

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860740

研究課題名(和文) MLL/AF4陽性ALLのS100A6抑制による新規治療開発

研究課題名(英文) Amlexanox as a possible breakthrough of MLL/AF4-positive acute lymphoblastic

研究代表者

玉井 勇人(TAMAI, HAYATO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40465349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗アレルギー薬AmlexanoxによるS100A6発現抑制によるMLL/AF4陽性ALLの細胞株SEM・RS4;11にてアポトーシス効果を*in vitro*で検証しその効果とメカニズムを証明した。In vivo実験として Amlexanox配合飼料で飼育したMLL/AF4陽性Tgマウスと通常飼料で飼育したMLL/AF4陽性Tgマウスで生後1年での白血病の形成の比較を行い、Amlexanoxが白血病形成を抑制することを証明した。

研究成果の概要(英文)：MLL/AF4-positive ALL is associated with a poor prognosis even after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We have reported that this ALL shows resistance to TNF $\gamma$ , which is the factor in the GVL effect or tumor immunity, by upregulation of S100A6 expression followed by interference with the p53-caspases pathway. It was reported that Amlexanox, an anti-allergic drug, inhibited translocation pathway of endogenous S100A6 in endothelial cells. The purpose of this study is to examine the effect of Amlexanox on MLL/AF4-positive ALL. We found Amlexanox significantly inhibited S100A6 expression in the presence of TNF $\gamma$  in MLL/AF4-positive ALL cells. Amlexanox blocked upregulation of S100A6 expression followed by interference with the p53-caspases pathway. In vivo analysis, MLL/AF4-positive transgenic mice fed a diet containing Amlexanox developed significantly less leukemia at the age of 1 year. These findings suggest that Amlexanox may be a breakthrough of MLL/AF4-positive ALL.

研究分野：血液内科学

キーワード：MLL AF4 Amlexanox S100A6 ALL leukemia GVL P53

1. 研究開始当初の背景

MLL/AF4 陽性急性リンパ性白血病 (ALL)は極めて予後不良であり造血幹細胞移植を行っても予後の改善が得られない疾患である<sup>1</sup>。我々は MLL/AF4 陽性 ALL が予後不良である原因として、MLL/AF4 が S100A6 を高発現させ P53 のアセチル化をブロックすることが、ドナー由来 T 細胞によるレシピエントの残存白血病細胞の駆逐効果 (Graft versus leukemia effect;GVL) や腫瘍免疫の主体である TNF $\alpha$  による白血病細胞アポトーシスを抑制していることを示した<sup>2</sup>。また我々はヒト由来 TNF $\alpha$  を分泌出来るヒト末梢血単核球移植 SCID マウスにおいて S100A6 の発現抑制がヒト TNF $\alpha$  を介して MLL/AF4 陽性 ALL 細胞を駆逐することを発見し、S100A6 が予後不良の MLL/AF4 陽性 ALL における分子標的薬のターゲットとなる可能性を示した<sup>3</sup>。ここで我々は既存の薬剤の中に S100A6 分子標的薬になる可能性のあるものとして抗アレルギー剤として広く用いられている Amlexanox に注目した。Amlexanox はヒト内皮細胞の細胞質に S100A6 を含む顆粒が集積するのを抑制する効果が報告されている<sup>4</sup>。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Amlexanox より S100A6 活性を抑制することによる腫瘍免疫や GVL 効果増強を着想し、この視点をもとにして予後不良の MLL/AF4 陽性 ALL の新たな治療を検討することにある。

3. 研究の方法

1,Amlexanox による S100A6 発現抑制による MLL/AF4 陽性 ALL の細胞株

SEM・RS4;11 にてアポトーシス効果を *in vitro* で検証する。

2, Amlexanox をマウス飼料に混ぜ生後 1 カ月から MLL/AF4 陽性 Tg マウスを飼育し安全性の検討を行う。

3, Amlexanox 配合飼料で飼育した MLL/AF4 陽性 Tg マウスと通常飼料で飼育した MLL/AF4 陽性 Tg マウスで生後 1 年での白血病の形成の比較を行う。

4. 研究成果

まず *in vitro* において TNF 存在下で Amlexanox は 100 $\mu$ g/ml で MLL/AF4 陽性 ALL の細胞株 SEM・RS4;11 の S100A6 発現を有意に抑制し、最終的に P53 のアセチル化を阻害を解除し Caspase 3 の活性化を通じたアポトーシスを誘導することがウエスタンブロット法で明らかになった。次に *in vivo* の実験には MLL/AF4 陽性 ALL の治療モデルとして我々が作成した MLL/AF4Tg マウスを用いた。このマウスは胚細胞に MLL/AF4 遺伝子をウイルスベクター経由で組み込んであり、出生 1 年でほぼ全例 B220 陽性 ALL を発症する。このモデルはヒトの病原型を反映した類のない画期的なモデルであり独創的である<sup>5</sup>。これを 0.02%Amlexanox を飼料に混入した群と、通常飼料の群に分け、1 年後の白血病の形成を比較したところ、Amlexanox 投与群では 1 例のみ白血病発症を認めたのに対し、Control の通常飼料群では全例白血病発症を認めた。各マウスの脾臓から抽出したタンパクにおいてウエスタンブロット法を行ったところ *in vivo* の実験と同様に Amlexanox は MLL/AF4 陽性 ALL の S100A6 発現を抑制し、最終的に P53 のアセチル化を阻害を解除し Caspase 3 の活性化を通じたアポトーシスを誘導

するとが示された。

S100A6 をターゲットとして腫瘍免疫や造血幹細胞移植の効果を増強する治療は MLL/AF4 陽性白血病の治療に breakthrough をもたらす可能性のあるものと考えられる。また現在一般的に抗アレルギー薬として国内外で使用されている Amlexanox を用いて、S100A6 の抑制作用を引き起こすことによって MLL/AF4 陽性白血病を治療する試みは独創的である。

我々が発見した MLL/AF4 陽性 ALL のもつ S100A6 を介した GVL や腫瘍免疫抵抗性を既に市販されている内服薬 Amlexanox によって解除できることを示したことによって MLL/AF4 陽性 ALL 患者の造血幹細胞移植の予後が大幅に改善する可能性がある。この研究成果の社会にもたらすインパクトは極めて高いと考えられ、非常に意義深いものとする。ただし MLL/AF4 陽性 ALL は大部分が乳児である。Reilly SM ら<sup>6</sup>が報告した通り、Amlexanox は我々の実験においても体重増加の抑制効果を認めた。成人ならともかく乳児においてはこの問題は注視すべき問題と考える。

#### 【参考・引用文献】

1, Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, Silverman LB, Biondi A, Harms DO, Vilmer E, Schrappe M, Camitta B. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*. 2002 ;359(9321):1909-15.  
2, Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T. Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis

factor-alpha is mediated by S100A6 upregulation. *Blood Cancer J*. 2011;1(11):e38. doi: 10.1038/bcj.2011.37.  
3, Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Shimada T, Dan K, Inokuchi K. Inhibition of S100A6 induces GVL effects in MLL/AF4-positive ALL in human PBMC-SCID mice. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(5):699-703. doi: 10.1038/bmt.2014.18.  
4, Hsieh HL, Schäfer BW, Cox JA, Heizmann CW. S100A13 and S100A6 exhibit distinct translocation pathways in endothelial cells. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt15):3149-58.  
5, Tamai H, Miyake K, Takatori M, Miyake N, Yamaguchi H, Dan K, Shimada T, Inokuchi K. Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia*. 2011;25(5):888-91.  
6, Reilly SM, Chiang SH, Decker SJ, Chang L, Uhm M, Larsen MJ, Rubin JR, Mowers J, White NM, Hochberg I, Downes M, Yu RT, Liddle C, Evans RM, Oh D, Li P, Olefsky JM, Saltiel AR. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-ε improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat Med*. 2013;19(3):313-21.

#### 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 0 件 )

{ 学会発表 } ( 計 0 件 )

{ 図書 } ( 計 0 件 )

{ 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 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

玉井 勇人 (TAMAI.HAYATO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号 40465349

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：