3版

様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 6 月 12 日現在

機関番号：１２６０２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１９６０１
研究課題名（和文）MLL再構成陽性急性リンパ性白血病の病態解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Understanding of MLL-related leukemogenesis and identification of new therapeutic targets

研究代表者
青木　由貴（Aoki, Yuki）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：９０７０６８３９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：乳児期発症のMLL再構成陽性の急性リンパ性白血病(ALL)は予後不良の疾患であり、新規治療法の確立が望まれる。ヒト細胞が移植可能なNSG免疫不全マウスへの白血病移植モデルを用いてin vivoでの薬剤投与による治療法の開発を行った。ALL由来細胞（HAL-01）NSG マウスに移植し、DNA損傷を誘導するアントラサイクリン系抗がん剤ドキソルビシンを治療量投与すると、NSGマウスはPrkdcが欠損し非相同組み換え末端結合(NHEJ)が障害されているため毒性によりすぐに死亡した。そこで薬剤輸送ポンプ(p-gp)阻害剤であるシクロスポリンを併用したところ、白血病移植マウスの生存率が延長した。

研究成果の概要（英文）：MLL-rearranged infantile acute lymphocytic leukemia (ALL) is a disease with poor prognosis and establishment of a novel treatment method is desired. We developed a treatment method by drug administration in vivo using a leukemia transplantation model for NSG immunodeficient mouse into which human cells can be transplanted. ALL-derived cell (HAL-01) when transplanted into NSG mouse and treated dose of anthracycline anticancer drug doxorubicin which induces DNA damage, NSG mouse is deficient in Prkdc and disrupted non-homologous end joining (NHEJ), because of its toxicity, he died soon. When cyclosporin, a drug transport pump (p-gp) inhibitor, was used in combination, the survival rate of leukemia transplanted mice was prolonged.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：NSGマウス　異種移植　MLL　ALL　DNA修復機構

1．研究開始当初の背景

生後1歳未満で発症する急性リンパ性白血病（乳児白血病）は小児期の急性リンパ性白血病(ALL)の約 5%を占め、本邦での年間新規発症数は 20～30 例である。乳児白血病では約 80%において染色体 11q23 領域上の *MLL* に再構成を認める。現在、小児期の ALL の長期生存率が 90%近くまで向上している中、*MLL* 再構成陽性乳児白血病は造血幹細胞移植などによる強力な治療にも関わらずその生存率は 50%に満たないのが現状であり、新規治療薬の開発が強く望まれている。その分子生物学的な白血病発症機構に関しては不明な点も多く、*MLL* 遺伝子異常に伴う白血病特異的な分子を標的とした治療法については開発が途上である。白血病の薬剤感受性はこれまで多くは in vitro の実験系で行われてきた。しかし次のステップとして in vivo での解析が望まれていたが、白血病細胞を移植できるモデル系が少なかったことにより、これまで in vivo での十分な解析が行えて来なかった。Prkdc 欠損による重度免疫不全 SCID マウスと IL2 受容体γ鎖の欠損を併せ持つ NSG マウスは白血病細胞の移植に適したモデルであり、in vivo による薬剤開発を加速させることが予測される。

本研究では *MLL* 遺伝子再構性を伴う小児急性リンパ性白血病に特異的に作用する化合物をスクリーニングし、*in vitro* での評価後、免疫不全マウスへ白血病細胞を移植し、*in vivo* においてその効果を検証する。

2．研究の目的

In vivo でのヒト白血病幹細胞マウス（NSG）モデルを用いた薬物投与評価までのアッセイ系を確立するため、まず既知の抗ガン剤（アントラサイクリン系、アルキル化剤、DNA 修復阻害剤）の投与を行い、安全性及び抗腫瘍効果を比較検討する。

3．研究の方法

免疫不全マウスへのヒト白血病幹細胞移植モデル（*Yuki Aoki et al, (2015)Blood;Feb 5;125(6):967-80*①）を用いて、in vivo での薬剤投与系を確立する。

6 週齢の NSG マウスに白血病細胞株である HAL01 を前処置なしに 10000 細胞尾静脈より、移植し翌日より抗腫瘍薬の投与を行った。

(1) NSG マウスへアントラサイクリン系薬剤の投与

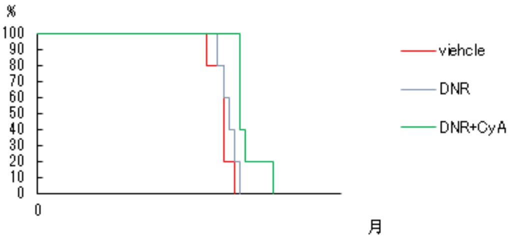
(2) NSG マウスへ塩基除去修復を利用するアルキル化剤や相同組み換え修復に関連する薬剤（PARP 阻害剤）の投与

4．研究成果

急性リンパ性白血病由来細胞（HAL-01）NSG マウスに移植し、アントラサイクリン系抗がん剤であるドキソルビシンを投与したところ、NSG マウスは Prkdc が欠損し非相同組み換え末端結合(NHEJ)が障害されているため、治療必要量のドキソルビシンに伴う毒性によりすぐに死亡することが明らかになった。そこで低用量のドキソルビシンでの治療を試みたが、生存に有意な条件は得られなかった。そこで個体死を起こさないで白血病細胞に細胞死を特異的に誘導する方法を模索する必要性が生じた。

第一に薬剤輸送ポンプ(p-gp)阻害剤であるシクロスポリンを併用した治療を試みたところ、白血病移植マウスの生存率が延長することが明らかとなった（図 1）。

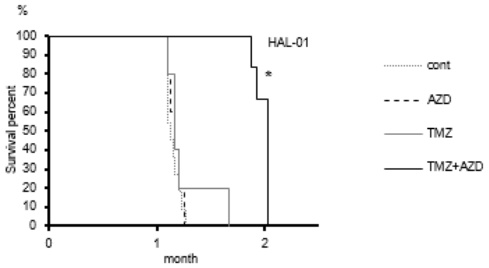
図 1



このように、NSG マウスの弱点となる DNA 損傷を誘導する薬剤によるマウス治療モデルにおいて、その弱点をカバーする薬剤の組み合わせを見出した。

次に、その他の DNA 損傷修復経路である、塩基除去修復の阻害剤である PARP 阻害剤の投与を NSG マウスで行った。PARP 阻害剤により修復されなかった DNA 一本鎖損傷は DNA 複製に伴い DNA 2 重鎖切断に移行する。細胞周期 S 期から G2/M 期では DNA 損傷修復は主に相同組み換え修復によって行われるため、NSG マウスは PARP 阻害剤に高感受性を示さなかった。NSG マウスは塩基除去修復を利用するアルキル化剤や相同組み換え修復に関連する薬剤のスクリーニングには有用であることが明らかとなった。そこでアルキル化剤であるテモゾロミド単独での効果を見たが、テモゾロミド単剤では生存率の延長はみられなかった、また PARP 阻害剤オラパリブ単独でも生存率の延長みられなかった。興味深いことにアルキル化剤であるテモゾロミドおよび PARP 阻害剤オラパリブの併用療法はマウスに致死性を誘導することなく、生存率の延長に寄与することができた（図 2）。

図 2



MLL遺伝子再構成陽性乳児白血病はFLT3の高発現を認めるなど、通常の小児期の急性リンパ性白血病と異なる遺伝子発現パターンであることが示された（Armstrong S. Nature Genetics 2002)。SNPアレイによる解析では、MLL遺伝子再構成陽性乳児白血病はDNAコピー数の増減や二次的な遺伝子変異が他の白血病と比較して著しく少ないことが見いだされ、(Bardini M. Leukemia 2010, Leukemia 2011)、乳児白血病ではMLL遺伝子再構成それ自体が白血病化に大きく関与していることが示唆された。実際に、MLL遺伝子再構成陽性乳児白血病では特定のプロモーター領域で過剰なメチル化が起きていることが明らかになっており(Stumpel D. Blood 2009)、最近の研究により、MLL遺伝子再構成によりヒストンメチルトランスフェラーゼであるDOT1LやBETファミリーメンバーであるBRD4などが誘導されることにより、下流のHOX遺伝子群の転写が促進され、白血病化につながることなどが明らかにされた（Bernt KM. Cancer Cell 2011, Dawson MA. Nature 2011)。このように、MLL遺伝子再構成陽性の白血病においてはエピゲノムの異常が大きく関与していることが明らかになりつつある。エピゲノムを標的とした治療薬がMLL遺伝子再構成陽性乳児白血病に有用な可能性が示唆されれ、これら分子を中心として、今後はNSGマウスを用いて、MLL再構成陽性白血病に細胞死を誘導する新規化合物の標的分子の探索も行っていく予定である。

＜引用文献＞

①Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Kuroki Y, Hijikata A, Takagi M, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kaneko A, Ono R, Sato K, Suzuki N, Fujiki S, Koh K, Ishii E, Shultz LD, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F.Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia.Blood.2015;Feb 5;125(6):967-80

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計（６）件

①Takagi M, Ishiwata Y, Aoki Y, Miyamoto S, Hoshino A, Matsumoto K, Nishimura A, Tanaka M, Yanagimachi M, Mitsuiki N, Imai K, Kanegane H, Kajiwara M, Takikawa K, Mae T, Tomita O, Fujimura J, Yasuhara M, Tomizawa D, Mizutani S, Morio T.
HLA haploidentical hematopoietic cell transplantation using clofarabine and busulfan for refractory pediatric hematological malignancy. Int J Hematol. 査読あり.105. 2017.686-691
DOI：10.1007/s12185-017-2187-3

②青木 由貴、小川 千登世、再発・難治ALLに対するキメラ抗原受容体発現T細胞（CAR-T）療法の有効性、血液内科、査読なし、72、2016、452-456

③Aoki Y, Miyawaki R, Imai K, Takagi M, Kajiwara M, Ishiwata Y, Yasuhara M, Morio T, Mizutani S, Tomizawa D. Haploidentical Bone Marrow Transplantation With Clofarabine and Busulfan Conditioning for a Child With Multiple Recurrent Acute Lymphoblastic Leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 査読あり. 38. 2016. e39-41
DOI: 10.1097/MPH.0000000000000454

④青木 由貴、高木　正稔、小野　林太郎、水谷　修紀、石川　文彦、MLL転座型ヒト急性リンパ性白血病におけるleukemia initiating cellsの同定、血液内科、査読なし、72、2016、231-235

⑤小野 林太郎、青木 由貴、水谷 修紀、石川 文彦、ヒト化マウスシステムを用いた、成人および乳児白血病の病態解明、日本小児血液・がん学会雑誌、査読なし、52巻、2016、376-380

⑥青木　由貴、Introduce my article、臨床血液、査読なし、56巻、2015、225

〔学会発表〕　計（４）件

①青木 由貴. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会（学術賞受賞招待講演）. 2016年12月17日. 新高輪プリンスホテル（東京都港区）

②青木 由貴、荒川 歩、熊本 忠史、小川千登世. 小児再発・難治リンパ系腫瘍に対するボルテゾミブを含む多剤併用療法の後方視的調査. 第78回日本血液学会学術集会. 2016年10月14日. パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

③青木 由貴、Xenograftを用いたMLL白血病の病態理解. 第13回先端血液セミナー（招待講演)、2015年６月２７日、帝国ホテル東京（東京都千代田区）

④青木 由貴、Xenograftを用いた乳児期発症のMLL白血病の病態理解. 第11回麒麟塾、2015年7月11日、コクヨホール（東京都港区)、

〔図書〕（計　0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

ホームページ等　なし

６．研究組織

(1)研究代表者

青木　由貴(AOKI Yuki)
東京医科歯科大学医学部附属病院・発生発達病態学・非常勤講師
研究者番号：90706839

(2)研究協力者

高木　正稔（TAKAGI Masatoshi）
東京医科歯科大学茨城県小児・周産期地域医療学講座・准教授
研究者番号：10406267