

15 - 4 成人難治性白血病の分子生物学的特徴に基づく治療法に関する研究

主任研究者 名古屋大学大学院医学系研究科 直江 知 樹

研究成果の要旨

本研究においては、白血病の発症・進展・耐性化における分子・細胞学的な病態を解明するとともに、治療標的となりうる分子（群）および標的方法の探索・開発に関する研究を行うことを目的とした。治療標的分子としては、急性骨髄性白血病（AML）で最も変異頻度の高い FLT3 分子、t(6;12)(q21;p13)転座より同定した新規融合遺伝子産物 ETV6/FRK、白血病細胞に発現するオーファン G 蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)、白血病で高発現するテロメラゼなどで、これらを標的とした治療法の基礎研究ならびに造血器特異的腫瘍抑制遺伝子 SHIP の発現解析を行った。一方、臨床研究として日本成人白血病研究グループ（JALSG）との共同で、AML における予後因子の解析を行うとともに、フィラデルフィア（Ph）染色体陽性急性リンパ性白血病に対する、AbI キナーゼ阻害剤併用化学療法の有効性と安全性を検討した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
直江知樹	名古屋大学大学院医学系研究科 教授	白血病シグナル伝達を標的とした治療法の開発と研究の総括の研究
吉田 均	国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部 室長	造血器特異的腫瘍抑制遺伝子 SHIP の発現制御
黒川峰夫	東京大学医学部附属病院 講師	白血病の分子機構の解明と診断・治療への応用の研究
宮崎泰司	長崎大学医学部歯学部附属病院 講師	白血病予後因子におけるミエロペルオキシダーゼの意義
大西一功	浜松医科大学 助教授	造血器腫瘍におけるオーファン G 蛋白質共役型受容体の検討
大屋敷一馬	東京医科大学 教授	テロメラゼを標的とした難治性白血病の分子標的療法の開発
横澤敏也	国立病院機構名古屋医療センター 室長	imatinib 投与中の慢性骨髄性白血病における BCR-ABL の発現量の推移と薬剤耐性の発症に関する解析

総括研究報告

1 研究目的

化学療法や造血幹細胞移植の進歩によって、60 歳未満の成人急性白血病における 5 年生存率は 30% を達成したが、わが国あるいは欧米での大規模臨床研究によればこの 10 年以上、その成績は改善していない。また、増加しつつある高齢者白血病の成績は未だに不良である。一方、この 20 年間に白血病の分子病態と多様性が明らかになってきた。さらに急性前骨髄球性白血病に対するオール

トランスレチノイン酸あるいは慢性骨髄性白血病に対する AbI キナーゼ阻害剤はいずれも白血病の原因分子を標的とした治療法であり、臨床成績を飛躍的に向上させることもわかってきた。これらのことは、白血病の分子病態に基づく新しい薬剤開発が、白血病治療のブレイクスルーを生むであろうことを示唆する。本研究においては、白血病の発症・進展・耐性化における分子・細胞学的な

病態を解明するとともに、治療標的となりうる分子(群)および標的方法の探索・開発に関する前臨床研究を行うことを第一の目的とした。また日本成人白血病研究グループ(JALSG)との共同で、分子病態の臨床的意義の研究ならびに白血病の治療に関する臨床研究(とりわけ第II相試験)を推進することを第二の目的とした。

2 研究成果

1) 受容体型チロシンキナーゼ FLT3 に関する研究

ヒト急性骨髄性白血病(AML)において高頻度にドミナント型変異が認められる受容体型チロシンキナーゼ FLT3 を標的分子として、活性化メカニズム、腫瘍の発生・進展への関与機構を分子レベルで解明すると同時に、これらの機能を阻害する小化合物の探索を探索した。

FLT3 遺伝子変異により、FLT3 分子は恒常的に活性化し、その下流の MAPK、STAT5、PI3K などのシグナル伝達分子を恒常的に活性化していた。抗アポトーシス機構について解析し、変異 FLT3 により特異的に活性化される抗アポトーシス分子を検討したところ、STAT5 下流の BCL-XL が同定された。BCL-XL に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処理により変異 FLT3 発現細胞の増殖が抑制されたことから、変異 FLT3 の抗アポトーシス機構には STAT5 から BCL-XL へのシグナル伝達が重要と考えられ、これらの分子も治療上の標的候補であることが示された。

従来、FLT3 キナーゼ阻害剤の開発は活性化している変異 FLT3 キナーゼを標的として進められてきた。しかし、最近一部の白血病細胞において FLT3 遺伝子の発現亢進が確認された。そこで、AML における FLT3 遺伝子発現量の意義と阻害剤の適応の可能性について明らかにするために、181 例の AML 細胞における FLT3 遺伝子発現量を real time PCR 法を用いて定量化した。AML 細胞における FLT3 遺伝子発現量は正常細胞に比較して有意に高く、特に FLT3 遺伝子変異を有する細胞に高い傾向を認めた。また、FLT3 遺伝子変異を持たない AML 細胞においても、FLT3 遺伝子を強発現する症例が存在し、その産物は恒常的に活性化を示すと同時に、FLT3 阻害剤への感受性を示すことを確認し、FLT3 遺伝子の高発現は FLT3 遺伝子異常を伴わない AML 例における予後不良因子であることを明らかにした。したがって、FLT3 阻害剤の適応疾患は必ずしも FLT3 遺伝子変異を伴う症例に限られるものではなく、FLT3 遺伝子の高発現例や FLT3 分子の活性化を示す症例にも拡大可能であることを示した。

活性化型 FLT3 を有する細胞株を用いて、FLT3 阻害剤のハイスクリーンングを行い、複数の阻害剤

を得ることができた。これらの化合物について、構造としての新規性、キナーゼ阻害剤としてのスペクトラム、点突然変異 FLT3 に対する感受性、AGP 結合性によって、数種の化合物に限定して、マウス FLT3 白血病モデルでの有効性・毒性試験を行い、これらの化合物がこれまで発表された阻害剤よりも有望であることが示された。

2) 白血病に認められた t(6;12)(q21;p13)転座が形成する ETV6/FRK 融合蛋白の機能解析

ETV6/FRK は t(6;12)(q21;p13)転座を有する急性白血病細胞から我々が同定した ETV6 と FRK との新規融合遺伝子である。これは、Src ファミリーのチロシンキナーゼをコードする FRK がヒト悪性腫瘍で構造変化を受ける異常として初めての報告例であるが、今回、融合蛋白 ETV6/FRK の機能解析を行った。ETV6/FRK においては、ETV6 の PNT ドメイン、FRK の SH2 ドメインの一部、キナーゼドメインが in-frame に融合している。まず、ETV6/FRK のキナーゼ活性の異常について検討した。HeLa 細胞で強制発現させた蛋白を用いて、in vitro kinase assay、4G10 Blot 法により、チロシンリン酸化の程度を調べたところ、wild type の FRK に比べ、ETV6/FRK は極めて強い自己リン酸化を受けていた。さらに、外来基質として Histone H2B、H4 を加えて in vitro kinase assay を行ったところ、ETV6/FRK は wild type の FRK に比べ両者をより強くリン酸化した。ETV6/FRK は、NIH3T3 細胞のコロニー形成能を促進するとともに、Ba/F3 細胞の IL-3 非依存的な増殖を支持した。これに対し、ATP 結合部位の Lysine を Arginine に置換し、キナーゼ活性を欠如した ETV6/FRK(K262R) 変異体では、NIH3T3 細胞のコロニー形成の促進、および、Ba/F3 細胞における IL-3 非依存性増殖を認めなかった。これらのことから、ETV6/FRK による形質転換にはキナーゼ活性が必須であることが示された。一方、ETV6/FRK が ETV6 の転写抑制能に及ぼす影響について、HeLa 細胞を用いて EBS(Ets binding site)を含むプロモーターをレポーターとするルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、ETV6/FRK は容量依存性に ETV6 の EBS プロモーターに対する転写抑制能を阻害することが示された。以上より、ETV6/FRK は、(1)チロシンキナーゼ活性の異常、(2)癌抑制機能を有するとされている ETV6 の機能の dominant negative な制御、という dual なメカニズムから白血病発症に関わっている可能性が示唆された。

3) 造血器特異的腫瘍抑制遺伝子 SHIP の発現制御

SHIP は各種サイトカインによる PI3K/AKT シグナル伝達経路の制御に関わり一部の白血病において機能欠失変

異が認められ、腫瘍抑制遺伝子として位置付けられる。抗癌剤感受性にも関与する SHIP は白血病治療の分子標的として有望であり、その発現制御機構を解析した。

まず 5' RACE 法により転写開始点の同定を行った。Gene Specific Primer で RT-PCR/TA-cloning の後 5' 末の塩基配列を決定した。2 箇所の転写開始領域があり、各々複数の転写開始点があった。これは骨髄系細胞の分化抗原遺伝子に比較的好くみられる特徴であった。

次に内在性 SHIP を発現している U937 細胞で遺伝子発現に必要なシスエレメントを調べたところ近位 promoter の転写開始点上流 250bp 以内に強い活性がみられた。非造血細胞においては活性がまったくみられず、組織特異的なシスエレメントであることが分かった。Promoter 領域の 5' deletion と Linker Scanning によって、主要な下流転写開始点に対して -60/-50 および -10/+0 の 2 箇所に特異的なシスエレメントを同定した。塩基配列上 ets family 転写因子である PU.1 のコンセンサス配列が認められたため、それぞれ EMSA を行い Competition と Supershift によって結合の特異性を確認した。U937 におけるレポーターアッセイでは、2 箇所の変異導入によってプロモーター活性が全く失われた。

白血病細胞パネルを用いた PU.1 と SHIP の発現プロファイルには強い相関があった。特に内在性 PU.1 の発現のない HL-60 亜株は野生型 HL-60 に比べて SHIP 発現量は著明に低下していた一方、外来性 PU.1 の強制発現により SHIP 発現の回復が認められた。さらに U937 に dominant-negative PU.1 を強制発現させると、内在性 SHIP の発現は著明に低下した。以上のことから、SHIP の発現制御には PU.1 が重要であることが示された。PU.1 は白血病において変異あるいは量的な減少が認められる例があり発症と同時に SHIP 発現低下を介した Akt 経路の活性化とそれに引き続く抗がん剤耐性に関与する可能性がある。

4) オーフアン G 蛋白質共役型受容体の検討

細胞情報伝達機構において、G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor; GPCR) は、ホルモン等の多くの生理活性物質の細胞内情報伝達に関与しており、多くの医薬品も GPCR を標的とし、その対象疾患も多岐にわたっている。GPCR は細胞膜を 7 回繰り返して貫通する、特徴的な疎水性アミノ酸クラスターという共通構造を持つため、ゲノム DNA 等の配列解析から直接 GPCR 遺伝子を見つけ出す事が可能である。また、これらの多くはリガンドが不明なオーフアン GPCR であり、その細胞情報伝達における役割も不明である。従って、オーフアン GPCR

の研究は様々な生理現象の調節機構の解明に重要であると考えられる。

我々はゲノム情報に基づき、ヒト第 3 番染色体短腕 (3p21.3) にクラスターを形成し、GPCR に属している CC-ケモカインレセプター (CCR1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, CCBP2, CCRL2) に注目した。その中で、CCBP2 (chemokine (C-C motif) binding protein 2) 及び CCRL2 (chemokine (C-C motif) receptor-like 2) についてのリガンドは不明であり、その機能についてもよく解明されていない。本研究では造血器腫瘍におけるオーフアン GPCR である CCBP2 と CCRL2 の細胞情報伝達における役割を検討した。これまでの研究経過において、CCBP2 及び CCRL2 遺伝子のクローニングを行い、ヒト腎芽細胞株 293 細胞と白血病細胞株 K562、U937、CEM 細胞へ遺伝子導入を行った。遺伝子導入のみにおいて各種遺伝子導入細胞には細胞毒性や形態学的変化は認められなかった。CCBP2 及び CCRL2 遺伝子について、プラスミド内に siRNA を組み込んだベクターを作製し、K562、U937、CEM 細胞に遺伝子導入を行い、各々の遺伝子発現を抑制した結果、細胞情報伝達分子の ERK1/2 及び MEK1/2 蛋白の脱リン酸化が認められ、CCBP2 と CCRL2 が白血病において ERK1/2、MEK1/2 を介する signal pathway の存在が予想された。

以上のことから、CCBP2 と CCRL2 は新たな分子標的治療薬につながる可能性があると考えられる。今後、CCBP2 或いは CCRL2 からのシグナル伝達経路を明らかにし、内因性のものを含めたりガンド探索も同時におこなっていく予定である。

5) テロメラーゼを標的とした治療法の開発

テロメラーゼはほとんどの正常体細胞では活性が極めて低く、多くの造血器腫瘍で活性が報告されている。従って、テロメラーゼは造血器腫瘍を含めた悪性腫瘍に対する治療を行う上で標的分子の可能性がある。Telomestatin はテロメラーゼ阻害活性を有する放線菌 *Streptomyces anulatus* が産生する天然活性物質であるが、培養細胞株や新鮮白血病細胞に対して、アポトーシス誘導細胞の増加とテロメア長の短縮を起こした。U937 細胞株のヌードマウス移植モデルに対して、telomestatin 15mg/kg、週 2 回腹腔内投与にて投与後、day15 にて抗腫瘍効果が認められた。Primary leukemia cell を用いた場合、サブテロメア領域を含めた TRF がわずかに 10 日間で 7 kb も短縮することから telomestatin によるテロメア短縮にはただ単にテロメラーゼ阻害効果以外にサブテロメア切断によるテロメア短縮機構が関与していることが推察された。これまでテロメラーゼ活性

の阻害後、腫瘍細胞が最終的にテロメア機能を失うまでには長い期間がかかることが予想され、またテロメラーゼに依存しないテロメアの維持機構の存在が証明されているため、テロメラーゼを阻害しても完全に癌細胞がテロメア機能を失うかは不明であった。しかし、telomestatin は即効性を有するテロメラーゼ阻害剤として期待できることが明らかとなった。

6) AMLにおける予後因子の解析

JALSG AML87,89,92 プロトコールに登録された症例で病型中央診断がなされ、MPO 陽性率が確定し、さらに FLT3 ITD の有無が判明している症例を用いて両者の予後因子としての関連を検討した。さらに、染色体群も確定している症例を対象に生存率を用いた予後因子多変量解析を行った。いずれの解析も全生存率をエンドポイントとして解析した。AML87,89,92 プロトコール登録症例のうち 170 例で FLT3 ITD の有無について検討されており、これらの症例に対して ITD(+)症例と ITD(-)症例での生存曲線を図 1 に示す。Log-Rank test にて $p=0.041$ で有意差を持って FLT3 ITD(-)例の予後が勝っていた。白血病芽球の 50% 以上で MPO 陽性の例を MPO 陽性高率群 (MPO-high) とした。50% 未満の低率群 (MPO-low) と生存率を比較した。両者には Log-Rank test にて $p=0.002$ で有意差がみられ、高率群が有意に予後良好であった。FLT3 ITD の有無と MPO によるグループの、予後に対する関係を検討するためにその両者が調べられている 158 例を用いて解析を行った。この解析では ITD(-)/MPO-high のみが生存率がよく、他のグループはいずれも低下した。ITD(+)/MPO-high の症例は、ITD(-)/MPO-high より明らかに生存率は悪く、ITD の影響があると考えられた。MPO-low のグループでは ITD の有無によって生存期間に相違は認められなかった予後因子としての独立性を検討するために、上記症例の中から (1) 染色体核型による予後群、(2) FLT3 ITD、(3) MPO の全てが調べられている 69 例を対象に多変量解析を行った。その結果、MPO と FLT3 ITD を用いたグループ、染色体群、初診時 PS が独立した因子として挙がってきた。

7) Ph 陽性 ALL に対するイマチニブ併用試験

フィラデルフィア染色体 (Ph) 陽性急性リンパ性白血病 (ALL) は、成人 ALL の 30% を占め、極めて強い予後不良因子となることが知られている。完全寛解率は 50-80% に得られるが、寛解持続期間は短く、第一寛解期に同種移植を行った症例でのみ、長期生存が得られている。Abi 阻害剤イマチニブの未治療 Ph 陽性 ALL に対する化学療法との併用報告はまだ少なく、その安全性・有効

性を調べる目的で ALL202 研究を JALSG 施設にて行った。患者は未治療成人 ALL で、登録後 Multiplex real-time PCR にて、キメラ遺伝子のスクリーニングを行い、BCR-ABL 陽性であれば、化学療法にイマチニブを併用した。2003 年 8 月までに登録された 24 例での観察期間中央値は 5.5 ヶ月であった。24 例中 23 例が 1 コースの寛解導入療法で寛解となり、寛解率は 96% に達した。これは先だって発表された ALL93 試験の 51% を大きく上回っている。寛解となった 23 例のうち再発が 2 例に認められた。寛解導入が成功しなかった 1 例は治療開始 10 日目に肺出血が原因で死亡した。寛解導入療法開始 28 日目、63 日目の時点においてそれぞれ 18 例、20 例の骨髓検体を用いて BCR-ABL 遺伝子の定量が行われたが、BCR-ABL が検出されない分子学的寛解が 5 例 (28%)、10 例 (50%) に認められた。観察期間中に 18 例 (78%) もの症例において分子学的寛解が得られた。観察期間中 9 例に同種造血幹細胞移植 (HSCT) が施行され、うち 8 例は第一寛解期に移植が行われた。化学療法とイマチニブの併用による寛解導入療法中の重篤な副作用は化学療法単独の治療とほとんど変わりなかった。

3 倫理面への配慮

臨床試験計画は、すべて倫理的、科学のおよび医学的妥当性の観点から、参加施設それぞれの IRB によって審査され、その承認を得ることを条件とした。臨床検体を用いた研究については、インフォームドコンセントを得たうえで連結可能匿名化を行い、特に遺伝子解析研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得て行った。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Yanada, M., Naoe, T., et al., Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*, 74:418-23, 2005.
2. Yanada, M., Matsuo, K., Emi, N., Naoe, T., Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission. *Cancer*, 103:1652-1658, 2005.
3. Naoe, T., Kiyoi, H., Normal and oncogenic FLT3. *Cell Mol Life Sci*, 61:2932-8, 2004.

4. Towatari, M., Naoe, T., et al., Combination of intensive chemotherapy and imatinib can rapidly induce high-quality complete remission for a majority of patients with newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 104:3507-12, 2004.
5. Sahara, N., Naoe, T., et al., Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia and As203-resistant APL cell lines than As203 by activating the mitochondrial pathway. *Leuk Lymphoma*, 45:987-95, 2004.
6. Yanada, M., Naoe, T., et al., Multiplex real-time RT-PCR for prospective evaluation of WT1 and fusion gene transcripts in newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 45:1803-8, 2004.
7. Ninomiya, M., Naoe, T., et al., Retinoic acid syndrome in NOD/scid mice induced by injecting an acute promyelocytic leukemia cell line. *Leukemia*, 18:442-8, 2004.
8. Ozeki, K., Naoe, T., et al., Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*, 103:1901-8, 2004.
9. Shigeno, K., Yoshida, H., et al., Disease-related potential of mutations in transcriptional cofactors CREB-binding protein and p300 in leukemias. *Cancer Lett*, 213:11-20, 2004.
10. Kawazu, M., Kurokawa, M., et al., Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. *American Journal of Hematology*. 72: 27-30, 2003.
11. Waga, K., Kurokawa, M., et al., Leukemia-related transcription factor TEL accelerates differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Oncogene*. 22:59-68, 2003.
12. Maruyama, H., Miyazaki, Y., et al., Post-secretion neutralization of transgene-derived effect: soluble erythropoietin receptor/IgG1Fc expressed in liver neutralizes erythropoietin produced in muscle. *The Journal of Gene Medicine*. 6:228-237, 2004.
13. Izutsu, K., Miyazaki, Y., et al., Unrelated bone marrow transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a study from the Japan Marrow Donor Program. *Blood*. 103: 1955-1960, 2004.
14. Nakamura, S., Ohnishi, K., et al., COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells *in vitro* and growth inhibition of leukemia cells *in vivo*. *Cancer Therapy*. 2:153-166, 2004.
15. Nakamura, S., Ohnishi, K., et al., Development of Packaging Cell Lines for Generation of Adeno-Associated Virus Vectors by Lentiviral Gene Transfer of Trans-Complementary Components. *European Journal of Haematology*. 73: 1-11, 2004.
16. Sumi, M., Ohyashiki, K., et al., A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia.
17. Tauchi, T., Ohyashiki, K., Imatinib mesylate in combination with other chemotherapeutic agents for chronic myelogenous leukemia. *Int.J.Hematol*. 79:434-440, 2004.
18. Morishima, Y., Yokozawa, T., et al., Efficacy and safety of Imatinib Mesylate for patients in the first chronic phase of chronic myeloid leukemia; Results of Japanese Phase II clinical study. *Int.J.Hematol*. 80:261-266, 2004.