

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790712

研究課題名 (和文) 11q23 転座型急性白血病に対する FLT3 阻害剤を用いた分子標的療法

研究課題名 (英文) Molecular targeted therapy for acute leukemia with 11q23 translocation with FLT3 inhibitor

研究代表者 高橋 和也 (TAKAHASHI KAZUYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：30422687

研究成果の概要：

11q23 転座型急性白血病に対する、FLT3 inhibitor である PKC412 の、抗腫瘍効果とその機序について、明らかにすることを目的として解析を進めている。

11q23 転座型急性白血病株では、構成的に STAT5、MAPK、Akt が強くリン酸化されていたが、PKC412 添加後、脱リン酸化された。また、PKC412 添加後、G₀/G₁ arrest が誘導され、さらに、アポトーシスが誘導された。アポトーシス関連遺伝子を検討したところ、FLT3 変異を有する細胞株では、PKC412 添加後、Bim EL が増加し、FKHRL1 は脱リン酸化された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	180,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：FLT3, 11q23 転座, FLT3 阻害剤, ALL

1. 研究開始当初の背景

乳児急性リンパ性白血病は、強力な化学療法にもかかわらず、早期に再発し、予後不良の疾患と考えられている。多くは 11 番染色体長腕上の 23 領域に存在する *MLL* (*Mixed-lineage leukemia*) 遺伝子が発症に関与していることがわかっている。この 11q23 転座型急性白血病は、現在でも化学療法単独での 5 年生存率が 20% 以下で、化学療法に対する移植療法の優位

性に対し、疑問視する報告もある。最近、この 11q23 転座型急性白血病で、受容体型チロシンキナーゼ FLT3 が高レベルで発現し、恒常的にリン酸化されていることが報告された。

FLT3 は、受容体型チロシンキナーゼの一つで、この FLT3 の欠損マウスは造血系では pro-B-cell と pre-B-cell の分画の減少がみられると報告されている。正常細胞での発現は主に CD34 陽性未熟骨髄系、

リンパ球系前駆細胞、樹状前駆細胞、他に胎盤、性腺、脳で認められているが、白血病細胞でもPre-B ALLの他に、AMLで高頻度に発現していることが報告されている。

FLT3の遺伝子変異は、ALLの1~3%、MDSの5~10%、AMLの15~35%に認められ、この遺伝子変異は大きく、膜近傍領域である Juxtamembrane domain の Internal tandem duplication (ITD) と、tyrosine kinase domain (TKD) の Missense point mutation のふたつにわけられる。主に、前者はAMLでみられ、後者は11q23転座型 ALL、hyperdiploid ALL、AMLで認められる。近年、Juxtamembrane domain の deletion が hyperdiploid ALL で認められたという報告もある。FLT3の変異により、リガンド非依存性のチロシンキナーゼの構成的な活性化がおこり、持続的に細胞内にシグナルを伝えると報告されている。基礎的にも臨床的にも、FLT3/ITD変異を有するAMLは予後不良であるという報告は多数ある。しかし、国内外でALL (特に11q23転座型白血病) についての報告は散見されるのみで、多種類のALL細胞 (特に11q23転座型白血病細胞) を対象にして、FLT3 inhibitor に対する抗腫瘍効果 (DNA合成能、細胞周期、細胞死) とその機序についての多角的な解析を行った報告はほとんどみられていない。

我々は予備実験として、樹立・維持している11q23転座型白血病細胞株に対し、FLT3/TKD D835/I836の変異の有無について検討した。なお、これらのTKD変異はFLT3/TKDのなかで高頻度に認められていて、変異がTKD D835にあるとAsp→Tyrへ、I836にあるとIso→Metへ置換される。野生型FLT3はD835/I836に制限酵素EcoRVの切断部位を有しているため、各細胞株からDNAを抽出し、EcoRVの切断部位を含む部位をPCR法で増幅し、EcoRVで切断した。これにより、D835/I836の遺伝子変異は11q23転座型白血病株のうち2細胞株で認められた。次に、11q23転座型白血病株を含む急性リンパ性白血病細胞株のcDNAを作成し、FLT3 mRNAの発現レベルをreal-time PCR法を用いて検討した。FLT3 mRNAの発現は11q23転座型ではPh1染色体陽性細胞株、t(1;19)転座型細胞株と比較して有意差をもって高い傾向が認められた。これら

細胞株に対し、PKC412 200~400nM添加後に³H-thymidineを添加し、その取込みを測定しDNA合成能を検討した。11q23転座型白血病株では、他の白血病細胞株と比較してPKC412添加後、濃度依存性及び時間依存性に合成能の強い抑制が観察された。また特にFLT3/TKD D835/I836の遺伝子変異を有する細胞株では顕著だった。

このことをふまえ、FLT3/TKD D835/I836の遺伝子変異を有する細胞株を含め、11q23転座型白血病株に対するFLT3 inhibitorの効果とその機序について解析を行い、FLT3 inhibitorの有用性が基礎的・臨床的に証明されれば、11q23転座型 ALL の治癒率を向上できる可能性がある。

2. 研究の目的

予後不良とされる11q23転座型白血病に対する新たな治療の可能性を探るため、FLT3 inhibitorであるPKC412の、11q23転座型白血病に対する抗腫瘍効果とその機序について、白血病細胞株を用いて明らかにしてゆく。

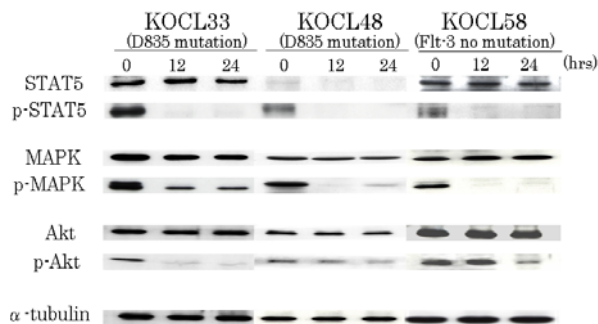
3. 研究の方法

- (1) 11q23転座型白血病細胞株で、FLT3の活性化シグナルを伝達するSTAT5, RAS/MAPK, PI3K/Akt蛋白のリン酸化状態について、およびPKC412による影響について、Western blot法を用い検討する。
- (2) PKC412添加後、アポトーシス細胞数の変化について、AnnexinV / Propidium Iodide (PI) の二重染色後、flow cytometerを使用し、解析する。また、細胞周期解析について、PKC412添加後にBrdU/PIの二重染色後、flow cytometerで解析する。Go/G1期、S期、G2/M期の割合の変化を検討し、PKC412がcell cycle arrestを誘導するかどうかを検討する。
- (3) PKC412添加後の、シグナル伝達因子、アポトーシス (Bcl-2 familyなど) 及び細胞周期関連蛋白の発現の変化について、Western blot法を用い検討する。
- (4) 平成19年度まででFLT3遺伝子変異を有する11q23転座型白血病株のアポトーシス誘導機序にはBimが関与していることがわかったが、FLT3遺伝子変異のない11q23転座型白血病株のアポトーシス誘

導機序については不明である。我々は、これら細胞株について、ROS (Reactive Oxygen Species) などの関与について、PKC412に加えて、主に ROS inhibitor を併用しながら検討していく。

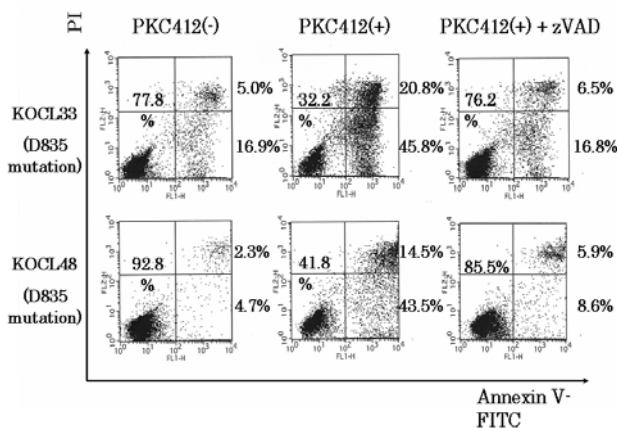
4. 研究成果

(1) FLT3 下流の蛋白である STAT5、Ras/MAPK、PI3K/Akt について、PKC412 添加後のリン酸化状態の変化を Western blot 法で検討した。構成的に STAT5、MAPK、Akt が強くリン酸化されていたが、PKC412 添加後に、脱リン酸化された。

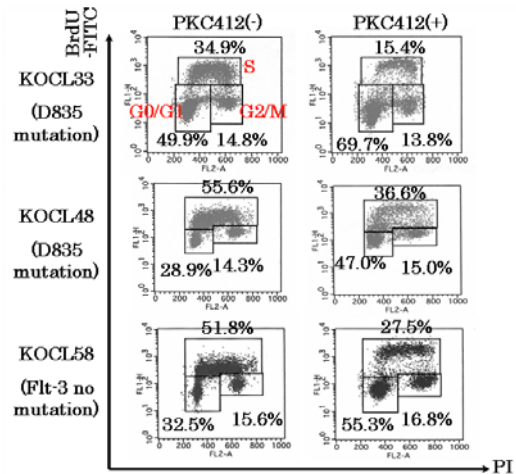


KOCL33; 11q23 B-precursor ALL cell line
FLT3 D835 point mutation(+)
KOCL48; Monocytoid leukemia cell line
FLT3 D835 point mutation(+)
KOCL58; 11q23 B-precursor ALL cell line
FLT3 D835 point mutation(-)

(2) PKC412 添加後のアポトーシス誘導を、Annexin V / Propidium Iodide (PI) 二重染色を用いて解析したところ、PKC412 添加後、annexin V 陽性細胞が増加し、また pan caspase inhibitor (z-VAD) を preculture 後、PKC412 を添加すると、Annexin 陽性細胞が著明に減少した。従って、PKC412 によるアポトーシスは caspase-dependent と考えられた。

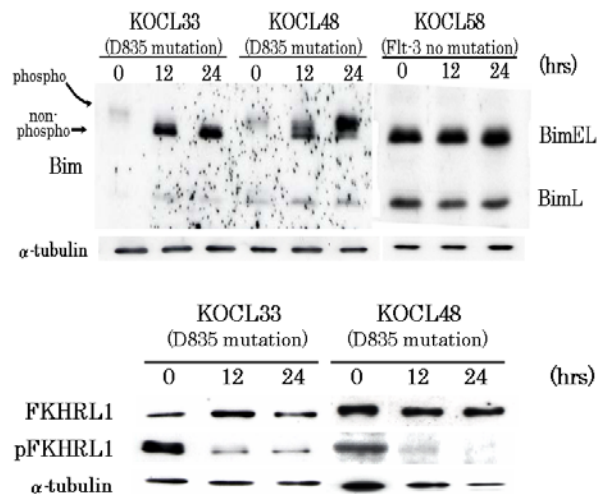


また、PKC412 添加後の細胞周期について、BrdU/PI 二重染色を用いて解析したところ、G₀/G₁ arrest が誘導されていた。



(3) Western blot 法による蛋白発現解析により、Cyclin D/CDK4 もしくは Cyclin E/CDK2 複合体の発現低下が関与しているものと考えられた。

さらに、PKC412 添加後にアポトーシス関連遺伝子の蛋白発現の変化を Western blot 法で検討したところ、FLT3 遺伝子変異を有する 11q23 転座型白血病株では、pro-apoptotic 蛋白である Bim EL の蛋白発現が増加し、FKHRL1 が脱リン酸化された。他のアポトーシス関連遺伝子の蛋白発現の明らかな変化は認められなかった。以上より、アポトーシス誘導機序は、FKHRL1 の脱リン酸化による Bim の発現増加を介することが示唆された。



(4) FLT3 遺伝子変異のない 11q23 転座型白血病株について、PKC412 添加後、DCFDA 及び dihydroethidium を用い、ROS の測定を行ったが、細胞株による、および薬剤の有無による、有意な差異は観察されなかった。さらに、ROS inhibitor である NAC (1-acetyl L-cystain) を添加し、PKC412 添加後の細胞株の viability について検討した。確かに NAC 添加後は細胞の viability が救済されていることから、PKC412 添加後のアポトーシス誘導機序は、ROS 経路を介している可能性が示唆された。

今後は、特に FLT3 遺伝子変異のない 11q23 転座型細胞株について、PKC412 添加後のアポトーシス誘導機序を、ROS 以外にも、ESR (ER stress response) signaling pathway を構成する PERK/eIF2 α 、IRE1 などとの関連性について、または caspase 非依存性経路である PARP-1—AIF 経路との関連性について、さらに解析していく予定である。

(3) 連携研究者
なし

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和也 (TAKAHASHI KAZUYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：30422687

(2) 研究分担者

なし