主論文の要旨

Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells

（低分子化合物ヘッジホッグ阻害剤は
急性骨髄性白血病細胞の白血病構築能を抑制する）

名古屋大学大学院医学系研究科　分子総合医学専攻
病態内科学講座　血液・腫瘍内科学分野
（指導：清井 仁　教授）
福島 庸晃

【緒言】

ヘッジホッグ（Hh）シグナル伝達経路は臓器の発生と維持に重要な役割を担っており、その異常な活性化が様々な悪性腫瘍の発生や進展に関与していることが明らかとなっている。

Hh リガンドが膜型受容体である Patched（PTCH）と結合すると、同じく膜型受容体である Smoothened（SMO）を活性化し、その下流のシグナル伝達を引き起こし、GLI などの標的遺伝子の転写を促進する。Hh シグナル伝達経路の構成因子が急性骨髄性白血病（AML）細胞において高発現していることが報告されている。

白血病幹細胞（LSC）の維持に Hh シグナル伝達経路が関与している可能性が複数の報告で示唆されている。LSC を標的とする AML に対する治療法の開発は満足のいくものではなく、LSC を根絶するような分子標的治療の開発が望まれている。低分子化合物である PF-04449913（PF-913）は SMO を標的とする Hh 阻害剤であり、AML を含む血液悪性腫瘍患者を対象とした臨床試験において有効性と安全性がすでに示されているが、その作用メカニズムは未だ不明である。

この研究では、AML 細胞に対する Hh 阻害剤の作用機序を検証し、AML 細胞における Hh シグナル伝達経路の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

患者から採取した AML 細胞を NOD/SCID2γδ^{null}マウス（NOG マウス）に移植することにより、次世代にも継代が可能な AML マウスモデルを樹立した（Fig. 1a）。この AML マウスモデルを用いて、PF-913 による治療群と対照群とで、AML 細胞に対する PF-913 の効果を検証した。AML 細胞のキメリズムは、ヒト CD45 陽性かつマウス CD45 陰性の分画で規定した。PF-913 は骨髄内の腫瘍量を減少させる効果を示さなかったが、治療された AML 細胞を継代した次世代のマウスにおける AML 細胞の白血病構築能を抑制する効果を示した（Fig. 1b）。同様に、別患者の AML 細胞を用いた実験系でも、PF-913 が AML 細胞の白血病構築能を抑制するという結果が再現された（Fig. 1c）。PF-913 により *in vivo* で処理された AML 細胞において、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子の発現量を Gene Set Enrichment Analysis（GSEA）の手法を用いて解析したところ、がん幹細胞や細胞周期の制御に関わる遺伝子の発現に影響を与えていることが明らかとなった（Fig. 2）。

PF-913 が AML 細胞の LSC 分画に作用しているという仮説を元に、AML 患者細胞を用いた *in vitro* での実験を行った。PF-913 は、AML 細胞を Annexin-V 陽性で規定される細胞死に誘導する作用を示さなかったが（Fig. 3a）、CD34 陽性かつ CD38 陰性で示される幹細胞分画にある AML 細胞の比率を減少させ（Fig. 3b）、Hoechst-33343^{low}かつ Pyronin-Y^{low}で示される G_0 期すなわち静止期にある AML 細胞の比率を減少させた（Fig. 3c）。すなわち、PF-913 が、AML 細胞の細胞周期を変化させることで、LSC が静止期にとどまることを阻害する作用を有することが示唆された。

次に、PF-913 が正常の造血幹細胞に与える影響を明らかにするために、AML 患者細胞およびヒト臍帯血細胞を用いたコロニーアッセイを行った。PF-913 で処理しながら 1 回目のコロニーアッセイを行った後に、PF-913 で処理された AML 細胞のコロニー再形成能を評価するために、2 回目のコロニーアッセイを行った（Fig. 4a）。PF-913 は、1 回目のアッセイでコロニー形成能に影響を及ぼさなかったが、2 回目のアッセイでは AML 細胞のコロニー再形成能を阻害する作用を示した（Fig. 4b）。正常の造血幹細胞を想定して、ヒト臍帯血細胞に PF-913 を作用させるコロニーアッセイも行ったが、PF-913 はヒト臍帯血細胞のコロニー形成能には影響を及ぼさなかった（Fig. 4c）。以上より、PF-913 の AML 細胞に対する白血病構築能の抑制作用が *in vitro* の実験系でも示され、一方で、PF-913 が正常造血幹細胞の自己複製能には影響を及ぼさないことが示唆された。

最後に、AML 細胞株である MOLM-14 細胞を、Hh リガンドを分泌する間質細胞の細胞株である HS-5 細胞と共培養した実験系において、AML に対する標準的な抗がん剤であるシタラビン（Ara-C）と PF-913 との併用効果を検証した（Fig. 5a）。MOLM-14 細胞における Hh シグナル伝達経路の標的遺伝子は、HS-5 細胞との共培養により発現量が増加し、PF-913 の処理により発現量が減少したことから（Fig. 5b）、AML 細胞において、間質細胞からのパラクラインにより Hh シグナル伝達経路が維持されている可能性が示唆された。さらに、PF-913 は、単独では MOLM-14 細胞に対する殺細胞作用を示さなかったのに対して、Ara-C との併用では HS-5 細胞との共培養による MOLM-14 細胞の Ara-C に対する抵抗性を解除した（Fig. 5c）。以上により、従来の抗がん剤と PF-913 との併用療法の論理的根拠が示された。

【考察】

Hh シグナル伝達経路を阻害することにより、AML 細胞に対する直接の殺細胞効果には乏しいものの、AML 細胞の白血病構築能が抑制されることを示し、それは AML 細胞のうち静止期にある LSC の細胞周期を変化させる作用によるものであることを明らかにした。

近年、LSC は骨髄ニッチと呼ばれる微小環境に存在することでその白血病構築能が維持されていることが明らかとされている。Hh シグナル伝達経路の微小環境への関与や、Hh 阻害剤の AML 細胞そのものに対する作用だけではなく微小環境を構成する間質細胞などへの作用についてもさらなる検討が必要である。

また、従来の抗がん剤である Ara-C と Hh 阻害剤である PF-913 との併用療法の論理的根拠が示されたが、現在、AML に対する Ara-C と PF-913 との併用療法に関する臨床試験が進行中であり、Hh 阻害剤の臨床応用により AML の治療成績が改善することが期待される。

【結語】

Hh 阻害剤が AML 細胞の白血病構築能を阻害することを明らかにした。さらには、

Hh 阻害剤が静止期にある LSC に作用し、AML 細胞の微小環境における治療抵抗性を克服する可能性を示した。従来の抗がん剤と Hh 阻害剤の併用療法により、AML の治療成績を改善することが期待される。