；テネシー州メンフィス）における小児急性白血病初発時検体遺伝子プロファイリング解析データベースを基に、N-カドヘリン発現頻度を検討するとともに、本邦での小児急性白血病細胞におけるN-カドヘリン抗原発現をフローサイロメトリー法（FACS）にて検討する。②に関しては、小児白血病N-カドヘリン分子機構を検討するために、急性白血病細胞株及び本邦での小児急性白血病細胞におけるN-カドヘリン抗原発現をFACSあるいはPCR法にて検討する。また、白血病―骨髄微小環境研究としてヒト骨髄由来不死化ストローマ細胞株と急性白血病細胞との共培養実験系を基本とし、migration、leukemic cell adhesion及びcytotoxicity assayを行う。N-カドヘリン分子機能解析には、（１）N-カドヘリン中和抗体、（２）レトロウイルス遺伝子改変技術によるN-カドヘリン蛋白発現レベルの異なる細胞株を用いて検証する。その他、細胞形態変化に関しては、倒立型顕微鏡で検討する。

４．研究成果

①小児急性白血病細胞での N-カドヘリン分子の発現頻度：

米国小児がん専門病院（セントジュードこども病院；テネシー州メンフィス）における小児急性白血病初発時検体 457 例（ALL:327 例、AML:130 例）の遺伝子プロファイリング解析データベースを元に、N-カドヘリンの発現率を検索した結果、ALL では 28.1％（92 例）に、AML では 4.6％（6 例）にその発現を認めた。更に、染色体転座異常と同分子の発現頻度を検討したところ、ALL では頻度の多い順に T-ALL（60.5％）、TEL/AML1（45.6％）、BCR/ABL（40％）、E2A/PBX1（18.5％）、MLL（10％）、Hyperdiploidy（9.4％）で、AML ではそれらによる差は認めなかった。これらの結果からN-カドヘリンの発現は AML より ALL に多く、ALL ではそのサブタイプにより発現頻度に差があることが分かった。

②白血病－骨髄微小環境における N-カドヘリンの意義：

小児白血病治療成績の更なる向上をめざし、骨髄ストローマ細胞に高発現する接着分子（N-カドヘリン）を標的分子とし、白血病における同分子の臨床的意義を検討した。

3 年間の研究期間のうち、前半 2 年では、ヒト不死化骨髄ストローマ細胞株(hTERT-BMSC)、白血病細胞株及び小児 T 細胞性白血病初発時検体における N-カドヘリンの発現を PCR 及び Western blot 法で確認した。その結果、B-pre ALL 細胞株では 697 にのみ、T-ALL 細胞株では CEM、Molt4、AML 細胞株では KG１、KG1a において、その発現を認めたが、蛋白レベルでは AML 細胞細胞株での検出は困難であった（図１，２）。

一方、骨髄ストローマ細胞（BMSC）では、primary でも hTERT-BMSC においても、N-

カドヘリン抗原は高発現しており（図３）、レトロウイルスベクターを用いたい RNAi では、ほぼ完全に同分子の発現を抑制した細胞株を樹立できた（図４）。ALL 細胞株で高発現していた 697 細胞株においても、同様に同分子の発現抑制細胞株を樹立した。697 細胞は、細胞培養時、細胞塊（aggregate）を形成し増殖していくが、同分子抑制細胞では、細胞塊を形成せず、細胞塊形成には N-カドヘリンが関与していることが分かった（図５）。
本研究最終年度では、697 細胞株の薬剤感受性において、N-カドヘリンの影響を検討するために N-カドヘリン中和抗体(GC-4)を用いた感受性試験を実施したとこと、dexamethasone 、 L-asparaginase 、vincristine 等の白血病主要薬剤で殺細胞効果が増強する傾向を認めた。また、急性骨髄性白血病検体における N-カドヘリン抗原発現を多次元フローサイトメトリーにて初診時から治療後まで追跡したが、初診時から発現している検体がなく、今後の課題（抗体の種類や検体数を増やす）として取組む必要があると思われた。
これらのことから、N-カドヘリンは、白血病細胞の薬剤耐性機序にある一定の役割を担うことが予想され、N－カドヘリンを高発現する BMSC との白血病骨髄微小環境での同分子発現抑制剤は、臨床的意義を見出すものと期待される。

図１．白血病細胞株 PCR 解析

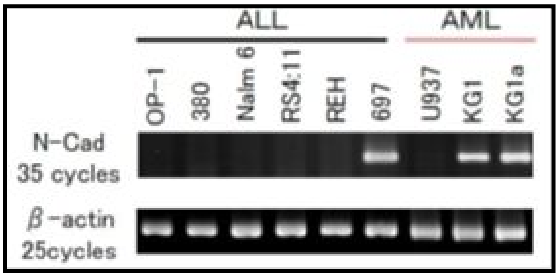


図２．白血病細胞株、T-ALL 初発検体 FCM 解析 （赤：N-cadherin 分子発現）

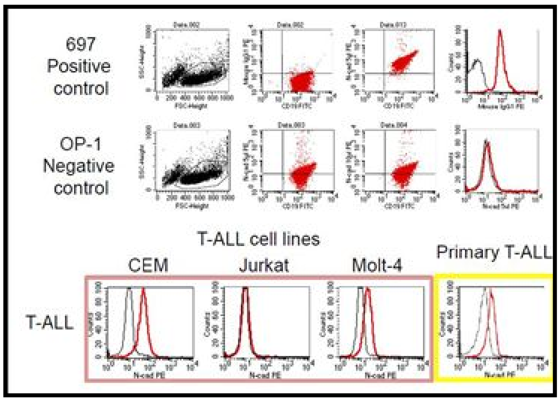


図３．BMSC PCR 解析

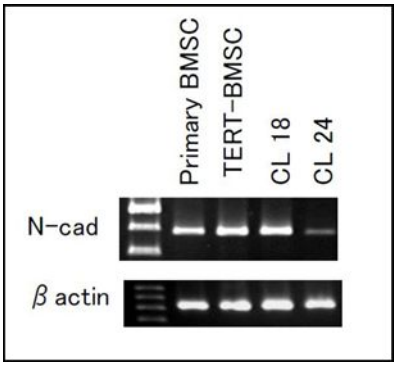


図４．BMSC でのRNAi 細胞株（Western blot）

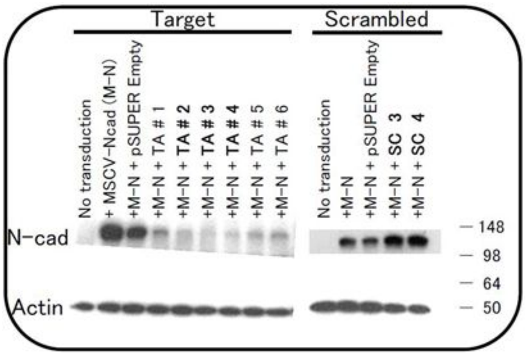
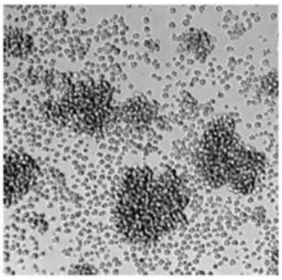


図５. 697 RNAi 細胞株の細胞塊形成
スクランブルベクタ導入



標的ベクター導入

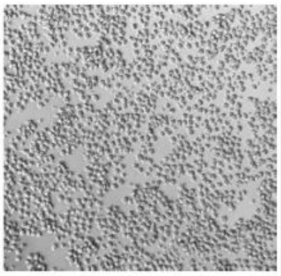
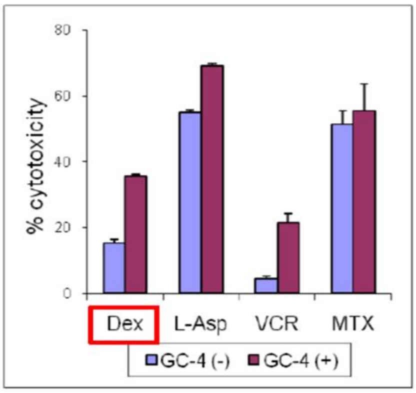


図６．N-cadherin 中和抗体による 697 細胞の薬剤感受性変化



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）
Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, Fujisawa T, Nagao M, Shimada E, Nakamura R, Teshima R, Ohishi K, Toyoda H, Komada Y. Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils.
Pediatr Blood Cancer. 2014;61:1160-1161
査読　有
〔学会発表〕（計１件）
岩本彰太郎、岩佐正、木平健太郎、天野敬史郎、豊田秀実、出口隆生、平山雅浩、堀浩樹、東英一、駒田美弘
Clinical outcome of newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia: Single institute experience
第76回日本血液学会学術集会.大阪国際会議場. 2014.11.1
〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等　該当なし

６．研究組織
(1)研究代表者
岩本彰太郎（IWAMOTO, Shotaro）
三重大学医学部附属病院・周産母子センター・助教
研究者番号：20456734

(2)研究分担者
平山雅浩（HIRAYAMA, Masahiro）
三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号： 90293795

(3)連携研究者
（　該当者なし　）

研究者番号：