

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10111

研究課題名(和文) ゲノム編集スクリーニングを用いた急性骨髄性白血病に対する新たな治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets against refractory AML using genome editing

研究代表者

福田 誠司 (Fukuda, Seiji)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：30273147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では予後不良であるFLT3変異陽性急性白血病の薬剤耐性を克服することを目的に、薬剤耐性に至る分子機構を解析することを通して、新しい治療標的分子を同定した。この研究では網羅的スクリーニングを通して、ケモカインCxcl12がFLT3変異陽性急性白血病の薬剤耐性を変化させる分子候補としてRunx1という転写因子を同定した。そして、その発現変化が薬剤耐性に機能的に関わることを見出した。本研究の結果、薬剤耐性を引き起こすRunx1分子を新しい治療標的とすることが予後不良なFLT3変異陽性急性白血病の薬剤耐性を克服し、更には患者さんの予後を改善することに結びつくことが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病の予後は芳しくない。特にFLT3変異陽性のケースは予後が悪い。近年、FLT3変異に対する抑制剤(FLT3抑制剤)が承認され使用されているが、大部分は治療抵抗性となる。治療抵抗性の分子メカニズムは様々なものが知られているが、この研究ではFLT3抑制剤の治療抵抗性のメカニズムを新たに見出した。すなわち、治療抵抗性を克服しうる新たな治療標的が同定できた。この研究をさらに発展させることでFLT3抑制剤の治療効果が改善し、患者の予後改善に結びつく可能性がある点で意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：This study was to determine the molecular mechanism responsible for the refractory FLT3 mutated acute myeloid leukemia. Using the mRNA microarray screening, we identified a transcriptional factor Runx1 as a candidate molecule responsible for the resistance of the FLT3 mutated acute myeloid leukemia. Our subsequent analyses validate that Runx1 is indeed involved and modulate resistance regulated by chemokine Cxcl12 in FLT3 mutated acute myeloid leukemia cells. We identified that changes in expression level in FLT3 mutated acute myeloid leukemia cells, which was dependent on the magnitude of Cxcl12/Cxcr4 signaling, regulates resistance of FLT3 mutated acute myeloid leukemia against FLT3 inhibitors. This study suggest that Runx1 represents potential target for the treatment of FLT3 mutated acute myeloid leukemia that are refractory against FLT3 inhibitors.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：急性骨髄性白血病 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は、造血幹細胞などのDNA上の変異が原因で発症する。例えば、造血幹細胞の増殖や分化に重要なチロシンキナーゼ受容体「Flt3 遺伝子」にDNAの繰り返し配列が挿入される Internal Tandem Duplication (Flt3/ITD) 変異は、小児で10-15%、成人で30%と高頻度に見られる。Flt3/ITD は白血病細胞に対して「自己複製能亢進」、「分化能喪失」と「薬剤耐性」という異常表現型をもたらす。このような細胞を根絶する為の大量抗がん薬治療と造血幹細胞移植は、重篤な副作用が必発であるので、必ずしも理想的治療とは言えない。深刻な有害事象を避け、より高い治療効果を得るためには、疾患や治療抵抗性の原因に対して有用性が検証された分子標的治療が望ましい。しかし、既存の Flt3/ITD 分子標的薬の効果は芳しくなく、成人小児を問わず Flt3/ITD 陽性 AML は予後不良である。例えば、最近治験が行われた選択的 Flt3/ITD 阻害薬 AC220(キザチニブ)は、治療抵抗性 Flt3/ITD 陽性 AML に対して有用とされたにも拘わらず、キザチニブ耐性の細胞が出現する(1-3)。したがって、予後改善の為には新たな治療標的や薬剤耐性機構を見出すことが必要である。

2. 研究の目的

本研究では Flt3/ITD 陽性 AML の FLT3 阻害薬キザチニブに対する抵抗性をもたらす分子を同定し、治療抵抗性を克服するための新たな治療方法を提唱する為に以下の目的で研究を行った。

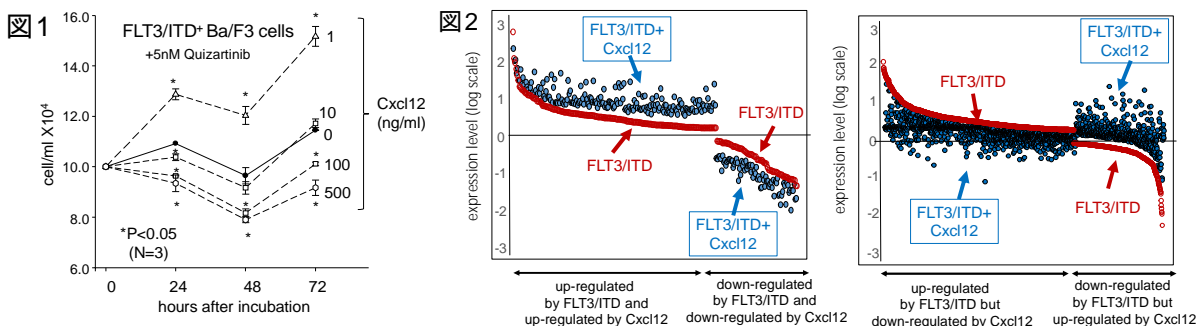
1. Flt3/ITD が細胞の「薬剤耐性」をもたらす分子群を同定する
 2. 同定された分子群の機能解析を行い、治療標的としての妥当性を検証する
- 本研究では当初ゲノム編集を用いたスクリーニング方法を通じた薬剤抵抗性分子の同定を計画していたが、より確実な方法としてマイクロアレイを用いたスクリーニングを行い、同定した分子の機能解析を行った。この中で今回は特にケモカイン Cxcl12 と呼ばれる骨髄微小環境に存在する分子が薬剤抵抗性に及ぼす影響を解析することにした。

3. 研究の方法

FLT3/ITD 変異を発現する造血細胞(以下 FLT3/ITD+細胞)をキザチニブ存在下で培養し、Cxcl12 を添加した際の細胞増殖へ及ぼす効果を定量した。また、FLT3/ITD が影響を及ぼす遺伝子発現に対して Cxcl12 が与える影響を解析した。更に Cxcl12 の細胞側受容体である Cxcr4 発現が低い細胞と高い細胞(Cxcr4 低細胞と Cxcr4 高細胞)に細胞を分離し、キザチニブ存在下での Cxcl12 の効果を比較した。また、Cxcr4 低細胞と Cxcr4 高細胞のキザチニブ耐性を Cxcl12 存在下で比較した。更に Cxcl12 が Cxcr4 低細胞と Cxcr4 高細胞においてキザチニブ耐性を変化させる分子候補として Runx1 と呼ばれる転写因子を同定し、その機能を解析した。

4. 研究成果

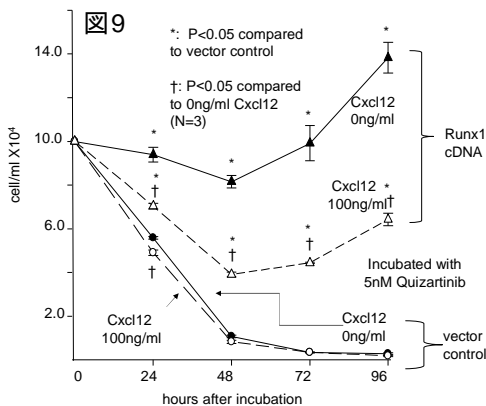
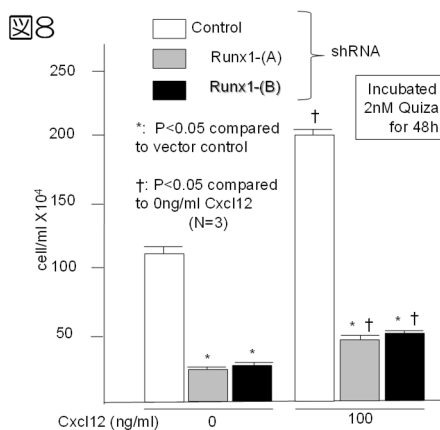
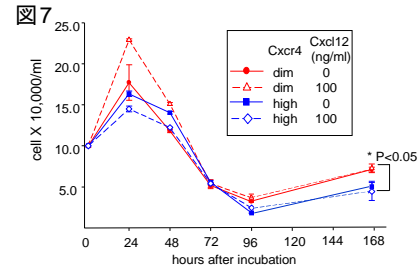
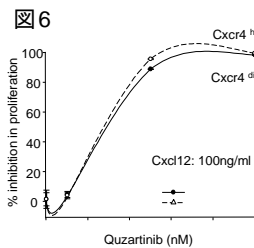
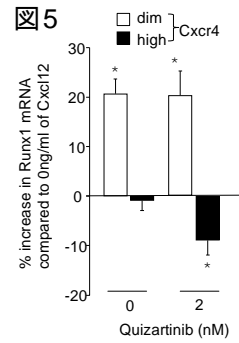
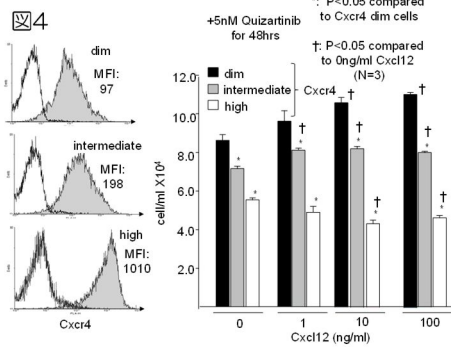
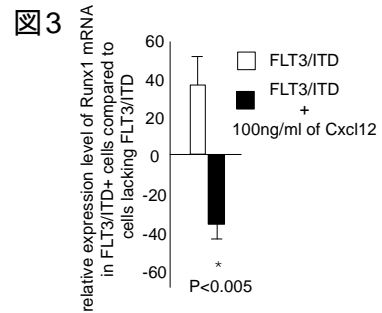
5nM キザチニブは FLT3/ITD+細胞の増殖を有意に低下させたが、低濃度の Cxcl12(1ng/ml)は細胞の生存を上昇した。これに対し、高濃度の Cxcl12(100,500ng/ml)は細胞の生存を有意に低下させた(図1)。そこで 100ng/ml の Cxcl12 が FLT3/ITD によって変化する遺伝子発現を抑制するのではないかという仮説を考え、マイクロアレイ法を用いて FLT3/ITD によって変化する遺伝子発現が Cxcl12 によってどのように変化するかを解析した。その結果、Cxcl12 は FLT3/ITD によって変化する遺伝子群の内、約4%は FLT3/ITD によって生ずる遺伝子変化を更に増強していたが、逆に25%の遺伝子群の変化を拮抗していた(図2)。例えば、Runx1 という転写因子は FLT3/ITD によって発現は上昇したが、100ng/ml Cxcl12 によってその発現は低下した(図3)。すなわち、FLT3/ITD によって上昇する Runx1 発現は Cxcl12 によって抑制された。



上記のように FLT3/ITD+細胞において低濃度の Cxcl12 はキザチニブの効果を拮抗し細胞の薬剤抵抗性を増強したが、高濃度の Cxcl12 はキザチニブの効果を増強し、細胞の薬剤抵抗性を減弱させた。そこで私たちは Cxcl12 の受容体である Cxcr4 の発現レベルが低い細胞と高い細胞 (Cxcr4 低細胞と Cxcr4 高細胞) においても同様の違いが生じるのではないかと考え、それぞれの細胞で Cxcl12 100ng/ml が Cxcr4 低細胞と Cxcr4 高細胞に対して及ぼす効果を比較した。

Cxcr4 低細胞に於いては 100ng/ml Cxcl12 はキザチニブの効果を減弱させ、細胞生存を促したのに対し、Cxcr4 高細胞

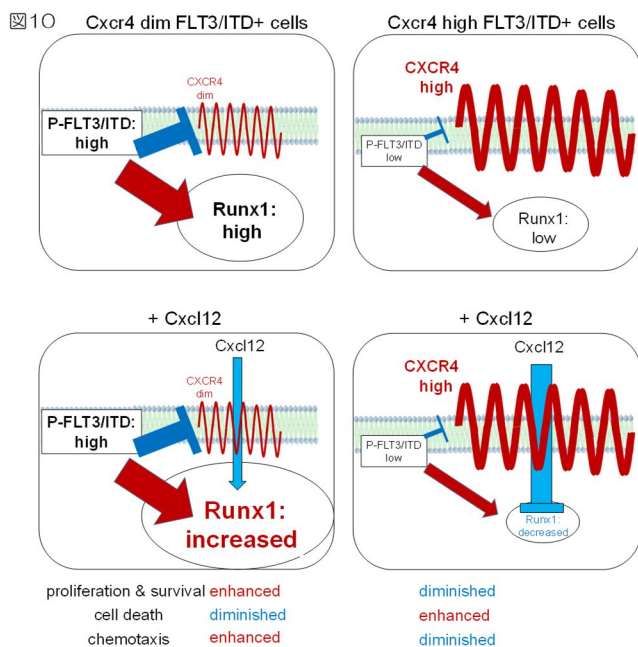
に於いては 100ng/ml Cxcl12 はキザチニブの効果を増強し細胞生存を減弱させた(図4)。この時、細胞内の Runx1 は Cxcr4 低細胞では増加したのに対して、Cxcr4 高細胞では減少した(図5)。また、Cxcr4 低細胞は Cxcl12 存在下でキザチニブへの抵抗性が Cxcr4 高細胞と比較して増強しており(図6)、キザチニブ抵抗細胞の出現も亢進していた(図7)。最後に Cxcr4 低細胞において Cxcl12 がキザチニブの効果を減弱する原因が Runx1 の発現上昇であることを証明する為に Cxcr4 低細胞の Runx1 発現を shRNA 法によって低下させ、100ng/ml Cxcl12 がキザチニブに及ぼす効果を比較した。Runx1 を低下させた Cxcr4 低細胞では Cxcl12 によるキザチニブへの拮抗作用を有意に減弱させ、Cxcl12 によって上昇した細胞生存は減少に転じた(図8)。更に Cxcr4 高細胞において Cxcl12 がキザチニブの働きを増強させる際に Runx1 が減少していることが原因であることを証明する為に、Cxcr4 高細胞に Runx1 を過剰発現し、100ng/ml Cxcl12 のキザチニブ増強効果が解消されるかを解析した。Runx1 の過剰発現は Cxcr4 高細胞において Cxcl12 のキザチニブ作用の増強を有意に抑制し、細胞の増殖を促すに転じ、更にはキザチニブ抵抗細胞の出現を促した(図9)。



これらの結果は、Cxcl12 が濃度依存性に FLT3/ITD+細胞のキザチニブ抵抗性を増強または減弱させること、濃度依存性は Cxcr4 発現の程度とも一致する事、そして Cxcl12 によるキザチニブへの耐性効果は Runx1 によって制御されていることを示す(図10)。これまでに急性骨髄性白血病の治療として Cxcl12 と Cxcr4 の相互作用を抑制する薬剤の有効性が報告されたが、完全ではない。

今回の私たちの研究結果は Cxcl12 または Cxcr4 を抑制することは Cxcr4 低細胞では有用であるが、Cxcr4 高細胞では細胞生存を促してしまう可能性を示唆する。しかし、この弱点を克服する点で Runx1 を標的とすることが Cxcr4 の発現のレベルに関わらずより効果的である可能性が示された。Runx1 を FLT3/ITD 陽性急性骨髄性白血病の治療標的として提案し、実際に有効である

かどうかを次の研究課題として取り組む予定である。尚、本研究成果の一部は第 81 回日本血液学会及び第 61 回米国血液学会で発表した。



文献

1. Smith et al. *Nature* 2012.485: 260-3
2. Hirade et al. *International Journal of Hematology* 2016.103: 95-106
3. Abe et al. *PLOS ONE* 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0158290. 1-26

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoggatt J, Singh P, Tate TA, Chou BK, Datari SR, Fukuda S, Liu L, Kharchenko PV, Schajnovitz A, Baryawno N, Mercier FE, Boyer J, Gardner J, Morrow DM, Scadden DT, Pelus LM	4. 巻 172
2. 論文標題 Rapid Mobilization Reveals a Highly Engraftable Hematopoietic Stem Cell	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 191-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2017.11.003. Epub 2017 Dec 7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Singh P, Fukuda S, Liu L, Chitteti BR, and Pelus LM	4. 巻 36
2. 論文標題 Survivin is Required for Mouse and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 123-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fukuda S, Onishi C, Taketani T
2. 発表標題 Cxcr4 low FLT3/ITD + Cells Exhibit Enhanced Resistance to the FLT3 Inhibitor Quizartinib Compared to Cxcr4 high FLT3/ITD + Cells By Elevating Runx1 Expression
3. 学会等名 61th annual meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda S, Onishi C, Taketani T
2. 発表標題 Runx1 Augments Proliferation and Chemotaxis Induced by Cxcl12 in Quizartinib Refractory FLT3/ITD+ cells
3. 学会等名 81th annual meeting of Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田誠司
2. 発表標題 FLT3阻害剤耐性の分子機構
3. 学会等名 Acute Myeloid Leukemia Expert Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田誠司
2. 発表標題 白血病の病態と新しい治療法
3. 学会等名 第91回鳥根大学サイエンスカフェ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Fukuda, Tomohiro Hirade, Mario Abe, Takeshi Taketani
2. 発表標題 CXCL12/CXCR4 functions both stimulatory and antagonistic on FLT3/ITD signaling
3. 学会等名 第121回日本小児科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Fukuda, Chie Onishi, Tomohiro Hirade, Takeshi Taketani
2. 発表標題 CXCL12/CXCR4 Delivers Pro-Apoptotic Activity in FLT3/ITD+ cells by Antagonizing Expression of Genes Deregulated by FLT3/ITD
3. 学会等名 第60回日本小児血液がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Fukuda, Tomohiro Hirade, Mario Abe, Takeshi Taketani
2. 発表標題 CXCL12/CXCR4 functions both stimulatory and antagonistic on FLT3/ITD signaling
3. 学会等名 121th Annual meeting of Japanese Society of Pediatrics
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fukuda S, Hirade T, Abe M, Taketani T, Onishi C	4. 発行年 2018年
2. 出版社 In Tech Pone Publisher	5. 総ページ数 25
3. 書名 Molecular Interaction between the Microenvironment and FLT3/ITD+ AML Cells Leading to the Refractory Phenotype	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>血液悪性腫瘍に関する研究 島根大学小児科 https://ped-shimane-u.jp/study/hematological_malignancy 血液悪性腫瘍に関する研究 島根大学小児科 https://ped-shimane-u.jp/study/hematological_malignancy http://ped-shimane-u.jp/study/hematological_malignancy</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

アメリカ合衆国	インディアナ大学			
---------	----------	--	--	--