

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19186

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の薬剤不応性・耐性を応答性に導き、耐性化を防ぐ新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of a novel strategy to cancel and prevent the drug resistance in myelodysplastic syndromes

研究代表者

今西 哲 (Imanishi, Satoshi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50462479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は造血不全を来す造血器腫瘍である。MDS治療における重要な薬剤にアザシチジンがあるが、患者の半数には効果がなく、効果のみられた場合も容易に耐性化することが、問題となっている。本研究は、アザシチジンへの耐性を解除・予防する手法の開発を目的とした。培養細胞を用いた実験で、低濃度のテリフルノミドがアザシチジンへの耐性を解除、予防することを見出した。さらにアザシチジンへの耐性を獲得した患者由来の白血病細胞でも、テリフルノミドがアザシチジンへの耐性を解除することを確認した。テリフルノミドはすでに臨床で使用されている免疫抑制剤であり、早期の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies showed that downregulation of pyrimidine salvage underlies resistance against 5-azacytidine (AZA), indicating an important role for de novo pyrimidine synthesis in AZA resistance. Because de novo pyrimidine synthesis is inhibited by the immunomodulator teriflunomide and its pro-drug leflunomide, we examined the effect of combined treatment with AZA and teriflunomide on AZA resistance to develop a novel strategy to cancel AZA resistance.

Teriflunomide remarkably inhibited the growth of AZA-resistant human leukemia cell lines in comparison with their AZA-sensitive counterparts and activated pyrimidine salvage in AZA-resistant cells. In the presence of a non-toxic concentration of teriflunomide, AZA induced apoptosis in AZA-resistant cells and leukemia cells from AZA-resistant patients.

These results suggest that combined treatment with AZA and teriflunomide can be a novel strategy to overcome AZA resistance.

研究分野：薬理学、腫瘍学

キーワード：アザシチジン テリフルノミド 薬剤耐性 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) アザシチジン (AZA) への不応、耐性の克服法の開発の状況

AZA は MDS の第一選択薬として臨床で極めて重要な薬剤である。しかし、MDS 患者のおよそ半数は、最初から AZA の効果がみとめられない (不応例)。また AZA が有効であった患者も治療期間の長短に関係なく耐性化する (耐性例) ことが知られている。耐性例の余命の中央値は 5.6 ヶ月と予後不良である。不応例、耐性例とも、治療法の選択肢は限られており、新規な薬剤の開発が精力的に進められている。一方、AZA への不応性、耐性を解除し、AZA 応答性に变化させようとする試みはなされていなかった。

(2) AZA 不応・耐性化の機序

AZA はいわゆるピリミジンサルベージ経路を通してリン酸化され、AZA トリリン酸として RNA や DNA に取り込まれることで効果を発揮する。研究代表者は、AZA 耐性を獲得したヒト白血病細胞では、ウリジンシチジンキナーゼ (UCK) 2 の発現量が減少していることを報告した。Sripayap らは、独自に樹立した AZA 耐性ヒト白血病細胞で UCK2 の失活型変異が見られる事を報告した。また、2014 年には Valencia らによって、不応例の骨髄に由来する細胞では UCK1 の発現が応答例よりも低いレベルにある事が示された。UCK1/2 はともに、ピリミジンサルベージ経路の律速酵素である。以上の背景から、培養細胞でも患者でも、AZA への不応・耐性はピリミジンサルベージ経路の低活性による AZA リン酸化の不足と関連していると考えられた。

(3) AZA 耐性細胞のピリミジン代謝

AZA 不応性・耐性細胞におけるピリミジン代謝に関する知見は乏しい。しかし Grant らは、AZA 耐性 HL60 細胞に、放射能ラベルしたウリジンを単独で添加しても細胞内放射能は変化しないが、*de novo* ピリミジン合成阻害剤と共に添加すると細胞内放射能が上昇する事を示している (文献 4)。この事は、AZA 耐性 HL60 細胞がウリジンのサルベージを行わず、*de novo* ピリミジン合成に依存している可能性を示唆している。また研究代表者は、UTP を CTP に変換する CTP 合成酵素の阻害によって、AZA 耐性細胞に AZA 濃度依存性のバイアピリティの低下が起きることを報告した (文献 1)。この結果は、CTP 不足に陥った AZA 耐性細胞がサルベージ経路を通して CTP を賄おうとした際に AZA を取り込んだと解釈することが出来る。一方 UCK2 は、ウリジンのリン酸化にも必須の役割を担っていることから、研究代表者らの AZA 耐性細胞において CTP 合成酵素の基質となる UTP は、Grant らの報告と同様に *de novo* 合成経路によって供給されていた可能性が高い。従って、*de novo* ピリミジン合成は、AZA 不応性、耐性の解除のための有力な標的候補と考えられる。患者検体について、*de novo* 合成経路の活性を検討した報告はないが、Valencia らの報告

を考慮すると、不応例、耐性例とも *de novo* 合成経路の活性が上昇している可能性が考えられた。

(4) *De novo* ピリミジン合成経路の阻害剤と臨床使用の現状

Grant らが使用した *de novo* ピリミジン合成阻害剤は臨床での使用は認められていない。また研究代表者らが使用した CTP 合成酵素阻害剤も承認には至っていない。しかし、本邦でも関節リウマチの治療に用いられるレフルノミドが、*de novo* ピリミジン合成の阻害剤であることが知られている (文献 5)。レフルノミドは腸壁を通過する際に活性体であるテリフルノミドへと代謝され、リンパ球の増殖抑制を通して、免疫抑制効果を発揮する。テリフルノミドは本邦では未承認であるが、欧米では多発性硬化症への適応が承認されている。レフルノミドやテリフルノミドとの以上から併用によって、AZA 不応性、耐性を解除できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

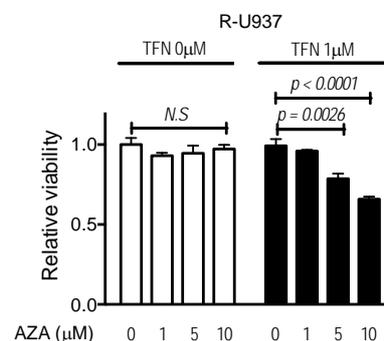
本研究は AZA 応答性を獲得・回復させる新規治療戦略の開発および、AZA 耐性化を予防する治療戦略の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は代表者の所属する東京医科大学医学総合研究所で、ヒト白血病細胞株より独自に樹立した AZA 耐性亜株を用いて、テリフルノミドが AZA 耐性に及ぼす効果を検証した。併せて AZA 耐性を獲得した患者由来の白血病細胞を用いて同様の検討を実施した。また、ヒト白血病細胞株を用いて、テリフルノミドが AZA 耐性の獲得を予防できるのか検討を行った。

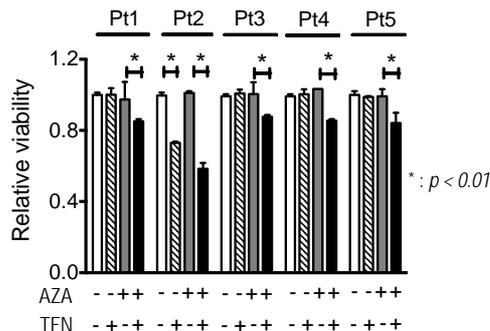
4. 研究成果

まず AZA 耐性細胞のピリミジン代謝が *de novo* 合成経路に依存しているかを検討するために、ヒト白血病細胞株と AZA 耐性亜株のテリフルノミドへの感受性を比較した。AZA 耐性亜株はヒト白血病細胞株に比べて低濃度のテリフルノミド処理で細胞増殖の低下がみられ、AZA 耐性亜株のピリミジン代謝は *de novo* 合成経路により強く依存していることが確認できた。そこで AZA 耐性亜株を、細胞増殖に影響しない $1\mu\text{M}$ のテリフルノミドと $1\sim 10\mu\text{M}$ の AZA で処理したところ、AZA の濃度に依存する増殖抑制が観察された (下図)。



この増殖抑制は Annexin V 陽性/PI 陰性の細胞集団、Annexin V 陽性/PI 陽性の細胞集

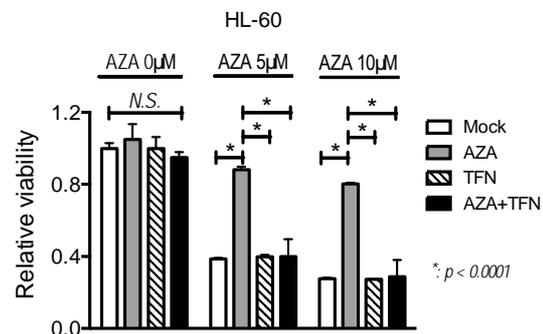
団の増加を伴っており、アポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。また、AZA 耐性亜株では AZA と 1 μ M のテリフルノミドを共添加した場合にのみ DNMT3A タンパク質の減少がみられ、1 μ M のテリフルノミドの存在下では AZA 耐性亜株においても AZA が DNMT 阻害剤として作用する事が示唆された。以上の結果から、テリフルノミドは低濃度でも株化培養細胞における AZA 耐性を解除できることが証明された。そこで、MDS 治療中に AZA 耐性を獲得し、急性骨髄性白血病へと進展をきたした症例（男性 5 名、女性 1 名）より採取した白血病細胞を用いて、テリフルノミドが AZA 耐性に及ぼす効果を検討した。この実験は、東京医科大学医学倫理委員会承認番号 1974「造血器腫瘍を対象とする薬剤感受性試験」に基づき、紙面にて研究目的と内容を提示し、口頭で説明のうえ、明示的に同意を得て実施した。患者由来白血病細胞は AZA 処理では生存率に変化は見られなかった。1 μ M のテリフルノミド処理は、一例をのぞき患者由来白血病細胞の生存率に影響を及ぼさなかった。一例では生存率の低下が観察された。1 μ M のテリフルノミド処理で生存率の変化が見られなかった症例では、1 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドの共処理によって、生存率の顕著な低下がみとめられた（下図）。また 1 μ M のテリフルノミドのみでも生存率の低下がみられた症例でも、1 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドの共処理によって生存率のさらなる低下が生じた（下図 Pt2）。



健康者より採取した CD34 陽性造血幹・前駆細胞では 1 μ M の AZA のみの処理、1 μ M のテリフルノミドのみの処理、1 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドの共処理のいずれも細胞増殖に影響しなかった。これらの結果から、テリフルノミドは患者由来白血病細胞でも AZA 耐性を解除できることが示された。

さらに、テリフルノミドが AZA 耐性獲得を予防出来るのか検討するために、2 株のヒト白血病細胞を 5 μ M の AZA のみ添加、1 μ M のテリフルノミドのみ添加、5 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドの共添加の各条件で長期培養する実験を行った。培養中は 3 日または 4 日毎に生存細胞数を計測すると同時に、培地交換を行い薬剤を添加した。どちらの細胞も 1 μ M のテリフルノミドのみ添加した群の増殖は、無処理の群と差がなかった。5 μ M の AZA のみ添加した群、5 μ M の AZA と 1 μ M のテリフ

ルノミドを共添加した群の生存細胞数は、添加後 1 週間以内に元の 5% 未満に低下した。その後 38 日目までは増殖が見られなかったが、42 日目から 49 日目にかけて、5 μ M の AZA のみ添加した群において細胞増殖がみられ耐性細胞が出現したと考えられた。しかし、5 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドを共添加した群では 49 日目に至るまで細胞増殖はみとめられなかった。各群の AZA 感受性を評価する為に、培養 52 日目に生残細胞を回収し 1~10 μ M の AZA のみで処理して細胞増殖を調べた。無処理の群、1 μ M のテリフルノミドのみ添加した群では AZA 処理により生存率の顕著な低下がみられた。5 μ M の AZA のみ添加した群では、上記の観察通り細胞増殖がみられ AZA 耐性の獲得が確認された。5 μ M の AZA と 1 μ M のテリフルノミドを共添加した群では、AZA の濃度に依存的な増殖抑制がみとめられ、1 μ M のテリフルノミドは AZA 耐性の獲得を予防できることが示された（下図）。



また培養 52 日目には AZA のみ添加した群で UCK2 の発現の顕著な低下が見られたが、AZA とテリフルノミドを共添加した群では明らかな低下は検出されず、テリフルノミドによる AZA 耐性獲得の予防効果は UCK2 の発現低下の予防によることが示唆された。

最後にテリフルノミドによる AZA 耐性解除が in vivo でも可能か検討する目的で、ヒト白血病細胞株または AZA 耐性亜株をヌードマウスの皮下に移植するモデル作成を行った。ヒト白血病細胞株を移植した全てのヌードマウスで腫瘍が形成されたが、AZA 耐性亜株を移植したヌードマウスで腫瘍形成に至ったのは 20% 未満であった。AZA 耐性亜株の生着率が想定外に低く十分なサンプル数を得られなかったため、in vivo での評価は統計的な信頼性が担保できないものとなった。そのため以下の内容は参考である。AZA 耐性亜株を移植後 1 週間で腫瘍形成の見られたマウス 8 匹を 2 匹ずつ 4 群に分け、溶媒のみ、AZA のみ、テリフルノミドのみ、AZA とテリフルノミドをそれぞれ投与した。溶媒のみ、AZA のみ、テリフルノミドのみを投与した各群のマウスは腫瘍の成長が続き、移植後 6 ヶ月以内に全例死亡した。AZA とテリフルノミドを投与した 2 匹では腫瘍の縮小または消失がみられ、移植後 6 ヶ月の時点で生存していた。

以上の結果から、テリフルノミドを併用することで、AZA 耐性を解除・予防できる可能

性が強く示された。特に本研究で用いたテリフルノミドの1 μ Mという濃度は、レフルノミドを使用している関節リウマチ患者の血中濃度の1/10以下という低濃度であり、副作用を抑えて使用できることが期待出来る。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Koboayashi C, Umezu T, Ohyashiki K, Ohyasaki JH. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells. *Oncotarget*. 2017; 8 (41), 69906-69915. . doi: 10.18632/oncotarget.19436. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Umezu T, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Teriflunomide, a De novo Pyrimidine Synthesis Inhibitor, Prevents 5-Azacytidine Resistance. The 79th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (2017.10.20-22) Tokyo.

2. Satoshi Imanishi, Ryoko Takahashi, Tomohiro Umezu, Chiaki Kobayashi, Seiichiro Katagiri, Kazuma Ohyashiki, Junko Ohyashiki. Teriflunomide Restores 5-Azacytidine Sensitivity via Activation of Pyrimidine Salvage in 5-Azacytidine-Resistant Leukemia cells. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndroms. Valencia, Spain. 3-6 May, 2017.

3. Satoshi Imanishi, Ryoko Takahashi, Tomohiro Umezu, Chiaki Kobayashi, Seiichiro Katagiri, Kazuma Ohyashiki, Junko Ohyashiki. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via inhibition of DNA methyltransferase. 7th JSH International Symposium. Awaji, Japan. 13 May, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
プレスリリース「抗がん剤に対する薬剤耐性の解除と予防方法を見出す」：
www.tokyo-med.ac.jp/news/media/docs/170725Press.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者
今西 哲 (IMANISHI, Satoshi)
東京医科大学 医学部 助教
研究者番号：50462479

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()