

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790908

研究課題名（和文）慢性骨髄性白血病幹細胞の解明と新規分子標的治療剤の基礎研究

研究課題名（英文）Analysis and basic research of targeted therapy for CML stem cells

## 研究代表者

南 陽介 (MINAMI YOSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：60513752

研究成果の概要（和文）：Ph<sup>+</sup>白血病の治癒の為に白血病幹細胞を適切に同定し、それらを標的とした治療が必要である。BCR-ABL 陽性細胞は、イマチニブ投与後、CML 治療効果良好群においても、幹前駆細胞分画により多く残存していたが、第2世代 ABL キナーゼ阻害剤においては、有意な差異は認められなかった。免疫不全マウス Ph<sup>+</sup>白血病モデルにおいて、イマチニブ処理後 CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>分画でより残存傾向を示したが、mTOR 阻害剤（エベロリムス）の併用は有意に減少させ、次世代 PI3K-mTOR シグナル阻害剤 BEZ-235 についても、静止期分画を含めた細胞死誘導効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Several mathematical models and *ex-vivo* examinations suggested that imatinib (IM) therapy does not eradicate BCR-ABL-positive leukemia stem cells (LSCs). In optimal responders to IM therapy, *BCR-ABL* transcripts in the HSC population tended to be more retentive than other populations. Treatment with the second-generation of ABL-tyrosine kinase inhibitors (2nd TKIs) induced more rapid reduction of *BCR-ABL* transcripts even in the HSC population. In Ph<sup>+</sup> leukemia cells serially xenotransplanted into immunodeficient NOG mice, slow-cycling CD34<sup>+</sup> cells were insensitive to IM. From comprehensive drug screening of other small compounds using this co-culturing system, we found that inhibitors of PI3K/AKT/mTOR-axis signaling, including rapamycin, were promising candidates. *In vitro* and *in vivo*, combination treatment with IM and rapamycin analogue, everolimus (RAD001), induced substantial cell death in the slow-cycling CD34<sup>+</sup> population with p70-S6K dephosphorylation. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235 (BEZ), also induced substantial cell death including slow-cycling CD34<sup>+</sup> cells at lower doses.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病・幹細胞・キナーゼ阻害剤・BCR-ABL・mTOR シグナル

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病（CML）慢性期に対し、ABL キナーゼ阻害剤イマチニブは、高率な細胞遺伝学的寛解をもたらした第1選択薬として確立された（*N Engl J Med* 355, 2004）が、残存腫瘍の評価法や休薬を含めた薬剤の投与期間についてのコンセンサスは未だ確立されておらず、進行期 Ph<sup>+</sup>白血病に対する効果は一時的なものである。急性骨髄性白血病では、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞分画内に LSCs が存在する（*Nature Med* 3, 1997）とされるが、CML においても LSCs を解析することによって、現行の検査方法で検出感度以下の症例に対しても残存腫瘍を定量化できる可能性が示唆されている。申請者らはこれまで、CML 急性転化期における LSCs を同定した（*N Engl J Med* 351, 2004）UCSD がんセンターの Catriona Jamieson 博士らとの共同研究により、*in vivo* およびストローマ共培養を用いた *ex vivo* の両方において解析可能な Ph<sup>+</sup>白血病幹細胞モデルを樹立する（*Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2008）とともに、UCSD におけるマルチカラー・FCM の解析プロトコルを名古屋大学

血液内科の実験施設に導入することによって、イマチニブ治療後慢性期 CML 患者骨髄細胞の幹細胞分画における腫瘍細胞の残存を明らかにした（*Int J Hematol* 88, 2008）。現在、関連施設からの検体提供をもとに、臨床共同研究を発展進行中である。また、ヒト Ph<sup>+</sup>白血病細胞移植マウスモデルの確立にも精力的に取り組み、これらの利点を融合した系を用いた新たな治療法の研究・開発を進めている。

2. 研究の目的

近年の白血病研究において、少数の白血病幹細胞（leukemia stem cells; LSCs）が、正常細胞に類似した分化過程を経て多彩な腫瘍組織を生み出すことや、従来の治療法に対して耐性であることが示されつつある。BCR-ABL 陽性（Ph<sup>+</sup>）白血病に対して、ABL キナーゼ阻害剤を用いた効果的な治療法が第1選択となったが、治癒の為には LSCs を適切に同定し、それらを標的とした選択的な細胞死誘導が可能となる治療が必要であると考えられている。本研究は、マルチカラー・

フローサイトメトリー (FCM) を用いて、ABL キナーゼ阻害剤治療経過中の臨床検体における LSCs のバイオマーカーを確立し、その特性を明らかにするとともに、免疫不全マウス (NOG・NOD マウス) に移植・継代するヒト造血系を反映した白血病幹細胞モデルを用いて、LSCs 標的治療の開発に繋げる広義のトランスレーショナル・リサーチを目的としている。

### 3. 研究の方法

臨床研究室における環境を最大限に生かし、

(1) (より臨床に近いフェーズ) と (2) (より基礎に近いフェーズ) を同時に進めることで、双方向的トランスレーションから得られる相補的な効果を期待する。

(1) マルチカラー・FCM とリアルタイム定量 PCR 法を用いて、第 2 世代 ABL キナーゼ阻害剤治療 CML 症例の LSCs に対する効果を解析する。ダイレクトシーケンス法 (およびインベーター法) を併せ、ABL キナーゼ領域における遺伝子変異の幹・前駆細胞における分布を検討する。(2) NOD・NOG マウスを用いてよりヒト造血系を反映した LSCs マウスモデルを構築し、*ex vivo* ストローマ共培養法を組み合わせることによって、mTOR 阻害剤等の LSCs を標的とした作用を検討する。更に、標準阻害剤キット (文科省がん特・化学療法基盤情報支援班から供与済み) を用いて、新規候補薬剤のスクリーニングを行なう。

### 4. 研究成果

関連施設との共同・前向き研究によって、イマチニブおよび第 2 世代 ABL キナーゼ阻害剤 (ダサチニブ・ニロチニブ) 治療開始前および経過中 (0, 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月, 更に長期投与後) の幹・前駆細胞分画における *BCR-ABL* 遺伝子のリアルタイム定量 PCR を行

なった。*BCR-ABL* 陽性細胞は、イマチニブ投与後、治療効果良好群においても、幹前駆細胞分画により多く残存する傾向が認められたのに対し、第 2 世代 ABL キナーゼ阻害剤においては、残存に有意な差異は認められなかった (*Leukemia*, *in press*)。

免疫不全マウスへ異種移植した  $Ph^+$  白血病細胞をモデルに、その残存メカニズムと克服治療について検討した。*Ex vivo* でのイマチニブ処理実験では、 $CD34^+38^-$  分画でより残存傾向を示した。この分画では *BCR-ABL* のリン酸化は抑制されていたが、静止期細胞が多く、これが耐性に関わる可能性が示された。*PI3K-AKT-mTOR* シグナルは幹細胞の生存・維持に重要であることが報告されており、mTOR 阻害剤 (エベロリムス) の併用は *ex vivo* および *in vivo* において有意に白血病の増殖を抑制することを示し (*Blood Cancer J* 1, 2011)、次世代 *PI3K-mTOR* シグナル阻害剤 *BEZ-235* についても、静止期分画を含めた細胞死誘導効果について明らかにした。

### 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 13 件)

- 1) Retention of  $CD34^+$  CML stem/progenitor cells during imatinib treatment and rapid decline after treatment with second-generation *BCR-ABL* inhibitors Y Minami, A Abe, M Minami, K Kitamura, J Hiraga, S Mizuno, K Yamamoto, M Sawa, Y Inagaki, K Miyamura, and T Naoe *Leukemia*, 査読有, *in press*, 2012
- 2) Treatment with mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance

to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells

Y Kuwatsuka, M Minami, Y Minami, K Sugimoto, F Hayakawa, Y Miyata, A Abe, DJ Goff, H Kiyoi and T Naoe

*Blood Cancer J*, 査読有, 1 (e17), 2011

3) Expanded distribution of the T315I mutation among hematopoietic stem cells and progenitors in a chronic myeloid leukemia patient during imatinib-treatment

Y Minami, T Kajiguchi, A Abe, T Ohno, H Kiyoi and T Naoe

*Int J Hematol*, 査読有, 92 (4): 664-666, 2010

[学会発表] (計 16 件)

1) Retention of slow-cycling CD34<sup>+</sup> cells during imatinib treatment and rapid decline after 2nd ABL-TKI treatment in Ph<sup>+</sup> leukemia cells

Y Minami, A Abe, M Minami, Y Kuwatsuka, N Fukushima, K Kitamura, J Hiraga, K Yamamoto, C Jamieson, and T Naoe

*53rd ASH meeting* (Oral presentation), San Diego, USA, 2011

2) Treatment with the PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235 overcomes resistance to imatinib in quiescent or T315I-mutated Ph-positive leukemia

Y Minami, M Minami, N Fukushima, Y Kuwatsuka, and T Naoe

*53rd ASH meeting* (Poster presentation), San Diego, USA, 2011

3) Treatment with mTOR inhibitors,

everolimus and BEZ235 overcomes resistance to imatinib in BCR-ABL-positive leukemia quiescent cells  
南陽介 鍬塚八千代 南美帆 直江知樹  
第9回日本臨床腫瘍学会総会 (シンポジウム)、横浜、2011年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南陽介 (MINAMI YOSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号: 60513752

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし