

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650603

研究課題名（和文） 急性前骨髄性白血病細胞の組織浸潤機構解明による新規治療法の立案

研究課題名（英文） Mechanisms of acute promyelocytic leukemia cell infiltration and mobilization during ATRA therapy: new strategy for prevention of ATRA syndrome and additional chemotherapy.

研究代表者

後藤 明彦 (GOTOU AKIHIKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00297293

研究成果の概要（和文）：

急性前骨髄性白血病（APL）の第一選択薬、全トランスレチノイン酸（ATRA）による寛解導入療法における重大な合併症である分化症候群（DS）と寛解導入時に抗がん剤を投与しなければならなくなる最大の要因、血中 APL 細胞増加の病態を解明するためこの研究を行った。ケモカイン CXCL12 が APL 細胞の走化因子であり、ATRA により APL 細胞の CXCL12 に対する走化性が増加した。この走化性の増加度が高い症例ほど分化症候群が発症しやすいこと、抗がん剤の投与を必要とする症例が多いことも明らかになった。この走化性にはフォスホオリパーゼ C の活性化が重要で、関与する情報伝達経路を選択的に抑制することで、DS や血液中の APL 細胞増加を防ぎ、より安全な寛解導入を行うことができるのではないかと期待される。

研究成果の概要（英文）：

Differentiation-induction therapy with all *trans* retinoic acid (ATRA) is the first line therapy in acute promyelocytic leukemia (APL). Differentiation syndrome (DS) is the most serious adverse event during ATRA therapy. Further, although mobilization of APL cells into peripheral blood requires additional chemotherapy during ATRA therapy, the mechanism of the mobilization is unclear. In the current study, CXCL12 appeared to be a chemoattractant of APL cells. Treatment of APL cells with ATRA enhanced chemotaxis towards CXCL12. Increase of chemotaxis significantly associated with occurrence of DS and the requirement of additional chemotherapy. Activation of phospholipase C pathway appeared to be crucial for the chemotaxis. These results suggest that chemotaxis ability of APL cells toward CXCL12 is involved in the pathogenesis of DS and the requirement of chemotherapy during induction therapy with ATRA. Furthermore, specific signal targeted-therapy might contribute to prevent DS and additional chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：急性前骨髄性白血病、CXCL12、CXCR4、走化性、all-trans retinoic acid

1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄性白血病（APL）は、APL 細胞内から放出される血液凝固物質により、多くの症例で播種性血管内凝固症候群（DIC）を発症

時に合併する。化学療法の開始による APL 細胞の破壊は、さらに激しい DIC、血小板減少を招き、著しい出血傾向による脳出血などの致死出血により、発症から寛解導入療法の

間の早期死亡が多く、予後の悪い白血病の代表であった。

1980年代の中国におけるビタミン A 誘導体 (all-*trans* retinoic acid; ATRA) による驚異的な寛解導入率 (95%以上) の報告が各国の追試で確認され、その分子生物学的背景も明らかにされた。すなわち、APL は、t(15;17)転座によりビタミン A 受容体 RAR α が PML 遺伝子と融合し、PML/RAR α という異常蛋白となることで、顆粒球系細胞の分化に不可欠なビタミン A の情報伝達が妨げられ、前骨髄球の段階で分化がブロックされて発症する。ATRA はこの分化抑制を解除することで APL 細胞の最終分化を導き、寛解を導入する。この治療法の開発により、APL は 5 年生存率 70%以上と最も「治り易い」白血病となった。

しかしながら、ATRA 投与に伴い、およそ 25% の患者に呼吸不全、急性腎不全、発熱、胸水や浮腫などの体液貯留を主症状とする症候群が発症し、ATRA 症候群と称されていた。これは 1990 年代終わりから亜ヒ酸 (arsenic trioxide; ATO) が APL 治療に導入され、ATRA 症候群と同様な症候群を発症しうること、剖検で肺や腎臓などに分化した APL 細胞の浸潤を認めることなどから現在は分化症候群 (differentiation syndrome; DS) とも呼ばれる。DS 自体による致死率も高い (APL 寛解導入時死亡のおよそ 15%) が DS を発症した症例は出血、血栓症、重症肝障害の併発リスクや再発リスクも高いことが示唆されている (Blood 111; 3395; 2008)。

DS の発症リスクとして末梢血 APL 細胞数が知られており、日本成人白血病研究会 (JALSG) APL プロトコールでも ATRA 単独治療は末梢血 APL 細胞数 1,000/ μ l 未満、それ以上もしくは ATRA 単剤治療中に 1,000/ μ l となった症例は多剤併用化学療法を併用することとしていた (Blood 110; 59; 2007, Leukemia 17; 339; 2003)。実際、末梢血中 APL 細胞が少なく、ATRA 単独で治療を始めた症例でも、寛解導入中に末梢血 APL 細胞の増加を示して化学療法の併用が必要となる症例が少なからず認められる。

このように、DS や APL 細胞の末梢血動員は APL の臨床に極めて重要な現象であるが、その分子メカニズムは解明されておらず、そもそも DS が分化現象そのものによって生ずるという直接的証明はさしていなかった。ATRA 投与後極めて早期 (数時間から 1 日以内) に DS を発症する症例の存在や、数週間の ATRA 療法にも関わらず前骨髄球様細胞が多く残存して分化誘導不良であるにも関わらず、DS を発症した症例などを経験し、DS が果たして真に「分化症候群」であるのか疑問を抱いていた。

2. 研究の目的

APL の ATRA による分化誘導療法に伴う APL 細胞の臓器浸潤と末梢血への動員現象の分子生物学的病態を明らかにする。従来、これらは APL 細胞の分化によるものと説明されているが、分化誘導と浸潤・動員の分子生物学的メカニズムが異なることを立証し、浸潤・動員に関与する細胞内情報伝達系をターゲットとする分子標的療法を立案する。この分子標的療法と、ATRA 療法との併用により、分化誘導を促進しつつ、APL 細胞の臓器浸潤・末梢血動員を押さえることで、より安全性が高く、有効性の高い APL に特化した寛解導入療法を考案する基礎とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞: APL 細胞株 NB4 とインフォームドコンセントを得た t(15;17)転座を有する初発 APL 患者の骨髄より得た APL 細胞を用いた。ATRA 耐性 APL 細胞のモデルとして UF-1 細胞 (埼玉医科大学・総合医療センター、木崎昌弘博士より供与) を使用した。NB4 と UF-1 は 10%FCS 加 RPMI1640 で継代培養し、APL 細胞は患者骨髄液より比重遠沈にて分離し、形態的に 95%以上 APL 細胞であることを確認して 10%FCS 加 RPMI1640 で初代培養を行い実験に使用した。

(2) ケモカイン・レセプター・分化マーカーの解析: ATRA や ATO 存在下で一定時間 (12 時間~7 日間) 培養した APL 細胞のケモカイン・レセプターの発現を Coulter 社のフローサイトメトリー EPICS XL を用いて経時的に検討した。同時に APL 細胞の分化に伴って発現が増加することが知られている分化抗原 CD15 の発現動態を経時的に検討した。

(3) Chemotaxis assay: Coaster 社の Transwell®を用いたボイデン・チェンバー法と ECI 社の TAXIScan®による解析とを行った。ボイデン・チェンバー法では下部チェンバーに CXCL12 などの走化因子を入れ、上部チェンバーに細胞を投入、2~4 時間後に 5~8 μ m のポアを抜けて、下部チェンバーに移動した細胞数をカウントした。TAXIScan®では細胞は細胞注入口から走化因子注入口へ水平方向に移動するので、細胞遊走の状態を経時的に撮影し、画像により細胞の形態変化と移動状況をモニターできる。それをコンピューター解析することで、一定時間内の走化性を検討するだけでなく、1 個ずつの細胞の移動速度や方向性などをパラメーター化できる (J Immunol Methods 282; 1, 2003)。

これらのシステムを用いて、ATRA 存在下で一定時間 (12 時間~7 日間) 培養した APL 細胞の走化性を非処理の細胞と比較した。

(4) 細胞内情報伝達系: 細胞の走化性に関与する細胞内情報伝達系としては PI-3 kinase 系、RAS-MAP kinase 系、Phospholipase

系、Rho や Rac などの small G-protein などが知られている (J Cell Sci 121; 551, 2008)。各々に対する確立された抑制剤で前処理した APL 細胞の走化性を検討した。

(5) 臨床経過と走化性の関連：インフォームドコンセントを得て骨髄液を提供してもらった症例について、臨床経過を検討した。特に治療前末梢血 APL 細胞数、ATRA 療法開始後の末梢血 APL 細胞数の推移、DS 発症の有無、化学療法併用の状況について検討した。これらと該当症例の APL 細胞の走化性を誘導するケモカイン・レセプターの発現、分化マーカーの発現、および走化性の *in vitro* での ATRA 処理による変化との関連を統計学的手法により検討した。

4. 研究成果

(1) APL 細胞の走化性因子

ATRA 感受性 APL 細胞株 NB4 と患者 APL 細胞とを用いて各種造血因子、特にケモカインに対する走化性を検討した。その結果、CXCL12、CCL19、CCL21 に対する走化性を認めたが、CXCL12 に対しては 100ng/ml で強い走化性を示したの 비해、CCL19 や CCL21 に対しては 1000ng/ml でも CXCL12 100ng/ml よりも弱い走化性しか示さなかった。また、成熟好中球の走化因子である IL-8 は APL 細胞に対して走化因子として働かなかった。CXCL12 は肺、腎など DS のターゲットとなる臓器で恒常的に産生されていることが知られていることから、以下の実験では 100ng/ml CXCL12 を APL 細胞に対する走化因子として用いた。

(2) CXCL12 に対する走化性とそのレセプター CXCR4 の発現に対する ATRA の効果

ATRA 100ng/ml で処理すると NB4、患者 APL 細胞ともに 24 時間以内に CXCL12 に対する走化性は有意に増加した。CXCR4 は CXCL12 のレセプターとして知られるが、その APL 細胞における発現をフローサイトメトリーで検討すると ATRA 処理により、その発現は 24 時間以内に有意に増加し、CXCL12 に対する走化性の亢進の動態とよく相関していた。これに対して、好中球の分化マーカーの一つである CD15 は 24 時間以内では有意な発現増加は認めず、48 時間以降に増加を認め、さらに経時的に発現が増加していくという CXCR4 とは明らかに異なるカイネティクスを示した。ATRA 耐性 APL 細胞株 UF-1 では CXCL12 に対する走化性と CXCR4 の発現そのものは認めたが、ATRA 処理によるそれらの増加現象は認めなかった。

CXCR4 の RNA の発現は RT-PCR でも検討したが、NB4 細胞の ATRA 処理により CXCR4 RNA の発現も 24 時間以内に増加してくることが確認された。

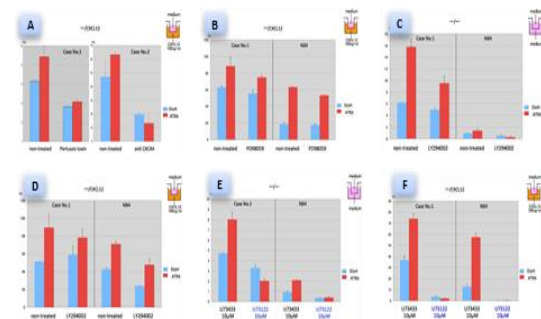
(3) APL 細胞の CXCL12 に対する走化性に関わる情報伝達経路

APL 細胞を抗 CXCR4 抗体で処理すると CXCL12 に対する走化性は抑制され、CXCR4 を介する走化性であることが確認された (下図 A 右)。CXCR4 は Gi 蛋白の活性化を介して情報伝達を行うことが知られている。Gi 蛋白を抑制する百日咳毒素 (pertussis toxin) で APL 細胞を前処理すると、CXCL12 に対しての走化性は抑制され、APL 細胞の走化性も Gi 蛋白の活性化に依存することが示唆された (下図 A 左)。

Gi 蛋白の活性化に伴い、細胞内ではフォスファチジル・イノシトール 3 キナーゼ (PI-3K)、MAP キナーゼ (MAPK)、フォスホリパーゼ C β (PLC β 2)、Rho などの活性化が引き起こされる。

そこで MAPK 系 (MEK-1) の特異的抑制剤である PD98059 (下図 B) や PI3-K の特異的抑制剤である LY294002 (下図 C, D) で APL 細胞を前処理し、走化性を検討したが、これらの薬剤は ATRA による CXCL12 に対する走化性増強に対してそれほど強力な抑制効果を示さなかった。

これに対して PLC β の特異的抑制剤 U73122 (下図 E, F) は、類似の構造を持つが PLC β に対する抑制効果のない U73433 と比較して極めて効率的に APL 細胞の走化性を阻害した。また、この抑制効果は U73122 の濃度に依存していた。



以上から APL 細胞の CXCL12 に対する走化性は、CXCR4 を介し、その情報伝達系の中でも PLC β の活性化が重要な役割をしていることが示唆された。

(4) ATRA による走化性増強効果と臨床経過との関連

同意を得た APL 患者 13 例 (次表) について、骨髄 APL 細胞の ATRA 処理による CXCR4 発現の変化と CXCL12 に対する走化性の変化を検討した。

Case No.	Induction	ATRA Synd.	WBC ² (/ μ l)	APL cells ⁴ (/ μ l)	response	relapse
1	ATRA	no	1100	352	d42 CR ²	no
2	AM80	no	1100	0	d27 CR	no
3	ATRA, IDA-AC from d15	BW ¹ gain, edema, fever	800	416	d60 CR	no
4	ATRA, DNR-AC from d17	IP ³ , fever	1100	n.d.	d49 CR	no
5	ATRA	no	1200	192	d55 CR	no
6	ATRA	no	1000	390	d41 CR	no
7	ATRA, IDA-AC from d7	no	900	380	d55 CR	yes
8	ATRA	no	1400	448	d28 CR	yes
9	ATRA, IDA-AC from d7	IP, SpO ₂ ↓, fever	1700	680	n.d. ⁴	n.d.
10	IDA-AC+ATRA	dyspnea, fever	41100	39250.5	d28 CR	yes
11	ATRA	no	800	n.d.	d46 CR	no
12	ATRA	no	1100	154	d60 CR	no
13	IDA-AraC+ ATRA	no	2700	1498.5	d64 CR	no

¹ body weight ² interstitial pneumonia ³ WBC at diagnosis ⁴ APL cells in peripheral blood ⁵ complete remission ⁶ death by

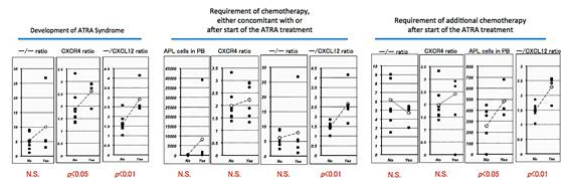
その結果、CXCR4 の発現 (MFI: mean fluorescence intensity)、CXCL12 に対する走化性ともにすべての症例において ATRA 処理によって増加した。ATRA 未処理と比べて増加の程度は症例により様々で、CXCR4 発現においては 1.33 倍から 3.33 倍、走化性は 1.03 倍から 4.16 倍の増加を認めた (次表)。

Case No.	CXCR4 MFI		CXCR4 ratio B/A	% migrated cell			% migrated cell		
	Cont (A)	ATRA (B)		Cont(C)	ATRA(D)	+/+ ratio D/C	Cont(E)	ATRA(F)	+/+ ratio F/E
1	3.82	6.06	1.59	2.20	11.37	5.17	43.2	70.66	1.64
2	4.26	7.62	1.79	0.87	6.06	9.04	34.0	63.3	1.86
3	4.22	11.5	2.73	2.14	6.47	3.02	27.1	65.57	2.42
4	5.85	16.5	2.92	1.04	5.68	5.46	27.12	68.17	2.51
5	6.21	14.6	2.35	1.28	6.23	4.87	78.27	80.29	1.03
6	6.21	9.61	1.55	0.71	6.10	8.59	25.38	39.1	1.54
7	3.82	6.06	1.59	2.20	11.48	5.23	43.23	71.39	1.65
8	7.62	25.4	3.33	1.13	10.21	9.04	47.73	70.95	1.49
9	6.03	11.4	1.89	0.83	4.20	5.06	32.51	83.52	2.57
10	5.81	18.2	2.89	0.70	18.94	26.91	17.899	74.42	4.16
11	11.2	15.4	1.38	0.76	2.92	3.86	51.32	71.33	1.39
12	7.48	14.2	1.90	3.35	8.35	2.49	41.31	57.47	1.39
13	3.47	4.62	1.33	0.19	0.21	1.11	22.78	58.9	2.59

臨床経過では 13 例中 4 例に DS を発症していた。末梢血 APL 細胞が多いために始めから ATRA に多剤併用化学療法を併用した症例が 2 例、ATRA 単剤で治療を始めたが末梢血 APL 細胞の増加のため、途中から多剤併用化学療法を加えた症例が 4 例であった (上表上)。

次に、これらの臨床経過と ATRA 処理による CXCR4 の発現増加度、CXCL12 に対する走化性増加度の関連を検討した。DS 発症例では CXCR4 の発現、CXCL12 に対する走化性共にそれらの増加度は未発症例と比べて有意に高かったが、CXCR4 発現増加度は $p < 0.05$ 、走化性増加度は $p < 0.01$ と走化性がより DS の発症との関連が高いことが示唆された。

また、多剤併用化学療法を ATRA に加えて併用する必要があった症例は、ATRA やその誘導体単独で寛解導入療法を遂行できた症例と比較して、CXCL12 に対する走化性増加度は有意に高かったが、CXCR4 の発現増加度には有意差を認めなかった。これは ATRA 単剤での治療の途中から多剤併用化学療法が必要となった症例と ATRA やその誘導体単独で寛解導入が可能であった症例を比較しても同様であった (下図)。



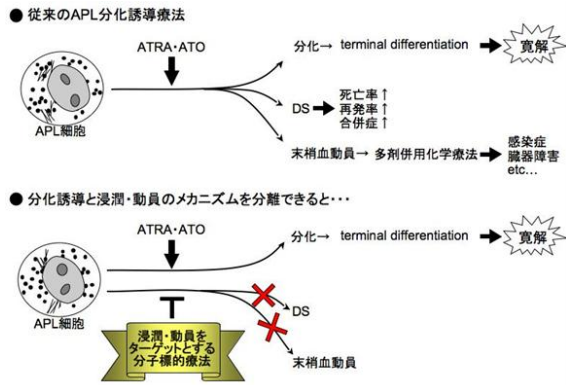
(5)まとめと今後の展望

今回の一連の研究によって、ATRA による CXCL12 に対する走化性の変化が APL 細胞の局在を変え、DS に見られる臓器浸潤や APL 細胞の末梢血動員に関与していることが示唆された。CXCL12 のレセプターである CXCR4 の ATRA による発現増加は走化性増加と密接に関係していると思われるが、DS 発症や APL 細胞の末梢血への動員といった臨床的事象には関しては、単純なレセプター発現増加よりも実際の走化性増加が重要であることも考えられた。

APL では他の病型の急性骨髄性白血病に比べて汎血球減少で発症する症例が少なからず認められる。こうした場合でも骨髄中での APL 細胞の過形成は顕著であって、ATRA や ATO による治療に伴って末梢血中に APL 細胞が増加し、多剤併用化学療法の追加が必要になることも臨床上市しばしば経験される。そして、ATRA 単剤で寛解導入しえた症例は、その後も比較的 safely に治療を完遂でき、予後も良好なのに対して、初発時末梢血 APL 細胞が多い症例や分化誘導療法に伴い末梢血 APL 細胞が増加して、多剤併用化学療法を追加せざるをえない症例では、DS 発症のみならず、DIC など合併症のコントロールに難渋することも多い。

したがって、APL 細胞の浸潤や末梢血動員を抑制することは、DS などの臓器浸潤を伴う合併症の発症を抑制したり、多剤併用化学療法の併用の必要性を減じることにつながることを期待される。これが実現されれば、安全性と有効性が高くかつ患者に優しい治療となる。

今回の研究で、CXCL12 によって惹起される CXCR4 の情報伝達系、中でも PLC β の活性化が APL 細胞の走化性において重要な役割を果たしていることが示された。ATRA による APL 細胞の分化誘導における CD15 の発現増加のカイネティクスと CXCL12 に対する走化性増強のカイネティクスは明らかに異なっており、今後、この経路が APL 細胞の分化誘導とどのような関連を持つかを明らかにすることが次のステップとして求められる。そして、臓器浸潤・末梢血動員のメカニズムの独立性が立証できれば、これをターゲットとした分子標的療法を立案し、ATRA などによる分化誘導療法と併用することで安全かつ効果的な APL の寛解導入療法を実現することが期待される (次図)。



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)

[学会発表] (計1件)

(1) 後藤明彦、青田泰雄、宮澤啓介、木崎昌弘、大屋敷一馬 : Chemotaxis of acute promyelocytic leukemia cells toward CXCL12 is involved in ATRA syndrome and the requirement of chemotherapy during induction therapy with ATRA. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, April 4, 2012, Chicago, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 明彦 (GOTOU AKIHIKO)
 東京医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00297293