

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17380

研究課題名（和文）t(8;21)白血球異質的抗原IL-5Raを介した白血病発症機構の解明と治療応用

研究課題名（英文）IL-5Ra as a potential therapeutic target for t(8;21) AML

研究代表者

島 隆宏 (Shima, Takahiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30869706

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）：最も頻度の高い染色体異常であるt(8;21)を伴う急性骨髄性白血病(AML)は予後良好群に分類されるが、再発率は決して低くはなく、より有効な治療の開発が求められる。t(8;21)AMLにおける機能的分子マーカーとしてIL-5Raを提唱するとともに、IL-5Ra抗体を用いたt(8;21)AMLの新規治療法の可能性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的には「予後良好群」に分類されるt(8;21)AMLであるが、化学療法のみでは再発率が3割程度と、決して「良好」な治療成績ではない。またt(8;21)AMLの化学療法後の再発は非常に治療抵抗性であり既存の化学療法のみでは予後が不良であることが知られている。そのためt(8;21)AMLの治療成績を向上させるためにも、新規治療標的や治療法の開発が必要である。本研究はt(8;21)AML特異的な機能的分子マーカーを同定し、新規治療法の開発への可能性を示したという点で社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：t(8;21) acute myeloid leukemia (AML), which is the most frequent chromosomal abnormality observed in AML cases. Although t(8;21) AML is generally classified as a AML with favorable risk, the relapse rate remains significant. Therefore, the development of more effective treatments is required. In this study, we proposed IL-5Ra as a functional molecular marker in t(8;21) AML and explored the possibility of a novel therapeutic approach using IL-5Ra antibodies.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：t(8;21) AML IL-5Ra 分子標的

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AML(急性骨髄性白血病)細胞は全白血病細胞中のごく一部を占める AML 幹細胞に由来する。AML 幹細胞の成立には造血幹細胞への複数の遺伝子異常の蓄積が必要であり、これらの遺伝子異常は少なくとも Class I と Class II の 2 種類に分類される。Class I 変異は FLT3 変異、KIT 変異などのチロシンキナーゼの恒常的活性化を介して増殖/生存能の強化を造血幹細胞に付与する変異であり、Class II 変異は AML1-ETO に代表される血球分化を障害する変異である。複数のマウスモデルにて Class I 異常と Class II 異常が協調的に働き AML が発症することが実験的に示されている。しかしこのような AML 幹細胞の成立過程はヒト AML において十分には明らかにされておらず AML 根絶治療開発のためには生体内における AML 幹細胞の特性の理解および AML 幹細胞を標的とした治療法の開発が必要である。

AML1-ETO は AML の中で最も高頻度の染色体異常である t(8;21)転座により形成される AML 融合遺伝子である。造血幹細胞に AML1-ETO を強制発現させると、骨髄球系細胞分化に関連する遺伝子の転写活性がドミナントネガティブに阻害され、造血幹細胞・前駆細胞の分化が抑制される。実際マウスにおいて AML1-ETO ノックイン/トランスジェニックのいずれのマウスも AML を発症しない。しかしこれらのマウスに Class I 変異をさらに導入すると AML を発症する。これらの研究から t(8;21)AML の発症には AML1-ETO の獲得のみでは不十分であり、Class I 変異の獲得もしくはそれに相当するシグナルの増強が必要と考えられている。

一方、近年の大規模な網羅的遺伝子変異解析の結果、他の AML と比して t(8;21)AML は重複する遺伝子変異数が有意に少ないことが明らかとなった。興味深いことに t(8;21)AML においては、AML 発症に必須とされる Class I 変異は約半数の症例には認められず、t(8;21)AML 発症機構・治療抵抗性獲得機序の解明および新規治療法の開発を困難なものにしている。

2. 研究の目的

t(8;21)AML 幹細胞が IL-5 シグナルを利用して AML 細胞の生存、維持を制御するという新規 t(8;21)AML 発症機構のメカニズム解析を行うことを目的とする。さらに抗 IL-5Ra 抗体が t(8;21)AML に対する新たな分子標的治療薬になりうるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の 3 点を主たるテーマとした実験系によって構成される。①:ヒト t(8;21)AML 幹細胞における IL-5Ra の高発現の確認、②:AML 細胞に発現する IL-5Ra およびそのリガンドである IL-5 を介したシグナルが AML 幹細胞に及ぼす生物学的特性に及ぼす影響の確認、そして③:t(8;21)AML の治療標的としての IL-5Ra の有用性の検証である。①に関しては正常造血幹細胞と t(8;21)AML 幹細胞 RNA-seq データを用いて Ingenuity Pathway Analysis を行い、t(8;21)AML 幹細胞における Th2 パスウェイの亢進を見出すと共に、種々の AML における遺伝子発現 public database から t(8;21)AML における IL-5Ra の高発現を確認する。②に関しては細胞株、患者検体(免疫不全マウスへの異種移植を含む)を用いて IL-5 のサイトカイン投与が AML 細胞の生存・増殖に与える影響を確認する。③に関しては細胞株、患者検体(免疫不全マウスへの異種移植を含む)に IL-5Ra 抗体を用いて、治療薬の可能性の検討を行なった。

4. 研究成果

(1) t(8;21)AML 患者 50 例の遺伝子発現データを集積し、他のサブタイプの AML と IL-5Ra の遺伝子発現量(RNA-seq)を比較したところ t(8;21)AML における IL-5Ra の高発現が確認された。実際、AML および正常造血幹細胞 5 症例ずつを用いて IL-5Ra タンパクの発現量を比較(Western-blot)したところ、やはり t(8;21)AML 特異的に IL-5Ra の高発現を認めた。

(2) 上記 t(8;21)AML 患者 50 例の遺伝子発現データ(RNA-seq)を Ingenuity Pathway Analysis にて解析を行なったところ、IL-5 シグナルの一つである Th2 パスウェイの亢進を見出した。このことから t(8;21)AML における IL-5Ra 発現は機能的マーカーとして用いられる可能性が考えられた。

(3) IL-5 が t(8;21)AML の leukemogenesis に関与しているかを確認するために、t(8;21)AML に IL-5 を添加したうえでの細胞増殖の確認を試みた。一般的に t(8;21)AML の研究で用いられる Kasumi-1 および SKNO-1 は残念ながら IL-5Ra 発現(遺伝子、タンパクともに)自体を認めなかったため、臨床検体のみでの実験をおこなった。臨床検体の保存条件などの影響もあり viability 自体が不良なものも多いため in vitro での正確な評価が困難であったが、t(8;21)AML 検体 20 例中少なくとも 8 例で IL-5 添加によって細胞増殖の増加と死細胞率の低下を認めた。しかしながら統計学的有意差を出すことはできなかった。そのため in vivo の実験系として免疫不全マウスを用いた異種移植による解析を試みた。一方、原因は未だ不明であるが以前より CBF 白血病である t(8;21)AML および inv(16) AML は異種移植が非常に困難であることが知られている。そこで本研究では我々の研究室で開発した高度免疫不全マウス(BRGS-NOD マウス)を用いて異種移植を試みた。しかし、異種移植をおこなった 20 検体のうちヒト t(8;21)AML 細胞の正着が確認されたものがわずか 3 例であった。この 3 例においては IL-5 サイトカイン刺激で AML 細胞の増加が認められたが、前述のように正着症例数が少なく、IL-5 が t(8;21)AML の生存や増殖シグナルを強化しているという結論を出すには、更に異種移植成功例を増やすことが必要である。一方で、そもそも異種移植が困難とされる t(8;21)AML の異種移植システムの向上も必要と考え、こちらに関しては別途研究課題として実験を行う方針とした。

(4) 臨床的に使用されている IL-5Ra 抗体(benralizumab)が IL-5Ra 陽性 t(8;21)AML の治療薬としての可能性を検証するために t(8;21)AML 8 例の白血病細胞に benralizumab を添加し、細胞生存率を Annexin-V および PI にて検証した。すると control と比して有意に benralizumab 投与群で細胞生存が抑制されることが明らかとなった。

(5) 同様に t(8;21)AML における IL-5Ra 抗体の治療効果を in vivo を用いて検証した。上記(3)と同様に 20 例の患者検体を用いて異種移植を行い、その後 IL-5Ra 投与を行なってその治療効果(白血病抑制効果)を検証した。20 例のうち全例で移植後に白血病細胞が免疫不全マウスの骨髄中に検出されなかったが、前述のように白血病細胞の正着率が低く、正確な評価が困難である。そこで白血病細胞のマウスへの正着が確認できた 3 例において白血病細胞

のマウスへの正着確認後に IL-5Ra 抗体を投与したところ、3 例とも著明な白血病細胞の抑制効果が認められた。このことから IL-5Ra 抗体は t(8;21)AML の治療薬となる可能性が示唆された。今後、前述のように異種移植モデルの改良などを加え、症例数を増やして IL-5Ra 抗体の治療効果を明確にする予定である。

(6) IL5Ra 陽性の t(8;21)AML 幹細胞と正常造血幹細胞の遺伝子発現比較により(RNA-seq)IL-5Ra 以外に TP53 や BRCA1/2 といった DNA 複製に関与する遺伝子発現が AML で有意に低下していた。実際、t(8;21)AML 細胞に IL5 刺激を加えると、DNA 複製関連遺伝子の有意な抑制が認められた。このことから t(8;21)AML では IL5 シグナルを介して DNA 複製関連遺伝子を抑制させ、ゲノム不安定性を誘導することで、白血病の病態形成に関与している可能性が考えられた。この IL5 シグナルと DNA 複製関連遺伝子の直接的な関与(パスウェイ)が直接的なのか間接的なものなのかについては更なる研究が必要と考える。

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