

奨励金No.1501

血管の新機能を標的とした、白血病に対する革新的治療戦略の創出

木戸屋 浩康

福井大学学術研究院 医学系部門 血管統御学分野 教授

Research for leukemia therapy targeting novel function of blood vessels

Hiroyasu Kidoya,

Department of Integrative Vascular Biology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui,
Professor



本研究では白血病の血管に注目し、新しいコンセプトによる治療薬開発を目指して研究を進めた。血管は、酸素や栄養分の供給路として働くことが知られているが、それに加えてアンジオクリンファクターと呼ばれる分子群を産生することで組織の制御に働くことが明らかになりつつある。解析を進めたところ、白血病では骨髄血管の異常化が誘導されており、この異常化した血管から産生されるアンジオクリンファクターが白血病の進展・再発に働くという「負のスパイラル」が存在する可能性を見出した。

In this study, we focused on the bone marrow microenvironment in the progression of leukemia, and analyzed tumor blood vessels, which are a common therapeutic target in the treatment of solid tumors. We performed analysis using Regnase-1 deficient mice that spontaneously develop acute myeloid leukemia. It has been shown that mice lacking Regnase-1 specifically in the hematopoietic cell lineage exhibit AML-like symptoms. Using these mice that spontaneously develop leukemia, we proceeded to analyze the structural and functional changes in the bone marrow vasculature in leukemia. The results showed that an increase in the number of blood vessels and abnormal formation of vascular structures in the bone marrow occurred with the onset of leukemia. These results indicate that abnormal bone marrow vascularization is associated with leukemia progression.

1. 研究内容

本研究では、革新的な白血病の進展・再発抑制法を開発するため、白血病の骨髄で認められる異常血管とアンジオクリンファクターを標的とした新規治療法の開発を進めた。申請者は白血病を促進するアンジオクリンファクターの同定のため、正常な骨髄血管内細胞と比較して白血病において高発現する分泌分子をインフォマティクス解析にて探索した。その結果、AF1とAF2という2つのアンジオクリンファクターの候補を得ることができた。さらに、*in vitro*での造血幹細胞の培養系においてAF1とAF2を添加すると、過剰な増

殖と細胞形質の変化が誘導されることを確認している。これらの分子は白血病との関連性がこれまで示されておらず、新たな治療標的となる可能性がある。本研究では、これらのアンジオクリンファクターを標的とすることで「白血病細胞-骨髄腫瘍血管の負のスパイラル」を解消する効果的な白血病の治療法開発を目指す。

1.1 白血病モデルマウスを用いた骨髄血管の解析

急性骨髄性白血病を自然発症する Regnase-1 遺伝子欠失マウスを用いて解析を進めた。Regnase-1 は RNA 分解酵素で、標的とする mRNA の 3' UTR

に存在する Stem-loop 領域を介して mRNA を分解する働きを持つ分子である。血球細胞系特異的に Cre を発現する Vav1-Cre マウスを用いることで血球細胞系特異的に Regnase-1 を欠損するマウス (Vav1-Cre; Regnase-1^{flox/flox}) を作成すると、成長に伴って徐々に体重の減少が認められ、生後8週から12週頃にはほぼ全てが死亡する。その死因について解析を進めると、著しいリンパ節腫脹と脾腫および、末梢血中に特徴的な芽球の出現が認められるなど AML 様の症状を呈していることが明らかとなった。また、通常では生体内で増殖することがない長期造血幹細胞 (Lineage 陰性、cKit 陽性、Sca1 陽性、CD34 陰性、Flt3 陰性) が、著しく増加していることが明らかとなった。この白血病を自然発症するマウスモデルを用いて、白血病における骨髓血管の構造的および機能的な変化の解析を進めた。マウスが白血病を発症した後に大腿骨を回収して組織切片を作成し、血管内皮細胞のマーカである CD31 と Endomucin に対する蛍光免疫染色を行うと、白血病の発症に伴って骨髓中の血管数の増加や血管構造の異常が起きており、いわゆる「腫瘍血管化」が起きていることが確認できた。特に活性化した血管内皮細胞に特異的に発現する Endomucin が大多数の血管において高発現しており、血管内皮細胞に大きな特性変化が起きていることが明らかとなった。このような白血病に伴う骨髓血管の変化は、Regnase-1 遺伝子欠失マウスにおいて特異的に起きる現象ではなく、MML-AF9 細胞もしくは H9M1 細胞を C57BL/6 マウスへ移植することによって作成した白血病モデルマウスにおいても同様に確認された。これらの結果から、白血病の発症・進展により、骨髓微小環境の変化が誘導され、その結果として骨髓血管も異常化していることが示された。

1.2 白血病の進展における異常骨髓血管の役割

白血病の進展に伴って構造的に異常化した骨髓血管が、機能的にも白血病の進展に影響を与えて

いるかの検討を進めた。一般的に固形がんの進展に伴って形成される腫瘍血管は、がん組織に酸素と栄養を供給することでがんの増殖を支えているが、非固形がんである白血病ではがん組織が拡大化していくことがないため、腫瘍血管が固形がんとは異なる役割を担っていると考えられる。注目したのはアンジオクラインファクターと呼ばれる血管から産生され周辺組織に作用する分子群である。骨髓の血管ニッチでは、血管がアンジオクラインファクターを産生することで造血幹細胞の分化や増殖を制御しており、造血系の恒常性維持に働くことが知られている。申請者は、白血病細胞が骨髓血管の異常化を導き、異常化した血管から産生されるアンジオクラインファクターが白血病の進展・再発に働くのではと考え解析を進めた。白血病マウスの異常化した骨髓血管から特異的に産生されるアンジオクラインファクターを同定するため、Regnase-1 遺伝子欠失マウスの骨髓から血管内皮細胞を回収して RNA-seq 解析を進めた。その結果、多くの遺伝子発現が有意に変化していることが明らかとなり、その中でも細胞外に分泌される、もしくは細胞膜に発現する分子を選定した。得られた候補遺伝子について、骨髓血管内皮細胞に対する RT-PCR による遺伝子発現解析や、骨髓組織切片に対する特異的抗体による免疫染色を行うことで2つの候補分子 (AF1 と AF2) を選定した。これらのアンジオクラインファクターの白血病進展への影響を検討するため flox マウスを作成し (AF1^{flox/flox} および AF2^{flox/flox})、血管内皮細胞にて特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (VEcadherin-Cre) をかけ合わせて血管内皮細胞にて特異的に遺伝子を欠損するマウスを作成した (VEcadherin-Cre; AF1^{flox/flox} および VECadherin-Cre; AF2^{flox/flox})。このアンジオクラインファクター欠損マウスに、Regnase-1 遺伝子欠失マウスの造血細胞を移植することで白血病を誘導したところ、造血細胞の異常増殖やリンパ節腫脹および脾腫の抑制が認められた (図1)。さらに、生存期

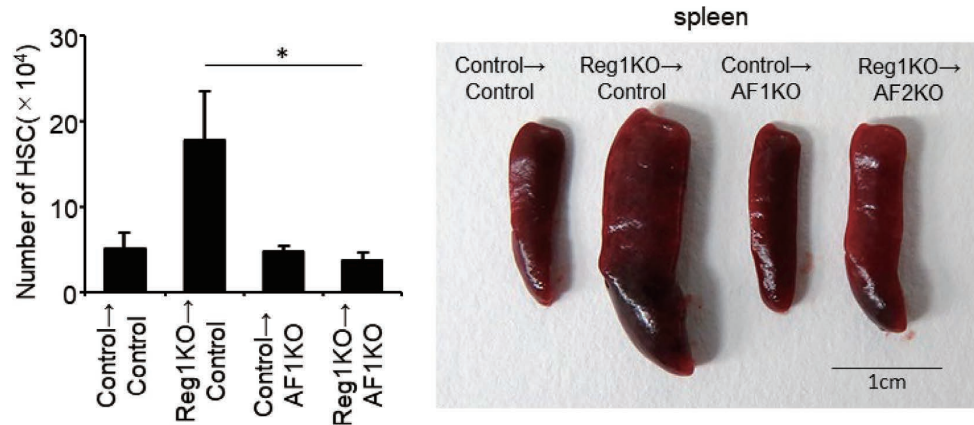


図1. AF1の欠損マウスでは白血病の進展を抑制される。

a) Reg1KO白血病細胞の移植では移植した造血幹細胞の異常増殖と脾腫が認められるが (Reg1KO → Control 群)、血管内皮細胞にて AF1 を欠損するマウス (Reg1KO → AF1KO 群) ではそれが抑制されている。得られた結果は student's t-test によって検定した。* $p < 0.05$ 。

b) 白血病の進展による脾臓の肥大化も同様に抑制される。(スケールバー：1 cm)

間も有意に延長することが確認された。

1.3 考察と展望

かつては「不治の病」とされていた白血病は、抗がん剤や分子標的療法の発達に伴い、今では治療可能な病となりつつある。しかしながら、寛解状態へ治療した後に生じる高い再発率のリスクは、依然、白血病患者に不安と恐怖を与えている。そのため、再発のメカニズムを明らかにし、根治を達成することが、白血病治療の現場から強く望まれている。本研究の結果から、がん細胞自身を標的とした治療に加え、進展や再発の要因として潜在する骨髄腫瘍血管やアンジオクリンファクターを制御することによる白血病の治療法の可能性が示された。しかしながら、本研究ではマウス白血病モデルを主に用いて解析を行っており、白血病の骨髄における血管の変化や異常なアンジオクリンファクターの産生がヒト白血病でも同様に起こるのか検証を進める必要がある。今後、さらなる解析が進むことで、骨髄腫瘍血管やアンジオクリンファクターを標的とした治療薬の開発へと繋がることを期待する。

2. 発表 (研究成果の発表)

本研究は、公益財団法人日立財団からの助成を賜りましたことで大きく進展させることができました。研究へのご理解とご協力に厚く感謝申し上げます。なお、本研究成果は現在投稿準備中です。

2.1 論文発表

Inukai K, Kise K, Hayashi Y, Jia W, Muramatsu F, Okamoto N, Konishi H, Akuta K, Kidoya H, Takakura N. Cancer apelin receptor suppresses vascular mimicry in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* 29: 1610867. 2023.

Takara K, Hayashi-Okada Y, Kidoya H. Neurovascular Interactions in the Development of the Vasculature. *Life (Basel).* 13(1): 42. 2022.

Morita M, Yoneda A, Tokunoh N, Masaki T, Shirakura K, Kinoshita M, Hashimoto R, Shigesada N, Takahashi J, Tachibana M, Tanaka S, Obana M, Hino N, Ikawa M, Tsujikawa K, Ono C, Matsuura Y, Kidoya H, Takakura N, Kubota Y, Doi T, Takayama K, Yoshioka Y, Fujio Y, Okada Y. Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and

mortality in endotoxemia and COVID-19 models.
Proc Natl Acad Sci U S A. 120(3): e2213317120.
2023.

2.2 学会発表

木戸屋 浩康. 造血系の正常と異常を制御するアン
ジオクラインシステム. 第44回日本分子生物学会
年会. 幕張メッセ. 12月2日、2022年

木戸屋 浩康. アンジオクラインシステムによる正
常と異常の制御. 第6回 Neuro-Vascular 研究会.
まつや千千. 2月20-21日、2023年