

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860899

研究課題名(和文) 小児急性リンパ性白血病新規キメラ分子SNX2-ABL1の機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of novel chimeric gene SNX2-ABL1 detected in childhood acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

飯島 一智 (Iijima, Kazutoshi)

東京理科大学・工学部・助教

研究者番号：30468508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：白血病キメラ分子SNX2-ABL1の腫瘍化における役割を明らかにした。強制発現によりマウスProB細胞株Ba/F3がIL-3非依存性の増殖能を示したことから、腫瘍化への関与が示唆された。強制発現Ba/F3細胞は臨床像と一致してDasatinibに対する強い抵抗性を示し、DasatinibによるCrkL, p44/42 MAPK, STAT5のリン酸化の低下が顕著に抑制されていた。また遺伝子発現解析より、Igf-1の発現亢進が明らかとなった。一方、Nilotinibなど次世代型チロシンキナーゼ阻害剤に対しては高い感受性を示したことから、これらの薬剤の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic application of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has significantly improved the outcome of BCR-ABL1-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Recently, novel ABL1-related chimeric transcripts were identified. In this study, we investigated the functional characteristics of SNX2-ABL1 protein. IL-3-independent proliferative ability was acquired by induction of SNX2-ABL1 as similar as BCR-ABL1 in IL3-dependent mouse pro-B Ba/F3 cells. SNX2-ABL1-expressing Ba/F3 cells showed rather lower sensitivity against TKIs, especially dasatinib. Then, the mechanism of resistance to dasatinib was investigated. As a result, SNX2-ABL1-expressing Ba/F3 cells showed different phosphorylation pattern of those of BCR-ABL1 and the phosphorylation of intracellular proteins, especially CrkL, p44/42 MAPK, STAT5, are only partially inhibited by TKI treatment. From gene expression analysis, high expression of Igf-1 in SNX2-ABL1 expressing cells was observed.

研究分野：小児血液学

キーワード：白血病 シグナル伝達 チロシンキナーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

小児 B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病 (BCP-ALL) では、約 1/3 の症例において染色体転座に伴うキメラ遺伝子の発現が見られ、その種類によって予後や病態が大きく異なる。フィラデルフィア染色体 (Ph1) と呼ばれる t(9;22) 転座によって生じるキメラ遺伝子 BCR-ABL1 を有する BCP-ALL 症例は、従来は 5 年無病生存率 (5y-EFS) が 20~40% と極めて予後不良であった。BCR-ABL1 蛋白では、BCR 部分の dimerization によりチロシンキナーゼである ABL1 が恒常的活性化状態となり、細胞の増殖亢進、アポトーシス抑制がもたらされ、腫瘍化に寄与すると考えられている<sup>1</sup>。これに対して、近年、キナーゼドメイン部分を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である Imatinib および Imatinib 耐性 T315I 変異に対しても阻害活性を有する第二世代 TKI が開発され、その併用によって BCR-ABL1 陽性 BCP-ALL の 5y-EFS は 80~90% となり、治療成績が劇的に向上した<sup>2,3</sup>。一方、ABL1 のフュージョンパートナーとして BCR 以外にも複数同定されており、SNX2 は 2011 年にその 1 つとして新規に同定された<sup>4</sup>。申請者らも、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス (RNA-seq) 解析<sup>5</sup> により、SNX2-ABL1 を有する BCP-ALL 症例を 1 例経験した。一般的に、BCR 以外との ABL1 キメラを有する症例も、BCR-ABL1 陽性と同様に治療抵抗性で予後不良であるが、TKI の有効性も報告されている<sup>6</sup>。我々が経験した症例も、網羅的遺伝子発現パターン (Gene set enrichment analysis (GSEA)) による解析では Ph1-ALL に類似した遺伝子発現パターンを示したが、Imatinib に対してある程度感受性を示したものの、Dasatinib には全く反応を示さなかった。

申請者らは、遺伝子配列から予測される SNX2-ABL1 蛋白についてコンピューター上で解析し、BCR-ABL と比較した。t(5;9) 転座によって生じる SNX2-ABL1 では SNX2 の exon3 と ABL1 の exon5 が融合したキメラ RNA が転写され、約 120 kDa の融合タンパク質が翻訳される。一方、主に ALL で検出される minor BCR-ABL1 は BCR の exon1 と ABL1 の exon2 が融合したものであり、約 190 kDa の融合タンパク質 p190BCR-ABL1 を生じる。SNX2-ABL1 と BCR-ABL1 の蛋白構造を比較すると (i) SNX2 の配列中に特定のドメインは含まれていない、(ii) ABL1 中の SH2 ドメイン、SH3 ドメインを欠いている、といった点で異なっていた。以上の知見から、SNX2-ABL1 は、BCR-ABL と類似した生物学的活性を示し、BCP-ALL の発症あるいは病態形成に関与するが、構造上の差異から、TKI に対して BCR-ABL1 とは異なる感受性を示す可能性が示唆された。ABL1 関連関連キメラを有する BCP-ALL の治療戦略を考える上で、フュージョンパートナーが異なるキメラ蛋白が、どのような生物学的活性を示し、TKI に対してどのような挙動を示すのかを明らかにすることは、非常に重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、SNX2-ABL1 蛋白のキナーゼ活性および遺伝子導入細胞における細胞増殖亢進を詳細に解析することで、BCP-ALL の腫瘍特性や薬剤反応性に果たす SNX2-ABL1 の役割について明らかにするとともに、その知見を治療法開発へ応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) SNX2-ABL1, p190BCR-ABL1, p210BCR-ABL1 発現細胞株の樹立

樹立済みのレトロウイルスベクターを用いて SNX2-ABL1, p190BCR-ABL1, p210BCR-ABL1 融合遺伝子をマウス NIH3T3 細胞に導入し、強制発現させた。抗 BCR 抗体および抗 SNX2 抗体を用いたウェスタンブロットングにより各キメラタンパク質の発現を確認した。免疫沈降により各キメラタンパク質を単離する手法も確立した。

(2) マウス ProB 細胞 Ba/F3 を用いた SNX2-ABL1 の機能とチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 感受性の評価

SNX2-ABL1, p190BCR-ABL1, p210BCR-ABL1 融合遺伝子を IL-3 依存性マウス ProB 細胞株 Ba/F3 に導入し、IL-3 不含培地中での増殖挙動を WST-8 assay により評価した。さらに、TKI である Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Bafetinib, Rebastinib, Ponatinib を添加した培地中で培養を行い、WST-8 により細胞数変化を、Annexin V-FITC を用いたフローサイトメトリーによりアポトーシス誘導を評価した。

(3) SNX2-ABL1 発現による細胞内リン酸化パターンの変化の解析

SNX2-ABL1, p190BCR-ABL1, p210BCR-ABL1 導入 Ba/F3 細胞より抽出したタンパク質の抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットングより、細胞内タンパク質のリン酸化パターンを解析した。TKI 処理によるリン酸化パターンの変化についても解析した。いくつかの重要なタンパク質については特異的抗体を用いたウェスタンブロットング、フローサイトメトリーにより個々に評価を行った。

(4) SNX2-ABL1 発現による遺伝子発現変化の網羅的解析

SNX2-ABL1, p190BCR-ABL1 キメラ遺伝子導入 Ba/F3 細胞より total RNA を単離後、Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 および Mouse Genome 430A 2.0 を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス ProB 細胞 Ba/F3 を用いた SNX2-ABL1 の機能評価<sup>7</sup>

レトロウイルスベクターを用いて IL-3 依存性マウス ProB 細胞株 Ba/F3 に SNX2-ABL1 および p190BCR-ABL1, p210BCR-ABL1 融合遺伝子を導入し、ドキシサイクリン (DOX) 依存的に各キメラを発現誘導可能な細胞株を樹立した (Fig. 1)。

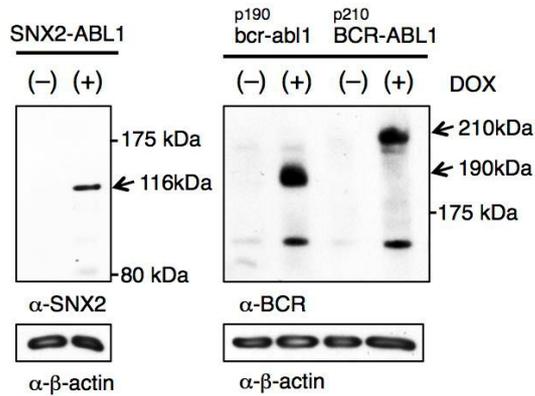


Fig. 1 各キメラタンパク発現 Ba/F3 細胞株の樹立

得られた強制発現株を用いて SNX2-ABL1 の機能について BCR-ABL1 と比較、検討した。 $p^{190}$ BCR-ABL1,  $p^{210}$ BCR-ABL1 と同様、SNX2-ABL1 の導入により Ba/F3 細胞は IL-3 非依存性の増殖能を獲得したことから (Fig. 2), SNX2-ABL1 は白血病の発症に関与している可能性が示唆された。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットングより、SNX2-ABL1 の発現による細胞内タンパク質チロシンリン酸化パターンを調べたところ、 $p^{190}$ BCR-ABL1 や  $p^{210}$ BCR-ABL1 と共通するバンドも多くみられたものの、より多くのバンドが検出された。また TKI 処理後にも多くのタンパク質がリン酸化された状態で維持されており、特に Dasatinib による CrkL, p44/42 MAPK, STAT5 のリン酸化の低下が顕著に抑制されていた。

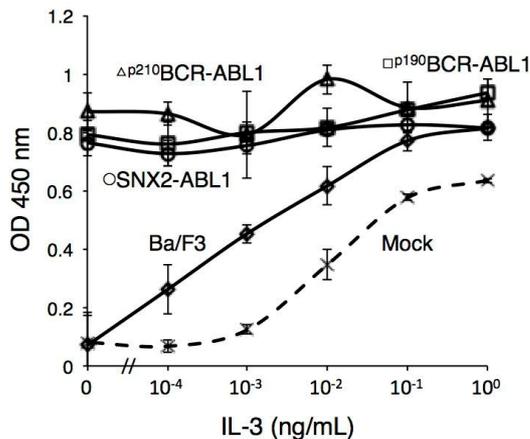


Fig. 2 キメラタンパク強制発現 Ba/F3 細胞株の IL-3 濃度依存性増殖 (培養後 24 時間)

## (2) SNX2-ABL1 のチロシンキナーゼ感受性の評価<sup>7</sup>

次に、キメラタンパク発現 Ba/F3 細胞株の種々のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) に対する感受性を評価した。TKI を培地中に添加し、WST アッセイより細胞増殖を、Annexin V-FITC を用いたフローサイトメトリーによりアポトーシスを解析した。SNX2-ABL1 導入株は BCR-ABL1 導入株に比して Imatinib に対する感受性が低く、Dasatinib に対して強い抵抗性を示

した (Fig. 3, 4) 我々は SNX2-ABL1 キメラを有する B 前駆細胞性急性リンパ芽急性白血病症例における Dasatinib 抵抗性を報告しており<sup>8</sup>、その知見と一致するものであった。一方、Nilotinib など次世代型の TKI に対しては SNX2-ABL1 は BCR-ABL1 とほぼ同等の感受性を示しており、これらの薬剤の有効性が期待される。

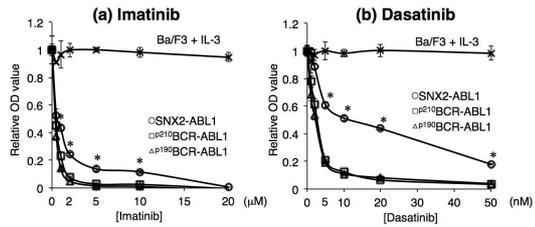


Fig. 3 SNX2-ABL1 発現 Ba/F3 細胞株の TKI に対する感受性 (a) Imatinib (b) Dasatinib ( $p < 0.01$ ,  $p^{190}$ BCR-ABL1,  $p^{210}$ BCR-ABL1)

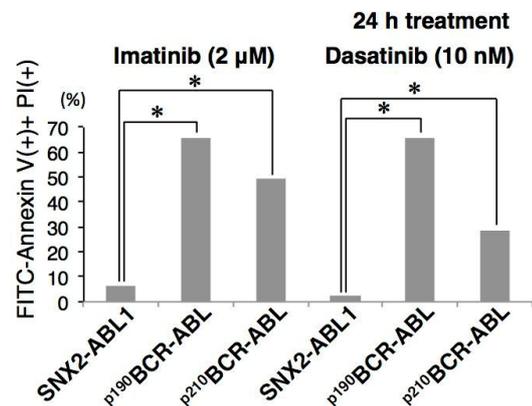


Fig. 4 SNX2-ABL1 発現 Ba/F3 細胞株において TKI により誘導されるアポトーシス ( $p < 0.01$  vs  $p^{190}$ BCR-ABL1,  $p^{210}$ BCR-ABL1)

## (3) SNX2-ABL1 発現細胞株の網羅的遺伝子発現解析

上記キメラタンパク発現 Ba/F3 細胞より total RNA を単離後、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。Mock ベクター導入 Ba/F3 細胞との比較により SNX2-ABL1,  $p^{190}$ BCR-ABL1,  $p^{210}$ BCR-ABL1 発現細胞において特徴的に発現する遺伝子群を同定した。SNX2-ABL1 発現細胞においては  $p^{190}$ BCR-ABL1,  $p^{210}$ BCR-ABL1 発現細胞と同様に、*Bcl2a1*, *Il2ra* (*cd25*), *Itk*, *Lta* の高発現および *Bcl2l1l* (*Bim*) の低発現が見られた。一方、SNX2-ABL1 発現細胞においては、*Igf-1* が特徴的に高発現であった。

次に、以前我々が開発した Gene Set Enrichment Analysis を利用した手法<sup>9</sup>を用い、SNX2-ABL1 導入細胞が BCR-ABL1 導入細胞と類似の遺伝子発現パターンを示すかについて検討した。結果、Fig.5 に示すように SNX2-ABL1 発現 Ba/F3 細胞が BCR-ABL1 発現細胞と極めて類似した遺伝子発現パターンを示すことがわかった。

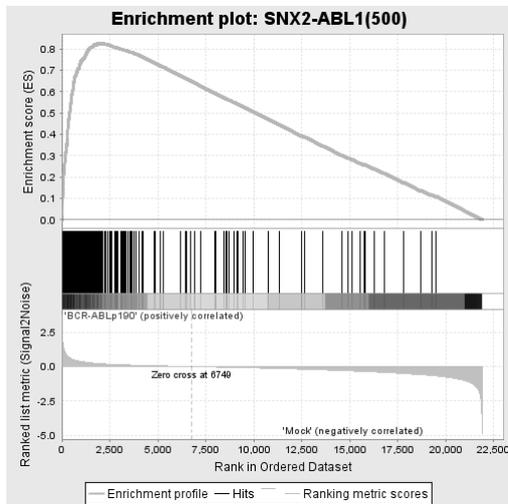


Fig. 5 SNX2-ABL1 導入 Ba/F3 細胞の遺伝子発現プロファイルの Enrichment Plot

#### <引用文献>

1. Sattler M, Griffin JD. Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int. J. Hematol.*, 73, 278-91 (2001)
2. Pui CH, Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.*, 109, 777-87 (2010)
3. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *J. Clin. Oncol.*, 29, 551-65 (2011)
4. Ernst T, Score J, Deininger M, et al. Identification of FOXP1 and SNX2 as novel ABL1 fusion partners in acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 153,43-6 (2011)
5. Kannan K, Wang L, Wang J, et al. Recurrent chimeric RNAs enriched in human prostate cancer identified by deep sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 9172-7 (2011)
6. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 22, 153-66 (2012)
7. Tomita O, Iijima K, Ishibashi T, Osumi T, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Mori T, Shimizu T, Kiyokawa N. *Leuk. Res.*, 38, 361-370
8. Matsuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, et al. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript, *Eur. J. Haematol.* 92, 263-267 (2014)
9. 飯島 一智, 清河 信敬, 吉原 宏樹, 富田 理, 小林 健一郎, 福島 敬, 林 泰秀, 菊池 陽, 康勝好, 真部 淳, 小原 明, 小児 Ph-like ALL 症例の表面マーカー, 遺伝子発現解析, *日本小児血液・がん学会雑誌*, 51, 200-205 (2014)

#### 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 2 件)

Tomita O, Iijima K, Ishibashi T, Osumi T, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Mori T, Shimizu T, Kiyokawa N. Sensitivity of SNX2-ABL1 toward tyrosine kinase inhibitors distinct from that of BCR-ABL1, *Leuk. Res.* 査読有り, Vol. 38, No.3, 2014, 361-370

DOI:10.1016/j.leukres.2013.11.017.

Matsuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript, *Eur. J. Haematol.* 査読有り, Vol. 92, No. 3, 2014, 263-267

DOI:10.1111/ejh.12234

#### [学会発表](計 7 件)

飯島一智, 清河信敬, 吉原宏樹, 大隈朋生, 加藤元博, 小林健一郎, 大喜多肇, 藤本純一郎, 花田良二, 土田昌宏, 嶋田博之, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊池陽, 林泰秀, 小原明, キメラ遺伝子を有しない小児BCP-ALL症例の遺伝子発現プロファイルに基づく分類, 第75回日本血液学会学術集会, 2013年10月11日-13日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

増澤亜紀, 清谷知賀子, 飯島一智, 富田理, 大隈朋生, 寺島慶太, 山崎文登, 弦間友紀, 宇野光昭, 塩田曜子, 清河信敬, 森鉄也, SNX2-ABL1 融合遺伝子陽性小児 B 前駆細胞性急性リンパ性白血病 症例報告第75回日本血液学会学術集会, 2013年10月11日-13日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

富田理, 飯島一智, 石橋武士, 大隈朋生, 増澤亜紀, 清谷知賀子, 斎藤正博, 森鉄也, 清水俊明, 清河信敬, BCP-ALL の新規キメラ分子 SNX2-ABL1 の機能解析, 第75回日本血液学会学術集会, 2013年10月11日-13日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

飯島一智, 清河信敬, 吉原宏樹, 富田理, 小林健一郎, 福島敬, 林泰秀, 菊池陽, 康勝好, 真部淳, 小原明, 小児 Ph-like ALL 症例の表面マーカー、遺伝子発現解析, 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)

富田理, 飯島一智, 石橋武士, 大隈朋生, 増

澤亜紀, 斎藤正博, 森鉄也, 清河信敬, 清水俊明, Dasatinib 抵抗性の白血病新規キメラ分子 SNX2-ABL1 についての検討, 第 117 回小児科学会総会, 2014 年 4 月 11 日-13 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)  
飯島一智, 富田理, 石橋武士, 増澤亜紀, 大隈朋生, 森鉄也, 清河信敬, SNX2-ABL1 の機能解析とチロシンキナーゼ阻害剤抵抗性機序の解明, 第 56 回日本小児血液・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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯島 一智 (IJIMA, Kazutoshi)  
東京理科大学・工学部・助教  
研究者番号: 30468508

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

富田 理 (TOMITA, Osamu)  
順天堂大学・医学部・助教  
鈴木 稜 (SUZUKI, Ryo)  
東京理科大学大学院・総合化学研究科・修士 1 年  
越智 健太郎 (OCHI, Kentaro)  
東京理科大学・工学部・学部 4 年  
小丸 香奈恵 (KOMARU, Kanae)  
東京理科大学・工学部・学部 4 年