

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591544

研究課題名(和文)小児白血病に対する移植片対白血病効果における細胞傷害因子の臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文)Research for clinical application of cytotoxic ligands for graft-versus-leukemia effect against childhood leukemia

研究代表者

犬飼 岳史 (INUKAI, Takeshi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：30293450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の小児急性リンパ性白血病においては、同種造血幹細胞移植による移植片対白血病(GVL)効果が残存白血病を駆逐する可能性が知られている。GVL効果には、細胞傷害性Tリンパ球やNK細胞上に発現されている細胞傷害因子が、白血病細胞に細胞死を誘導することで寄与している。本研究では、骨髄環境を模した培養条件において白血病細胞が化学療法剤に耐性を示す一方で、細胞傷害因子の1つであるTRAILに対する感受性が維持されていることを明らかにし、同種造血幹細胞移植が化学療法耐性の小児急性リンパ性白血病に対して臨床効果を示すことを実験的に確認した。

研究成果の概要(英文)：In allogeneic stem cell transplantation for advanced childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), it has been suggested that graft-versus-leukemia (GVL) effect eradicates residual disease. In GVL effect, cytotoxic ligands expressed on cytotoxic T-cells (CTLs) and NK cells play an essential role by inducing apoptosis of leukemia cells. In the present study, we confirmed that culture conditions mimicking bone marrow environment induce relative resistance of leukemia cells to chemotherapeutic agents. Of note, we also confirmed that TRAIL, one of cytotoxic ligands, is still active against leukemia cells in the culture conditions mimicking bone marrow environment. These observations suggested that allogeneic stem cell transplantation would be attractive therapeutic modalities against chemo-resistant childhood ALL.

研究分野：小児科学

キーワード：白血病 造血幹細胞移植 移植片対白血病効果 細胞傷害因子

## 1. 研究開始当初の背景

予後不良の白血病症例に対する同種造血幹細胞移植 allo-SCT の臨床効果には、ドナー由来の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) や NK 細胞が白血病細胞を根絶する GVL 効果が寄与している。GVL 効果には、CTL および NK 細胞上に発現される細胞傷害因子のうち perforin と TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) が主に関与している。

われわれは、臨床的に GVL 効果が得られやすい Philadelphia 染色体 (Ph1) 陽性の白血病細胞が高頻度で TRAIL 感受性を示す一方で、GVL 効果の得られにくい *MLL* 遺伝子再構成陽性 (*MLL*+) の白血病細胞は TRAIL 耐性を示すことを明らかにした。さらに、化学療法では全例が早期に再発し死亡している 17;19 転座陽性急性リンパ性白血病 (ALL) の白血病細胞が、*in vitro* で高い TRAIL 感受性を示す点に注目して、新規症例に対して寛解早期に allo-SCT を行ったところ、発症から 4 年を経ても再発なく経過している。

CTL および NK 細胞上の TRAIL は、標的細胞上に発現される death 受容体 (DR4/DR5) を介して細胞死を誘導することから、白血病細胞における DR4/DR5 の発現制御は重要な課題である。この点において、Ph 染色体に由来する BCR-ABL、および 17;19 転座に由来する E2A-HLF 自体が DR4/DR5 発現を誘導することを明らかにした。これは腫瘍細胞に特異的な TRAIL 受容体の発現機序を、世界に先駆けて明らかにしたものである。

解析が進む TRAIL と同様に、Perforin の GVT 効果への関与が動物実験系で明らかにされているにもかかわらず、白血病細胞の Perforin 感受性と GVL 効果との関連性についての知見は皆無に等しく、視点を変えた切り口でのアプローチが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させて、(1) 白血病細胞における TRAIL 受容体の発現制御の機序を解明し、(2) 臨床検体における TRAIL 受容体発現と allo-SCT の治療成績との関連性を明らかにし、(3) Perforin 感受性の GVL 効果における意義を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) Ph+ 白血病における TRAIL 受容体発現の機序を解析するなかで、Philadelphia 染色体に由来する BCR-ABL が *c-myc* を介して TRAIL 受容体発現を誘導している可能性に焦点を当てて解析を進める。

(2) 白血病幹細胞は休眠状態にあって化学療法に耐性を示すと想定され、白血病幹細胞を排除することが治癒には必須である。したがって、白血病幹細胞の細胞傷害因子に対する感受性を明らかにすることは重要である。これまでの解析で、CD9 陽性分画が B 前駆細胞型 ALL 細胞において白血病幹細胞としての

特性を示すことを確認している。そこで BCP-ALL 細胞株の Reh において CD9 の発現レベルと、TRAIL 受容体の発現および可溶性 TRAIL 感受性との関連性について検討する。

(3) 骨髄環境においては、白血病細胞はストローマ細胞と接着しさまざまな細胞死誘導に対して抵抗性を示している可能性が考えられている。そこで、骨髄ストローマ細胞株を用いて白血病細胞の TRAIL 感受性に及ぼす影響を解析する。

(4) 白血病細胞における TRAIL 受容体発現の同種造血幹細胞移植の治療成績における意義を明らかにするために、再発 ALL 症例に対する全国共通プロトコール (JPLSG R-06 研究) の付随研究および、2013 年から開始された新規 B 前駆 ALL 症例を対象とした全国共通プロトコール (JPLSG B-12 研究) の本研究として、症例登録時に行なわれる表面抗原解析において、同時に TRAIL 受容体の発現をフローサイトメーターで解析する。

(5) Perforin の殺細胞効果は、Perforin の細胞膜への結合によって Granzyme B などの酵素が細胞内に到達して細胞死を誘導することで発揮される。PI-9 (protease inhibitor 9) は Granzyme B の serine protease 活性を阻害することで、腫瘍細胞が NK 細胞による排除から逃れる可能性が報告されているが、PI-9 の白血病細胞での発現と活性に関しては十分に解析されていない。そこで、当研究室で保有する 60 種類の白血病細胞株と臨床検体を対象に、real time RT-PCR 法および Western blot 法を用いて、PI-9 の遺伝子発現および蛋白発現の半定量解析を行うとともに、白血病細胞に対する Perforin を介した CLT のよる殺細胞効果との関連性を解析する。

## 4. 研究成果

(1) Philadelphia 染色体陽性 (Ph+) 白血病において BCR-ABL が TRAIL 受容体の発現を維持する機序として、BCR-ABL がその下流遺伝子の 1 つである *c-myc* を介している可能性について、白血病細胞株に対する *c-myc* 阻害剤の効果と、BCR-ABL 遺伝子導入モデルマウスの系で検証したところ、部分的ながら *c-myc* が関与していることが確認された。

(2) 急性リンパ性白血病における白血病幹細胞のモデルとして、CD9 陽性分画が B 前駆細胞型 ALL 細胞において白血病幹細胞としての特性を示すことを確認していることに注目して、BCP-ALL 細胞株の Reh において CD9 の発現レベルと、TRAIL 受容体の発現および可溶性 TRAIL 感受性との関連性について検討を進めた。特に、骨髄環境は著しい低酸素状態にあり低酸素状態が白血病幹細胞の維持に寄与していることから、21%酸素条件と 1%酸素条件で解析を行った。その結果、CD9 陽性分画の方が陰性分画に比較して高い TRAIL 受容体発現レベルと TRAIL 感受性を示し、低酸素状態でも維持された。一方、抗がん剤に

対する感受性は、CD9 陽性分画において低酸素状態で著しく低下したことから、骨髄環境において急性リンパ性白血病の白血病幹細胞が化学療法に耐性を示す一方で GVL 効果に対する感受性を示す可能性が示唆された。

(3) 骨髄環境において、骨髄ストローマ細胞が白血病細胞の TRAIL 受容体発現および TRAIL 感受性に影響している可能性を明らかにするため、ヒト骨髄ストローマ細胞株を用いて検証した。その結果、骨髄ストローマ細胞株との共培養において白血病細胞の TRAIL 受容体発現レベルには大きな変化はなかった。一方、骨髄ストローマ細胞株自体は TRAIL に耐性であったが、TRAIL 受容体を発現していることが判明した。このため、培養系に添加した可溶性 TRAIL が骨髄ストローマ細胞株上の TRAIL 受容体に結合してしまうことで、相対的に白血病細胞上の TRAIL 受容体に結合する TRAIL が減少することがないように、骨髄ストローマ細胞株上の TRAIL 受容体の発現を siRNA によって抑制した垂株を樹立した。この垂株を用いた解析において、骨髄ストローマ細胞の存在下では白血病細胞の TRAIL 感受性が低下することを確認した。また、白血病細胞の抗がん剤に対する感受性も、骨髄ストローマ細胞の存在下では TRAIL 感受性よりもさらに顕著に低下することを確認した。

(4) 再発 ALL 症例を対象とした初期の解析においては、ピオチン化された DR4 および DR5 に対する抗体を用いて解析を進めたが、手法が煩雑で解析に必要な細胞数が多くなるために対象となる症例数が限られて、結果にバイアスを生ずる可能性が危惧された。そこで、新規症例を対象とする B12 研究においては、直接法を用いたフローサイトメトリーによる解析方法を確立させて、対象症例のほぼ全例において DR4 および DR5 発現を解析することが可能になっている。B12 研究には 2015 年 3 月末の時点で 800 を越える症例が登録されており、その後も継続的に解析が行われている。したがって、DR4 および DR5 の発現と臨床像および最終的な治療成績との関連性の解析までにはしばらくの観察期間を要するが、多数症例を対象として精度の高い研究成果が得られると期待される。

(5) 白血病細胞における PI-9 遺伝子発現レベルを real time RT-PCR 法で半定量解析したところ、ALL の臨床検体においてはほぼ全例において高レベルで検出されたのに対して、ALL 細胞株では過半数において検出感度以下であった。そこで、細胞株が樹立された ALL 症例の臨床検体と発現レベルを比較したところ、細胞株でのみ発現レベルが低下していた。これは、PI-9 遺伝子の高発現が ALL の発症に重要である一方で、株化の過程には必要ではない可能性が示唆された。さらに、細胞株を脱メチル化剤で処理したところ PI-9 の発現が誘導され、プロモーター領域のメチル化状態を評価したところ遺伝子発現レベルに相関して CpG island のメチル化を

確認した。

## 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 4 件)

(1) Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Sato Y, Okabe S, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, Koike K. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19- specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*, 査読有, 2014;16, 1257- 1269. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.05.022.

(2) Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharuru M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 査読有, 2014;38:42-8. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.10.008.

(3) Nishi M, Eguchi-Ishimae M, Wu Z, Gao W, Iwabuki H, Kawakami S, Tauchi H, Inukai T, Sugita K, Hamasaki Y, Ishii E, Eguchi M. Suppression of the let-7b microRNA pathway by DNA hypermethylation in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leukemia*. 査読有, 2013;27:389-97. DOI: 10.1038/leu.2012.242.

(4) Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, Sugita K. Diverse underlying proliferation response to growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Leuk Res*. 査読有, 2013;37:93-101. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.10.001.

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 三上 学, 犬飼 岳史ら. GVL 効果を仲介する細胞傷害因子 TRAIL は低酸素条件下で化学療法耐性の白血病幹細胞に対して細胞死を誘導する. 第 56 日本小児血液がん学会学術集会. 2014 年 11 月 28 日~ 30 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

(2) Suzuki R, Inukai T, et al. Possible involvement of PI9 in the development of acute lymphoblastic leukemia. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014 年 10 月 31 日~ 11 月 1 日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

(3) 黒田 格, 犬飼 岳史ら. 骨髄低酸素環境における Ph+白血病細胞の抗がん剤耐性と HIF-1 $\alpha$  の関与. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日~ 12 月 1 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

(4) 鈴木 隆和, 犬飼 岳史ら. 小児急性リンパ性白血病の進展における PI9 遺伝子発現の意義. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日~ 12 月 1 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

(5) 黄 媚賢, 犬飼 岳史ら. 細胞傷害因子 TRAIL の Ph 陽性白血病に対する抗白血病効果は骨髄ニッチ条件下でも維持される. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日~ 12 月 1 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

(6) Somazu S, Kuroda I, Inukai T, et al. TRAIL-sensitivity of Ph-positive leukemia cells in low oxygen environment corresponding to bone marrow. 第 54 日本小児血液・がん学会学術集会, 2012 年 11 月 30 日~ 12 月 02 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(7) 三上学, 犬飼岳史, 杣津晋平, 渡邊敦, ほか. B 前駆細胞型リンパ性白血病における CD9 発現を指標とした白血病幹細胞の TRAIL 感受性の解析. 第 54 日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 11 月 30 日~ 12 月 02 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(8) Kuroda I, Inukai T, et al. BCR-ABL regulates death receptor expression for TRAIL in Ph+ leukemia. 第 74 回日本血液学会, 2012 年 10 月 19 日~ 21 日, 京都国際会議場 (京都府・京都市)

(9) Inukai T, Akahane K, et al. TRAIL-mediated GVL effect against childhood ALL with t(17:19). 第 74 回日本血液学会. 2012 年 10 月 19 日~ 21 日, 京都国際会議場 (京都府・京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/54thjpbo.html>

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/55thjpbo.html>

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/76thjb.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

犬飼 岳史 ( INUKAI, Takeshi )

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号 : 30293450

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

根本 篤 ( NEMOTO, Atsushi )

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 422684

廣瀬 衣子 ( HIROSE, Kinuko )

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 70436880

黒田 格 ( KURODA, Itaru )

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 30402051