

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591537

研究課題名(和文) 骨髄微小環境下における AML 幹細胞のチロシンキナーゼ阻害剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the resistant mechanism of AML stem cells for tyrosine kinase inhibitor in bone marrow microenvironment

研究代表者

嶋田 明 (SHIMADA, AKIRA)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70391836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)のチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)への耐性機構は不明である。間葉系細胞(MSC)との共培養系でさらにTKI耐性となり、AML細胞が直接接着するほうが、浮遊しているよりもより薬剤耐性であった。その原因として接着因子であるintegrinや種々のサイトカイン、ケモカインが影響し、AKT, MAPK, JAK/STAT系などが活性化されていた。またMSCとの共培養を4週間ほど続行すると、side population分画が増加し、薬剤耐性を示していた。これを乗り越えるのに、TKIにPI3K/mTOR/AKT阻害剤ないしJAK/STAT阻害剤の組み合わせが有望と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of drug resistance for Tyrosine kinase inhibitor (TKI) in AML cells remains unknown. AML cells showed the drug resistance in coculture model with mesenchymal stroma cells(MSCs). AML cells became more resistant for TKI in direct contact with MSC than in floating condition. For this reason, adhesion molecule such as integrin, or several cytokines and chemokines affected the up-regulation of AKT, MAPK and JAK/STAT signaling pathway. When AML cells were cocultured with MSC for more than 4 weeks, the fraction of side population increased and showed TKI resistance. To overcome this drug resistance, we found the synergistic effect in TKI with PI3K/mTOR/AKT inhibitor or in TKI with JAK/STAT inhibitor.

研究分野：小児血液腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：AML TKI MSC drug resistance 抗メチル化薬 HDAC阻害剤

#### 1. 研究開始当初の背景

小児急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) は近年 5 年粗生存率 70% 前後と、治療成績の大幅な向上がみられているが、現行の化学療法と移植の組み合わせによる治療の強化はほぼ限界に近いと考えられ、新規薬剤による治療成績の向上が望まれている。ここ数年、慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) に対するチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) である Imatinib の成功に触発され、AML の FLT3 や KIT などの receptor tyrosine kinase を阻害する TKI の治験が欧米で進行中であるが、比較的早期に耐性化がみられ、海外の臨床試験でも TKI 単剤での明らかな有効性は示されていない。

#### 2. 研究の目的

小児 AML のさらなる治療成績の向上を目指して、TKI 耐性機構の解明と新規薬剤の検討を行う。

#### 3. 研究の方法

1) 骨髄微小環境の薬剤耐性への関与が考えられたため、通常の浮遊細胞培養系以外に、骨髄ストローマ細胞 (Mesenchymal stroma cell, MSC) との共培養系による MTT アッセイや apoptosis を測定した。また各種サイトカイン/ケモカインの測定や、細胞内蛋白のリン酸化の測定を行った。

2) 現在 TKI が臨床応用されている CML や Ph-ALL でも検討を行い、その TKI 耐性メカニズムとそれを乗り越える新規薬剤の組み合わせの検討を行った。

3) また TKI 以外にも有望な新規薬剤の検討を行った。

#### 4. 研究成果

1) Mesenchymal stroma cell (MSC) との共培養系では AML 細胞株と AML 患者検体ともに薬剤耐性が起こることを MTT アッセイと apoptosis の系で見出した。MSC に白血病細胞が直接接着するほうが、浮遊しているよりもより薬剤耐性となることを示し、その原因として接着因子である integrin や種々のサイトカイン、ケモカインが影響しているものと考えられた。MSC の影響により AKT, MAPK, JAK/STAT 系などが活性化されていた。また MSC との共培養を 4 週間ほど続行すると、side population 分画が増加し、薬剤耐性を示していた。共培養によりより未分化と考えられる細胞集団が増加することも薬剤耐性の一因と考えられ、白血病幹細胞の薬剤耐性への関与が示唆された。

2) AML 細胞株の MV4-11, THP1, U937 を使って、TKI と PI3K/mTOR/AKT 阻害剤との組み合わせにシナジー効果があるこ

とを MTT アッセイと apoptosis の系で見出した。これは PI3K/mTOR の dual inhibitor である PI103 や NVP-BEZ235 により顕著で、MSC との共培養系でもシナジー効果がみられた。

3) CML 細胞株 K562 と AML 細胞株 MV4-11 で TKI と JAK/STAT 阻害剤のシナジー効果を確認した。K562 では Imatinib, Dasatinib, Nilotinib とともに JAK/STAT 阻害剤である Cui とシナジー効果を示し、MV4-11 では Sorafenib, Sunitinib, PKC412 とともに Cui とシナジー効果を示した。他の JAK 阻害剤で、Tofatinib が臨床応用可能となっており、Tofatinib とのシナジー効果も確認された。

4) AML, CML 細胞株で TKI を 3 ヶ月間添加し濃度依存的に TKI 耐性株を作成したが、FLT3 や ABL に新たな変異はみられなかったが、NRAS の codon12 変異を新たに獲得した細胞株を創出した。また経過中巨細胞が出現し、mitotic catastrophe を起こしている可能性が示唆された。この現象については、Imatinib を 10 年以上にわたり長期に使用した CML 患者で myelodysplastic syndrome (MDS) 様病態を呈したり、染色体異常がみられる症例もあり、mitotic catastrophe がその一因となっているものと考え、さらに研究を進めている。

#### 5) Ph-ALL のチロシンキナーゼ阻害剤耐性メカニズムの検討

現在本邦において AML に対して TKI の投与は実際には行われていない。一方 CML 以外には Ph-ALL で実際にグリベックなどの TKI の投与が行われ、治療成績の向上につながっている一方、TKI に耐性な患者も存在する。我々は過去の小児 Ph-ALL 患者 4 名 (内再発 3 名含む) について調べたところ、初発時はいずれも変異を有しておらず、再発時も TKI を投与されていない患者では変異はみられず、長期に TKI を使用した患者のみに変異がみられ、imatinib, dasatinib, nilotinib の TKI 3 剤に対して耐性であった。この患者の ABL 遺伝子について調べたところ複数の変異を継時的に獲得していったものと考えられた。AML でも TKI を使用した場合、同様に耐性化が起きるものと考えられた。

#### 6) AML 細胞におけるメチル化解析と抗メチル化薬の適応について

AML 細胞に対する抗メチル化薬の効果は成人、小児ともに未だ定まっていない。海外の報告では移植後再発例や、強力な化学療法の続行が不可能な老人で投与が行われ、一部の患者で効果が得られている。複数の AML 細胞株で抗メチル化薬である 5-azacitidine (5-Aza) や 5-aza-2-deoxycitidine (dacogen) の IC50 を調べたが、 $\mu\text{M}$  単位と高値であった。

1997 年 2011 年までに岡山大学病院小児科

で治療された AML 患者 13 名の初発時、寛解時、再発時検体 (3 名) を用いて MLPA 法で計 24 個の癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行った。7 名 (53.8%) の初発時検体でメチル化が認められた [平均 2.4 個 (1-5)], cadherin13(CDH13)、cyclin dependent kinase inhibitors 2B(CDKN2B)、cell adhesion molecule 1(CADM1)、estrogen receptor 1(ESR1)、p73 tumor protein(TP73) など]。これは寛解期検体や正常コントロール検体ではいずれもメチル化が認められなかった。再発の 3 例については初発時と同様のメチル化がみられるものと、消失しているものに分かれていた。これまでの報告でもこれらのがん抑制遺伝子は予後との関連が示唆されていた。また複数の AML 細胞株でもこれらの遺伝子のメチル化が確認されている。このため AML のメチル化に関しては、高メチル化している特定の subgroup の同定が重要と考えられた。またこれまでの海外の臨床試験からも抗メチル化薬単剤では難しく、HDAC 阻害剤 (Histone deacetylase) や TKI との併用が有望との報告がみられる (Tan P, et al. Blood. 2013)。今後さらに検討を進めていく予定である。

#### 7) AML 治療の新規候補薬剤の検討

6 種類の AML 細胞株 (MV4-11, THP1, U937, HL60, ML2, OCI-ML3) を用いて、HDAC 阻害剤、抗メチル化薬、proteasome 阻害剤、HSP90 阻害剤などの新規候補薬剤の検討を MTT アッセイや、Apoptosis assay にて行った。HDAC 阻害剤 (depsipeptide) は IC50 が 1-13nM、proteasome 阻害剤 (bortezomib) は IC50 1-8nM と有意に低い値を示したが、HSP90 阻害剤である 17-AAG は細胞株によってばらつきがみられた。

HDAC 阻害剤として depsipeptide の他に、現在抗てんかん薬として臨床応用されているバルプロ酸と抗癌剤 cytarabine (AraC) との相乗効果を調べたが、相乗効果は認められなかった。主に難治性 Hodgkin 病や多発性骨髄腫で有効性が認められている LBH589(panobinostat) の AML 細胞株での IC50 は 40-100nM であった。最近 panobinostat と CyA や daunorubicin の相乗効果を示唆する報告も見られ、今後検討していく予定である (Xie C, et al. PLoS One. 2013)。

8) この他 AML の分子標的を探すべく種々の遺伝子解析を行った。

最近難治性 AML の代表である FLT3-ITD 陽性 AML でも、第一寛解に入れば移植の成功率は 70% まで達する一方非寛解では移植でほぼ救済できないことが、日本の研究でも明らかとなった (Shimada A. et al ASH Annual meeting 2013)。このため寛解導入に関して新たな薬剤の導入が望まれ、TKI の他に JAK 阻害剤、抗メチル化薬や HDAC 阻害剤が考え

られ、さらに研究を進める予定である。

#### 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 12 件)

1. Aoe M, Shimada A, Muraoka M, Washio K, Nakamura Y, Takahashi T, Imada M, Watanabe T, Okada K, Nishiuchi R, Ishida T, Miyamura T, Chayama K, Shibakura M, Oda M, Morishima T. ABL kinase mutation and relapse in 4 pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cases. *Int J Hematol*. 2014;99:609-15, doi: 10.1007/s12185-014-1565-3. (査読有)
2. Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horibe K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol*. 2014;99:169-174, doi: 10.1007/s12185-013-1495-5 (査読有)
3. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol*. 2013 98:578-588, doi: 10.1007/s12185-013-1429-2. (査読有)
4. Sano H, Shimada A, Tabuchi K, Taki T, Murata C, Park MJ, Ohki K, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Ichiro Tsukimoto I, Hayashi Y. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group *Int J Hematol*, 2013; 98:437-445, doi: 10.1007/s12185-013-1409-6, (査読有).
5. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia*. 2013; 27:2413-2416, doi:

- 10.1038/leu.2013.153 (査読有)
6. Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group *Int J Hematol* 2012; 96: 469-76, doi: 10.1007/s12185-012-1163-1 (査読有).
  7. Imamura T, Iwamoto S, Kanai R, Shimada A, Terui K, Ohsugi Y, Kobayashi R, Tawa A, Kosaka Y, Kato K, Hori H, Horibe K, Oda M, Adachi S, for the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS). Outcome in 146 patients with pediatric acute myeloid leukemia treated with AML99 protocol in the period 2003-2006 in Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS). *Br J Haematol* 2012; 159: 204-10, doi: 10.1111/bjh.12030 (査読有).
  8. Taga T, Saito M. A, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H, Koh K, and Adachi S. Clinical Characteristics and Outcome of Refractory/Relapsed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome *Blood*. 2012; 120:1810-5, doi: 10.1182/blood-2012-03-414755 (査読有).
  9. Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by t(16;21)(q24;q22) *Int J Hematol*. 2012; 95:577-80, doi: 10.1007/s12185-012-1044-7 (査読有).
  10. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: A study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group *Int J Hematol*. 2012;95:509-15, doi: 10.1007/s12185-012-1033-x (査

読有)

11. Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012, 156:413-4, doi: 10.1002/gcc.22064 (査読有)
12. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukemia *Br J Haematol* 2012;156:316-25, doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08948.x (査読有)

#### 〔学会発表〕(計 7 件)

1. Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, et al. Poor prognosis with different induction rate was observed in children with acute myeloid leukemia and FLT3-ITD according to the ITD/WT allelic ratio: a result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. ASH Annual Meeting (2014/12/6-9) New Orleans, USA
2. Aoe M, Shimada A, Muraoka M, et al. Analysis of ABL kinase mutation in 4 pediatric philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. 日本血液学会 (2014/10/11-13) 札幌
3. Shimada A, Kinoshita A, Manabe A, et al. Chemotherapy prior to HSCT is effective for pediatric RAEB/RAEB-T. 日本血液学会 (2014/10/11-13) 札幌
4. Muraoka M, Shimada A, Watanabe T, et al. Persistent Chromosomal Abnormalities in Ph-negative cells during Imatinib Therapy - a CML case 日本血液学会 (2014/10/11-13) 札幌
5. 嶋田 明, 小島勢二、小児の骨髄増殖性疾患(MPN) PV/ET/CMML/HES/CEL について、日本小児科学会、(2012/4/20-22) 福岡
6. Shimada A. Pediatric Myeloid Malignancy and Related Diseases-AML/MDS/MPD. Pediatric AML Symposium, Samsung Medical Center, (2012/10/20-21), Seoul, Korea
7. Shimada A, Yamada M, Yamashita Y et al. High FLT3 mRNA expression without FLT3-ITD in infants with acute myeloid leukemia. AACR Annual Meeting (2012/3/31-4/3) Chicago, USA

#### 〔図書〕(計 2 件)

1. 【理解して出そう 小児の検査-オーダー・手技・解釈】血液 骨髄検査  
渡部 俊幸, 嶋田 明, 小児科診療  
76 巻増刊 Page157-161(2013), 262 ページ
2. 嶋田 明、小児急性骨髄性白血病における分子異

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 明 (SHIMADA AKIRA)  
岡山大学病院・小児科・講師  
研究者番号：70391836

(2) 研究分担者

林 泰秀 (HAYASHI YASUhide)  
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・  
研究員  
研究者番号：30238133

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：