

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17377

研究課題名（和文）IDH1-NPM1変異急性骨髄性白血病マウスを用いた化学療法抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of drug resistance acquired after chemotherapy in IDH1-NPM1 mutant AML

研究代表者

阪本 貴士（Sakamoto, Takashi）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70866582

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）：予後不良遺伝子異常を併存しないNPM1変異AMLは予後良好群に属するが、いったん完全寛解に到達した後に再発を来す症例も多く、長期予後は満足できるものではない。Idh1-Npm1変異ダブルノックインAML移植マウスに対して、標準的化学療法レジメンを模したアントラサイクリン+シタラピンによる併用化学療法群は生存延長効果を示したが、各薬剤単剤での治療群は生存延長効果が認められなかった。AMLが化学療法抵抗性を獲得するメカニズムを解明するため、併用化学療法群マウスにおいて一旦治療により減少したのちに再増殖してきたAML細胞を回収することができ解析に呈する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Idh1-Npm1変異ダブルノックインAML移植マウスモデルに対するin vivo治療実験により、アントラサイクリン+シタラピンによる併用化学療法が、各薬剤単剤による治療より優れていることが示された。同AML細胞へのin vitroでの薬剤処理実験でもシタラピンよりアントラサイクリンの感受性が良好であることも示唆された。同AML細胞にとってはアントラサイクリンがKey drugかもしれない可能性が示唆され、さらなる検証が必要である。AML細胞が有している遺伝子変異によって薬剤感受性が大きく異なる可能性があり、サブタイプに特異的に治療を検証する重要性が改めて考えられた。

研究成果の概要（英文）：We stratify NPM1-mutant AML as favorable risk, unless it is concurrent with other gene lesions suggesting poor prognosis. But, it sometimes relapses soon after it reaches complete remission by chemotherapy, and its long-term survival still needs to be improved. We treated transplant Idh1-Npm1 double knock-in AML model mice with anthracycline and/or cytarabine, which are commonly used in clinic for remission induction chemotherapy. We observed survival elongation in mice treated with combination of anthracycline and cytarabine, but no significant efficacy in mice treated with each single agent. We collected AML cells from the chemo-treated mice in which AML was reduced by chemotherapy once but soon expanding, and will analyze them in order to unveil the mechanism by which AML acquires resistance against chemotherapy,

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 化学療法抵抗性 疾患モデルマウス IDH1 NPM1

## 1. 研究開始当初の背景

NPM1 は急性骨髄性白血病 (AML) で約 30% と最も高頻度に変異を認める遺伝子の一つであり、良好な予後に関連するとされる。さらに、IDH 変異と NPM1 変異を共に有する正常核型 AML は、予後良好であることが報告されている (Patel JP, et al. NEJM 2012)。Favorable risk 群 AML の標準的治療は、第一寛解期での同種造血幹細胞移植は行わず、既存の殺細胞的薬 (アントラサイクリン、シタラビン) が主体である。しかし一旦寛解した後に薬剤抵抗性クローンを源に再発を来す症例も多く、長期予後は満足できるものではない。化学療法プロトコルを改良すること、また化学療法抵抗性クローン出現のメカニズムを解明することは必須の課題である。

## 2. 研究の目的

申請者は、IDH1<sup>R132</sup> 変異体と NPM1c 変異体とのダブルコンディショナルノックインマウスが、高率に AML を発症することを見出した。IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 骨髄細胞が wild type と比べて、アントラサイクリン感受性が良好である一方で、シタラビン感受性は同等であることを、in vitro colony formation assay で明らかにした。本研究では、同 AML マウスモデルにおけるアントラサイクリンおよびシタラビンの効果を、in vivo で比較検証する。また、薬剤抵抗性 AML クローンをマウス体内で誘導し解析することにより、化学療法抵抗性獲得の機序を解明する。これらの知見をもとに、化学療法の最適化、化学療法抵抗性クローン出現を妨げるような新規治療戦略の開発につなげることを目指す。

## 3. 研究の方法

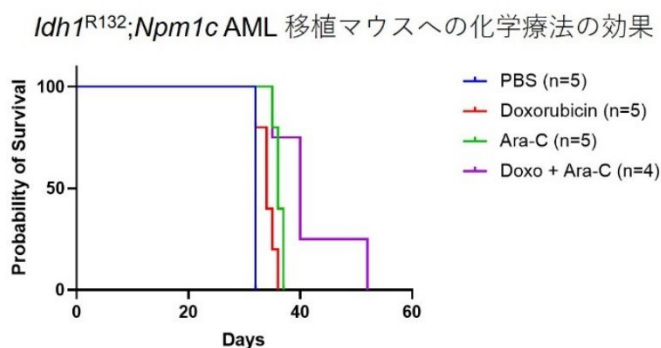
私が留学中に確立した IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 変異ダブルノックイン AML マウスモデルは、その骨髄細胞を放射線照射レシピエントマウスに移植することにより、多数個体の移植 AML マウスを作成することができる。化学療法感受性が良好であることが予想されるこの AML マウスモデルを用い、実臨床で化学療法の主力となっているアントラサイクリンおよびシタラビンの効果を、個別に評価する。この in vivo 治療実験において、化学療法によりマウス体内で AML 細胞が一旦減少するが、その後しばらくすると再増殖してくることが予想される。化学療法後に再増殖してくる AML 細胞は、化学療法施行前の AML に比べ化学療法抵抗性を有するクローンが選択されている可能性があり、実臨床において AML 細胞が化学療法抵抗性を獲得する過程を模倣するマウスモデルと考えられる。この AML 細胞を回収し解析する。

## 4. 研究成果

### (1) IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c ダブルミュータント AML 移植マウスへの化学療法実験最適化

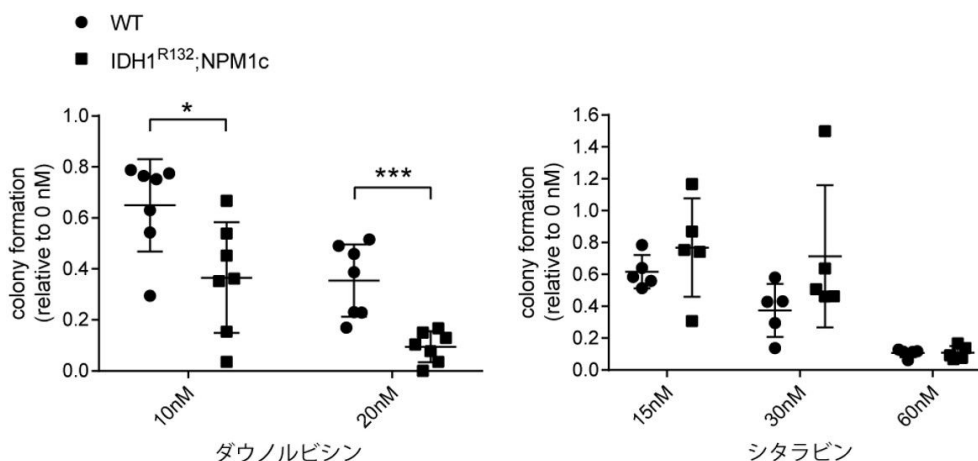
申請者らが確立した IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 変異ダブルノックイン AML マウスモデルは、その骨髄細胞を放射線照射レシピエントマウスに移植することにより、多数個体の移植 AML マウスを作成することができる。AML 細胞を移植するためのレシピエントマウスには放射線照射が必要だが、その放射線照射量を最低限にとどめべく最適化実験を行い、2Gy まで減らしても移植 IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 変異 AML マウスモデルを作出できることを確認した。

### (2) 各殺細胞性抗癌剤の IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c ダブルミュータント AML 移植マウスに対する in vivo での治療効果の比較



Doxo + Ara-C 併用療法で AML マウスへの生存延長効果が認められ、一方 doxorubicin あるいは Ara-C 単剤では生存延長効果がごくわずかであった。

IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 変異ダブルノックイン AML 移植マウスに対して、標準的化学療法レジメンを模倣したアントラサイクリン + シタラビンによる併用化学療法群は生存延長効果を示したが、各薬剤単剤での治療群は生存延長効果が認められなかった (図)。ここでは、AML 細胞移植前の放射線照射による骨髄抑制に化学療法による骨髄抑制が加わることで強度の血球減少を生じてしまい、それが原因で死に至ってしまう個体が一定数認められたという、実験系の限界という要因も加わっていると考えられた。In vitro での colony formation assay で、IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c 骨髄細胞が wild type マウスの骨髄細胞と比べて、アントラサイクリン感受性が良好だがシタラビン感受性は同等であるという結果も得られており (図)、in vivo 治療実験で、アントラサイクリン vs シタラビンの効果を比較検証したいところだが、より実験系を洗練化する必要がある。



In vitro での colony formation assayにて、IDH1<sup>R132</sup>;NPM1c骨髄細胞は、ダウノルビシン (アントラサイクリン) は感受性良好だが、シタラビン感受性は同等であった

### (3) 化学療法抵抗性獲得機序の探索

当初の計画は、アントラサイクリンおよびシタラビン各々の薬剤耐性を研究する計画であったが、上述のとおり、(2)での実験で、単独の薬剤では AML マウスに十分な生存延長効果をもたらさなかったことから、2 剤併用治療のもとで誘導された化学療法耐性を解析する方針に変更した。無治療群マウスから回収した AML 細胞と、併用化学療法群マウスにおいて一旦治療により減少したのちに再増殖してきた AML 細胞を回収することができ、解析に呈する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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