

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・耐性化に関わる分子・細胞学的な病態を明らかにし、新たな治療標的分子と標的方法の基礎研究ならびに、治療階層化・予後予測に役立つ診断や新たな治療法の臨床開発を行うことを目的とした。今年度は昨年度に引き続き、変異受容体型チロシンキナーゼ FLT3、G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor; GPCR)、白血病関連転写因子 Evi-1、AML で高頻度に変異を認める NPM1、PML-RARA、BCR-ABL の生物学的意義を明らかにし、キナーゼ阻害剤イマチニブおよびダサチニブ、FLT3 キナーゼ阻害剤の基礎的検討を行った。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、イマチニブ併用化学療法の有効性と安全性に関する第二相試験を報告した。

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総括
吉田 均	国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部 室長	PML の骨髄系分化における機能と PML-RARA による APL 発症機序
黒川峰夫	*1 東京大学医学部附属病院 講師 *2 東京大学医学部附属病院 教授	白血病の分子機構の解明と診断・治療への応用
宮崎泰司	長崎大学医学部・歯学部附属病院 講師	急性骨髄性白血病におけるミトコンドリアシグナル発現の意義
大西一功	*3 浜松医科大学 助教授 *4 浜松医科大学 教授	白血病における G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の機能解析及び新規抗腫瘍薬の開発に関する基礎的研究
大屋敷一馬	東京医科大学 教授	テロメラゼを中心とした難治性白血病の分子標的治療法の開発
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

*1：平成17年4月1日～平成17年6月30日

*2：平成17年7月1日～平成18年3月31日

*3：平成17年4月1日～平成17年11月30日

*4：平成17年12月1日～平成18年3月31日

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。この一年間に限っても、急性骨髄性白血病(AML)におけるNPM1変異、骨髄増殖性疾患におけるJAK2変異が新たに見出され、白血病の分子パラダイムの広がりが続いている。一方、これまでに成功した分子標的治療(オールトランスレチノイン酸、Ab1キナーゼ阻害剤イマチニブ)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・細胞学のおよび標的方法の探索・開発に関する基礎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、臨床的意義の高い診断法ならびに白血病の成績向上に繋がりうる新しい治療法に関する臨床研究(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 研究方法と成果

1) 活性型受容体型チロシンキナーゼFLT3は、AMLのよい標的分子と考えられ、現在各国でその阻害剤が開発されている。FLT3阻害剤を評価し、そのProof-of-Conceptを証明するため、阻害効果を分子レベルでモニターすることが必要である。リン酸化FLT3が最も直接的なマーカーであるが、ヒト臨床検体で、リン酸化FLT3を同定することは、感度・精度・採取量の観点から、困難である。直江らは変異FLT3では下流シグナルであるSTAT5がリン酸化し、これは野生型FLT3では認められないことを見出しており、そのメカニズムに関して研究を進めた。変異FLT3はSrcファミリーキナーゼをリクルートすることにより、STAT5をリン酸化すること、抗リン酸化STAT5モノクロナル抗体を作成し、STAT5のリン酸化レベル低下が、FLT3阻害剤の増殖抑制・アポトーシス誘導のサロゲートマーカーになることを見出した。

2) 2005年、イタリアのグループはAMLにおいて高率にNPM1エクソン12の挿入型変異が見出されることを報告した。直江らは、これまでJALSGに登録され治療された257例のAMLに関してNPM1変異を解析し、この変異はM3以外の様々な病型に認められるとともに正常核形に高率に認められ(47%)、FLT3変異、高いCR率と関連することを報告した。NPM1変異は再発リスクを増大させることや、再発時には一部であるが消失する例も含まれることから、白血病における意義についてはさらなる研究が必要であると考えられた。

3) PMLは急性前骨髄球性白血病(APL)におけるt(15;17)における再構成遺伝子であるが、その産物の機能は未だに不明である。吉田らはPMLの骨髄系分化における機能について解析を進め、PMLはアイソフォーム特異的に骨髄系マスター遺伝子PU.1と複合体を形成し、好中球分化に協調的に働くこと、またt(15;17)の結果生ずるPML-RARAキメラ産物はPU.1転写因子複合体に対し、ドミナントネガティブにその機能を抑制することを報告した。

4) 黒川らは、白血病において高発現し、また染色体転座の再構成遺伝子でもあるEvi1の造腫瘍性を解析するため、同じEvi-1遺伝子から生ずる二つのアイソフォーム、Evi-1aとEvi-1cの違いに着目した。前者はホモ多量体を形成し、転写の抑制に関わるコリプレッサーCtBPと結合してTGF- β シグナルの抑制も引き起こした。しかしEvi-1cは多量体を形成せず、これらの機能を有さなかった。従ってEvi-1の造腫瘍性はそのホモ多量体化と関係すると考えられた。

5) 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。

大西らはGPCRのなかでヌクレオチドをリガンドに持つP2Yのなかで、特にピリミジンヌクレオチドをリガンドとするP2Y14(GRP105)に注目した。GPR105は造血幹細胞において発現し、また白血病細胞にも発現していた。白血病細胞株を用いたsiRNAによるノックダウン実験では、コロニー形成能の抑制、細胞周期停止、CDKIの誘導が認められ、GPR105は白血病細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。GPR105は治療標的となりうるかもしれない。

6) イマチニブの次世代AB1キナーゼ阻害剤とされるダサチニブは、SrcファミリーキナーゼとAb1キナーゼを

特的にかつ低濃度で抑制する。大屋敷らは、Bcr-Abl 陽性白血病細胞株 K562 を用い、ダサチニブとイマチニブあるいは抗がん剤との併用を行い、その細胞抑制効果を解析した。イマチニブとの併用によっても、相加効果が得られることから、これらの作用機序には共通しながらも、異なるメカニズムがあると考えられた。両者の治療効果の違いを解析するため、ダサチニブ処理とイマチニブ処理白血病細胞株の遺伝子発現アレイ解析を行った。多くの遺伝子は共通して変動したが、CDK2、CDK8 はダサチニブ処理によってのみ大きな発現低下が認められた。これは蛋白発現でも確認された。これは、Src ファミリーを抑制したことに起因するかもしれない。

7) AML の予後因子として、年齢や染色体異常が広く認められているが、JALSG を中心とした研究結果から FLT3 変異、あるいはミエロペルオキシダーゼ (MPO) 発現率が予後不良因子であることが明らかになっている。宮崎らは、AML97 研究での染色体リスク、FLT3-ITD、MPO 陽性率の予後に及ぼす影響について、解析を行った。染色体リスク別、および FLT3-ITD の有無によって、AML の成人率は大きく影響された。MPO 陽性率による予後の差は、これまでの研究に比して小さかった ($P=0.021$)。染色体中間群に含まれる染色体正常核形群では、FLT3-ITD の有無によって生存率は明瞭に二分化され、今後の治療法の層別化を考える際、大きな指標になると考えられた。

8) イマチニブは慢性骨髄性白血病 (CML) の第一選択薬として定着したが、長期投与例あるいは低反応例から Abl キナーゼ領域における遺伝子変異が検出されている。横澤らは、イマチニブ投与後 6 ヶ月から 18 ヶ月の間に BCR-ABL の発現量が 1000 コピー/ μ グラムを超えた 33 例について、ALB キナーゼ領域の遺伝子を D-HPLC 法にて解析し、その 3 例にそれぞれ、H396R、A399G、T315I の変異を認めた。変異検出時期はイマチニブ投与後 7-16 ヶ月であった。

9) 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。Abl 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。

2002 年 9 月から 2005 年 1 月までに 80 人名の Ph+ALL が登録され、完全寛解 (CR) 率 96.2% が得られた。寛解に入らなかった 3 名の内、治療抵抗例 1 例、早期死亡 2 例であった。再発は 20 例に認められ、CR 期間中央値 5.2 ヶ月であった。1 年での無イベント生存率ならびに全生存率はそれぞれ 60.0%、76.1% であった。これは過去に行った化学療法のみでの ALL93 研究での成績に比べると、寛解率・生存率ともに有意な改善である。

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: Karnan, S., Naoe, T., et al., Genomewide array-based comparative genomic hybridization analysis of acute promyelocytic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, 45:420-5, 2006.
- 2: Yanada, M., Naoe, T., et al., High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. **J Clin Oncol**, 24:460-6, 2006.
- 3: Suzuki, T., Naoe, T., et al., Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, 106:2854-61, 2005.
- 4: Yanada, M., Naoe, T., et al., Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. **Leukemia**, 19:1345-9, 2005.
- 5: Iwai, M., Naoe, T., et al., Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, 19:1367-75, 2005.

- 6: Nitta, E., Kurokawa, M., et al., Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. **Oncogene**, 24:6165-6173, 2005.
- 7: Komeno, Y., Kurokawa, M., et al., Identification of Ki23819, a highly potent inhibitor of kinase activity of mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. **Leukemia**, 19:930-935, 2005.
- 8: Hosoya, N., Kurokawa, M., et al., Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. **Genes Chromosome and Cancer**, 42:269-79, 2005.
- 9: Nannya, Y., Kurokawa, M., et al., A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. **Cancer Research**, 65:6071-6079, 2005.
- 10: Lee, SY., Kurokawa, M., et al., Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. **Leukemia**, 19:1841-1843, 2005.
- 11: Fukushima, T., Miyazaki, Y., et al., Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. **Leukemia**, 19:829-34, 2005.
- 12: Matsuda, A., Miyazaki, Y., et al., Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. **Blood**, 106:2633-40, 2005.
- 13: Hasford, J., Ohnishi, K., et al., The impact of the combination of baseline risk group and cytogenetic response on the survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. **Haematologica**, 90:335-40, 2005.
- 14: Kobayashi, M., Ohnishi, K., et al., Etodolac inhibits EBV expression and induces Bcl-2-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. **Eur J Haematol**, 75:212-20, 2005.
- 15: Nakamura, S., Ohnishi, K., et al., Etodolac induces apoptosis and inhibits cell adhesion to bone marrow stromal cells in human myeloma cells. **Leuk Res**, 19:1306-11, 2005.
- 16: Shigeno, K., Ohnishi, K., et al., Arsenic trioxide therapy in relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukemia: updated outcomes of the phase II study and postremission therapies. **Int J Hematol**, 82:224-9, 2005.
- 17: Shinjo, K., Ohnishi, K., et al., Delayed recovery of normal hematopoiesis in arsenic trioxide treatment of acute promyelocytic leukemia: a comparison to all-trans retinoic acid treatment. **Internal Med**, 44:818-24, 2005.
- 18: Ohyashiki, K., Aota, Y., et al., The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. **Leukemia**, 19:2359-2360, 2005.
- 19: Sashida, G., Ohyashiki, K., et al., Marked telomere fluctuation of leukocytes during graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. **Int J Mol Med**, 16:883-888, 2005.
- 20: Ito, Y., Ohyashiki, K., et al., Assessment of the international prognostic scoring system for determining chemotherapeutic indications in myelodysplastic syndrome: Japanese retrospective multicenter study. **Int J Hematol**, 82:236-242, 2005.
- 21: Hsiao, HH., Ohyashiki, K., et al., De novo appearance of der(1;7)(q10;p10) is associated with leukemic transformation and unfavorable prognosis in essential thrombocythemia. **Leuk Res**, 29:1247-1252, 2005.
- 22: Iguchi, T., Ohyashiki, K., et al., Combined treatment of leukemia cells with vitamin K2 and alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 enhances monocytic differentiation along with becoming resistant to apoptosis by induction of cytoplasmic p21CIP1. **Int J Oncol**, 27:893-900, 2005.
- 23: Shimada, K., Yokozawa, T., et al., Solid tumors after hematopoietic stem cell transplantation in Japan: incidence, risk factors and prognosis. **Bone Marrow Transplant**, 36:115-21, 2005.