

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16251

研究課題名(和文) 中枢神経の低酸素領域に存在する白血病細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy against CNS leukemia

研究代表者

加藤 格 (Kato, Itaru)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10610454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では難治性の白血病である中枢神経に浸潤した白血病の遺伝学的、分子生物学的特徴を、患者検体や免疫不全マウスで増殖させた細胞を用いて多角的に解析した。その結果として中枢神経浸潤白血病細胞の低酸素領域に生存する細胞の特徴を標的とした新しい治療法を提言した。(Blood. 2017;129:3126-3129.)。さらにはがん免疫療法として注目されるCART細胞療法を用いた中枢神経浸潤白血病に対する新規治療戦略を提示した。(Mol Ther Oncolytics. 2020 :26;18:37-46.)

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床でその治療戦略に難渋することが多く、特に小児患者においては治癒したとしても長期合併症を負った場合には著しいQOLの低下を来すことのある中枢神経浸潤白血病に対して、免疫不全マウスでの細胞増殖の長所を生かして多角的解析を行うことが出来た。明らかにした中枢神経浸潤白血病の特徴を標的とした分子標的による合併症の軽減が期待される新規治療戦略や、がん免疫療法を発展的に使用した治療コンセプトを、マウスを用いた前臨床試験として提示することが出来た。

研究成果の概要(英文)：The central nervous system (CNS) is a key site of extramedullary disease in acute lymphoblastic leukemia (ALL). In this study, we investigated the detailed phenotypic, genetic, and transcriptional biology of leukemic cells reside in the CNS. With primary human B-ALL cells and xenograft recipients of primary samples, we demonstrate that leukemic cells that have infiltrated the CNS show features of adaptation to hypoxia and molecular targeted therapy specifically reduces the burden of CNS disease in a xenograft model. Furthermore, we demonstrated a possible novel therapeutic approach against CNS leukemia with CART cells.

研究分野：小児白血病

キーワード：中枢神経白血病 低酸素領域 CART細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性新生物が日本における死亡原因の第1位(約30%)を占める中、小児においても悪性新生物は約1万人に1人の割合で発症し、年間2,000~2,500人が小児がんと診断され、小児死亡原因の第2位となる疾患群である。小児悪性腫瘍の最も多くを占める小児白血病(約40%)は、診断法の進歩、化学療法・移植療法や支持療法の発達により5年生存率が80%を超え、治癒率が画期的に改善されているが、依然として予後不良な病型が存在し、再発後の生存率は30%程度と予後不良である。特に再発リスクの高い中枢神経病変を有する白血病症例では治癒を目指すために大量化学療法や全脳全脊髄照射、造血幹細胞移植などの治療が不可欠であるが、発達途中にある小児患者では、抗癌剤、放射線療法による二次がん、成長障害・不妊症などの内分泌異常、精神発達障害・痙攣性疾患などの神経毒性など、治癒後の人生の生活の質を大きく損ねる長期的な合併症が生じ得る。多くの患児が長期生存を得られる様になった今日、難治性白血病の成績向上と共に、長期合併症のない治癒を目指すことが、真の白血病克服に到達する上での不可避の課題である。こうした中、一般抗がん剤に加え悪性腫瘍細胞の、生体内での動態に基づいた分子標的薬剤の開発が topic となっている。

近年、様々な悪性腫瘍における増殖・進展・転移・治療抵抗性を考えるに当たり、サイトカイン、接着因子や小胞顆粒であるエクソソーム、さらには酸素濃度やタンパク濃度などの物理的環境因子を通じた、原発巣や転移巣における微小環境との相互作用が注目されている。特に転移先などの特殊な環境下では、低酸素環境への適応や、腫瘍細胞が細胞周期の静止期へ移行(metastatic dormancy)する事によって、ケモカインレセプター、遺伝子発現、さらには細胞代謝を変化させ、本来腫瘍細胞にとって生存しづらい転移先環境に適応・生存することが報告されてきている。こういった、転移巣における性質の変化した細胞集団は多くの化学療法の標的である細胞増殖を抑えるなどの機序で化学療法耐性を獲得し、再発に大きく寄与すると考えられている。一方で、この様な特殊な環境下における生存に必要な病態変化を解析しその特徴をつかむことで、新たな治療標的を生み出す可能性が期待される。

白血病研究においては、正常造血幹細胞微小環境の知見を基礎に、主として原発巣である骨髄での微小環境に目が向けられ幾つかの重要な報告がなされてきた。例えば、白血病幹細胞は正常造血幹細胞と同じ微小環境に存在すること、この微小環境は低酸素状態であり、細胞周期は静止期に陥り、代謝は電子伝達系から解糖系にシフトした低酸素適応した特徴を持つこと、さらにはこの様な低酸素環境にある白血病細胞は治療耐性を獲得することなどが明らかになってきている。一方、白血病は血液細胞が腫瘍化したものであり、転移という概念が構築されにくい、臨床的には中枢神経や精巣などを中心とした原発外の髄外臓器における白血病細胞残存が白血病再発に大きく寄与していることが知られている。造血支持組織ではない中枢神経などの髄外臓器での白血病細胞生存には特徴的なメカニズムが働いていると考えられるが、これまで中枢神経白血病をはじめとした髄外微小環境での白血病細胞の動態を詳細に検討した報告はほとんどない。

申請者の所属する研究室で開発され、ヒト造血幹細胞の測定系(Hiramatsu, H. et al. *Blood*, 2003)のみならず、腫瘍細胞においても腫瘍再現性、腫瘍解析ツールとしても優れている高度免疫不全マウス NOD/SCID/γcnul マウス(以下 NOG マウス)(Kato M. Sanada M. Kato I. et al. *Nature*, 2009, Sakashita K, Kato I et al. *Leukemia*, 2015)を用いて、これまでに申請者は小児急性リンパ性白血病(ALL)増殖に関わる髄外微小環境の存在を明らかにし、

ALL 細胞の髄外浸潤に重要な分子機構を解明し新たな治療戦略を提案してきた (Kato I. et al. *PLoS One*. 2011)。

申請者はこれまでに臨床学的診断に用いられる髄液検査、頭部 MRI や病理解析を用いてこの白血病マウスモデルがヒト中枢神経白血病の病態を正確に再現していることを確認し、網羅的遺伝子発現解析やメタボローム解析、in vitro、in vivo assay を用いて中枢神経にいる白血病細胞は骨髄にいる白血病細胞と比較し静止期に落ち込んだ細胞が多く、電子伝達系より解糖系にエネルギー代謝を依存するなど低酸素環境に順応した特徴を有することを明らかにした。これらの結果から中枢神経白血病細胞は、骨髄支持組織ではない中枢神経の微小環境中で生存する上で骨髄中における白血病幹細胞が存在する低酸素領域での代謝的・細胞周期静止期的性質を獲得し、白血病再発に寄与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はこれらの研究成果を発展させ、中枢神経微小環境の詳細を明らかにし、中枢神経微小環境に存在する白血病細胞の代謝的特性などを標的とすることで白血病根治を目的とした臨床応用可能な治療基盤を構築することである。

## 3. 研究の方法

患者検体や免疫不全マウスで増殖させた細胞、セルラインを用いて、中枢神経に浸潤した白血病の遺伝学的、分子生物学的特徴を解析する。また治療効果を評価するため免疫不全マウスを用いた前臨床試験を行なう。

## 4. 研究成果

(1) 申請者は白血病 xenograft マウスモデルを用いて解析を進め、低酸素領域に順応した特徴の1つとして CNS 白血病細胞は骨髄白血病細胞と比較して VEGFA の発現が上昇していることを明らかにし、白血病 xenograft model に VEGFA の阻害剤である Bevacizumab を腹腔内投与すると、骨髄白血病細胞には有意な変化はないものの、CNS では ALL 細胞がアポトーシスに陥り、細胞数が減少することを示し、Bevacizumab を用いた CNS 白血病に対する治療戦略を示した。臨床でその治療戦略に難渋することの多い CNS 白血病に対して、Xenograft model の長所を生かして多角的解析を行い、明らかにした低酸素環境に順応した CNS 白血病の特徴である VEGFA の上昇を標的とした新規治療戦略を提示することが出来た。これらの結果を Blood に誌上発表した。(Blood. 2017;129: 3126-3129.)

(2) 続いて、さらなる中枢神経白血病新規戦略を展開するため、遺伝子改変などの操作が簡便な cell line を用いた中枢神経浸潤白血病マウスモデルを構築した。RCH、TOM1、NALM6、REH、SUSR、などの B lineage ALL の cell line を NOG マウスに移植し移植後 3 週間以上経過したマウスの中枢神経浸潤評価を行なうと Cell line によって中枢神経指向性は異なり、例えば RCH は肝臓浸潤が激しいため肝腫大にて致命的転帰をたどる事が多く、TOM 1 は中枢神経浸潤をほぼ認めなかった。NALM 6、REH、SUSR は中枢神経浸潤を認めた。予後不良で中枢神経浸潤のリスクファクターである BCR-ABL 融合遺伝子を有する cell line である SUSR に IVIS システムにて luciferin による可視化が可能である luciferase を遺伝子導入し、経時的にマウスを sacrifice する事無く白血病の中枢神経浸潤を可視化する事が可能なシステムを構築した。

(3) 白血病治療においてもがん免疫療法の効果が確認されており、近年実用化されたがん免疫療法のキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T) 細胞療法は難治性小児 ALL に対して高い有効性が報告され新規治療戦略として期待されているが、治験対象症例から中枢神経浸潤白血病が除外されているため、CART 細胞療法の中枢神経浸潤白血病症例に対する効果はわかっていない。こ

れまでの研究結果からは中枢神経白血病細胞は骨髄白血病細胞とは存在する微小環境に大きな差があり、中枢神経白血病細胞は酸素や糖分、蛋白などが相対的に低下した微小環状に存在する事を示しており、その様な中枢神経の微小環境でも CART 細胞が白血病細胞に対して殺細胞性効果を発揮できるかは不明であったため、構築した解析技術を元に、Luc 導入 SUSR を使用して CART 細胞を用いた中枢神経浸潤白血病に対する治療効果を検討した。

免疫不全マウスに Luc 導入 SUSR を脳室内移植後、7 日目に CART 細胞を静脈内移植して治療効果を観察すると、5 匹中 2 匹では腫瘍細胞の消失を確認したが、3 匹のマウスで腫瘍残存、もしくは腫瘍再発を認めた。静脈内投与では効果は認めるものの治療効果は不十分であったため、CART 細胞を脳室内投与したところ 6 匹中、6 匹で腫瘍消失を認め CART 細胞の経静脈的投与と比較して優位に治療効果が優れていることが示された。CART 治療の中枢神経合併症が危惧されたが、CART 脳室内投与群においても一過性の体重減少など以外には大きな合併症は認めなかった。血清中、髄液中サイトカインも測定したがいずれもサイトカイン放出症候群を疑わせるような挙動は示していなかった。これらの結果から CART 細胞を用いた中枢神経浸潤白血病に対する新規治療戦略を提示することが出来た。

( Mol Ther Oncolytics. 2020 May 26;18:37-46. )

臨床でその治療戦略に難渋することの多い中枢神経浸潤白血病に対して、PDX の長所を生かして多角的解析を行い、明らかにした中枢神経浸潤白血病の特徴を標的とした新規標的療法やがん免疫療法を応用した新規治療戦略を提示することが出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 加藤 格	4. 巻 56
2. 論文標題 PDXモデルを用いた血液/腫瘍疾患の病態解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 407-413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11412/jspho.56.407	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 -
1. 著者名 Kato Itaru, Nishinaka Yoko, Nakamura Masahiro, et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 3126 ~ 3129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2016-06-721712	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 Eddaoudi Ayad, Canning Stephanie Louise, Kato Itaru	4. 巻 1686
2. 論文標題 Flow Cytometric Detection of G0 in Live Cells by Hoechst 33342 and Pyronin Y Staining	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 49 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7371-2_3	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 Tanaka Kuniaki, Kato Itaru, Tanaka Miyuki, Morita Daisuke, Matsuda Kazuyuki, Takahashi Yoshiyuki, Nakahata Tatsutoshi, Umeda Katsutsugu, Hiramatsu Hidefumi, Adachi Souichi, Takita Junko, Nakazawa Yozo	4. 巻 18
2. 論文標題 Direct Delivery of piggyBac CD19 CAR T Cells Has Potent Anti-tumor Activity against ALL Cells in CNS in a Xenograft Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 37 ~ 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2020.05.013	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 -

1. 著者名 加藤 格	4. 巻 57
2. 論文標題 PDXモデルによる中枢神経浸潤急性リンパ性白血病の解析と細胞療法の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 71～79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11412/jspho.57.71	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 本邦初の全国小児白血病Patient-derived xenograft (PDX)バンクの樹立
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中邦昭
2. 発表標題 CNS-ALL マウスモデルでのpiggyBac CD19 CAR-T細胞脳室内投与の安全性と有効性の検討
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中邦昭
2. 発表標題 CNS-ALL xenograft mouse モデルを用いたpiggyBac CD19 CAR-T細胞脳室内直接投与の安全性と有効性の検討
3. 学会等名 第11回日本血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 PDXモデルを用いた様々ながん種へのチャレンジ
3. 学会等名 第7回浜松毒性フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 PDXモデルによる中枢神経浸潤 急性リンパ性白血病の解析と細胞療法の可能性
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itaru Kato
2. 発表標題 Analysis of CNS-ALL with Patient Derived Xenografts (PDX) Model
3. 学会等名 29th Symposium of the international association for comparative Research on leukemia and related disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中邦昭
2. 発表標題 Direct delivery of piggyBac CD19 CAR T cells has potent anti-leukemic activity against ALL cells in CNS in a xenograft mouse model
3. 学会等名 第3回国際がんシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中邦昭
2. 発表標題 PiggyBac CD19 CAR T Cells Eradicate CNS Leukemia by Direct Delivery into Cerebral Ventricle of Xenograft Mice Model
3. 学会等名 第60回アメリカ血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中邦昭
2. 発表標題 中枢神経浸潤白血病 異種移植マウスモデルにおけるpiggyBac CD19 CAR-T細胞の脳室内投与の安全性と有効性の検討
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 田中邦昭
2. 発表標題 CNS-ALLマウスモデルでのpiggyBac CD19 CAR-T細胞脳室内投与の安全性と有効性の検討
3. 学会等名 第122回日本小児科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 PDXモデルを用いた血液/腫瘍疾患の病態解析
3. 学会等名 第60回日本小児血液がん学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 中枢神経浸潤への挑戦
3. 学会等名 信州CAR-T研究開発グループ ミニレクチャー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緩和的全脳全脊髄照射が長期的有効性を示した難治性中枢神経浸潤 急性リンパ性白血病小児症例
2. 発表標題 緒方瑛人
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 加藤 格
2. 発表標題 中枢神経浸潤白血病の病態解析とVEGFAを標的とした治療モデル
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 免疫不全マウスを用いた中枢神経白血病の病態解析
3. 学会等名 第25 回腫瘍病理セミナー（AMED 次世代がん）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 格
2. 発表標題 免疫不全マウスを用いた 中枢神経白血病の病態解析
3. 学会等名 第14回JCCG血液腫瘍分科会 研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Daniel Lacorazza	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 303
3. 書名 Cellular Quiescence	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学医学部附属病院小児科HP  <a href="https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/">https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/</a></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
研究協力者	田中 邦昭  (Tanaka Kuniaki)	京都大学医学部附属病院・小児科・大学院生	

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
---------	---------