

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860820

研究課題名(和文)ETP-ALLに対する新規治療の開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategy for ETP-ALL

研究代表者

吉田 秀樹 (Yoshida, Hideki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10643546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、T-ALLの中で、予後不良な一群であるETP-ALLにおいて、転写因子のMEF2Cの発現が高値であることを見出した。MEF2CはBCL2によるアポトーシス抑制作用を増強するため、BCL2阻害剤がETP-ALLの薬剤耐性の克服に寄与するか検討した。BCL2阻害剤であるABT-737は、MEF2C高発現のヒトT-ALL細胞株(LOUCY)、およびMEF2C強制発現BaF3細胞株のPSL感受性を増強することが明らかとなった。また、ステロイド抵抗性を示す、ETP-ALL患者の白血病細胞とストローマ細胞株(MS5)を用いた、共培養系を用いた検討でも、ステロイド感受性を改善することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Early T-cell precursor-acute lymphoblastic leukemia (ETP-ALL) has been identified as a high-risk subtype of pediatric T-ALL. Analysis of the gene expression patterns revealed that MEF2C was expressed at higher levels in ETP-ALL. Using human T-ALL and BaF3 cell lines with high expression levels of MEF2C, the present study tested whether the BCL2 inhibitor (ABT-737) restores the sensitivity to prednisolone (PSL), because MEF2C causes PSL resistance, possibly by augmenting the anti-apoptotic activity of BCL2. Treatment with PSL and ABT-737 caused a significant reduction in the IC50 of PSL in the MEF2C-expressing LOUCY cells, in addition to the MEF2C-transduced BaF3 cells. The combination treatment significantly accelerated the killing of primary leukemic blast cells of ETP-ALL with high expression levels of MEF2C, which were co-cultured with MS5 cells. These findings suggest that BCL2 inhibitors may be a therapeutic candidate for patients with ETP-ALL with high expression levels of MEF2C.

研究分野：医歯薬学

キーワード：T-ALL ETP-ALL MEF2C BCL2 ABT737 ステロイド抵抗性

1. 研究開始当初の背景

Early T-cell precursor ALL (ETP-ALL) は、「T細胞性 ALL(T-ALL)のうち、CD1a および CD8 陰性、CD5 陰性～低発現(芽球の中の陽性細胞が75%以下)、骨髄球系抗原 (CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, CD65) が1抗原以上陽性(芽球の25%以上に発現)の全てを満たす一群」として定義され、予後不良な T-ALL の1亜型とされていた。我々は、これまでに ETP-ALL の治療抵抗性のメカニズムを解明するべく、造血細胞の分化制御に関わる多数の転写因子の発現の差異を臨床検体を用いて RQ-PCR 法で検討し、ETP-ALL は non-ETP-ALL に比し *MEF2C* (Myocyte enhancer factor 2) が有意差をもって高発現であることを明らかにした(図1)。

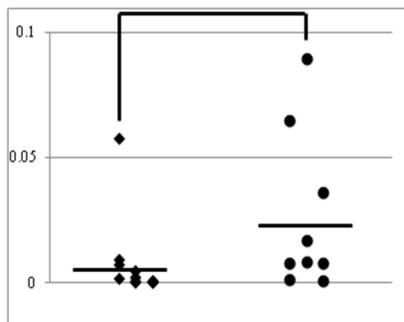


図1 Non ETP-ALL ETP-ALL

MEF2C は ETP-ALL で有意に高発現である。

T-ALL の患者 31 例 (non ETP-ALL; 21 例、ETP-ALL; 10 例) を対象とし、RQ-PCR を用いて表した ($P=0.039$)

なお、縦軸は GAPDH で補正した、*MEF2C* の相対的な発現量を示す。

MEF2C は造血器においては造血幹細胞のリンパ球系細胞への分化の極初期に関わる転写因子として知られている。ETP-ALL に *MEF2C* が高発現であることは、より未分化な細胞に由来する可能

性を示唆する。また *MEF2C* は、*NUR77* を抑制することにより、*BCL2* によるアポトーシス抑制を増強する可能性が 2008 年に報告された。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、このような背景の下、*MEF2C* 高発現とステロイド抵抗性に関する基礎研究を完成し、最終的に ETP-ALL に対する新規治療の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

- (1) ヒト T 細胞性白血病細胞株を用いた、*MEF2C* 発現量と PSL 感受性および *BCL2* 阻害剤 (ABT-737) に対する感受性の検討。
- (2) *MEF2C* 強制発現マウス ALL 細胞株における、*BCL2* 阻害剤 (ABT-737) に対する感受性の検討。
- (3) *MEF2C* 高発現および低発現 T-ALL 患者検体のストローマ細胞 (MS-5) との共培養系における、*BCL2* 阻害剤 (ABT-737) によるステロイド抵抗性の解除の検討

4. 研究成果

- (1) *MEF2C* 高発現であるヒト T-ALL 細胞株 LOUCY は、*BCL2* 阻害剤の ABT-737 とプレドニゾン (PSL) の併用で、有意に PSL の IC_{50} の低下を認めた (Combination Index (CI) 0.55)。一方、*MEF2C* 低発現ヒト T-ALL 細胞株の Jurkat では、ABT737 に PSL との間に相乗効果はみられなかった (CI=1.12) (図2)。また、Annexin V assay にて、ABT737 と PSL 併用下では、Annexin V 陽性細胞が増加し、Apoptosis が増加していることが示された (図3)。

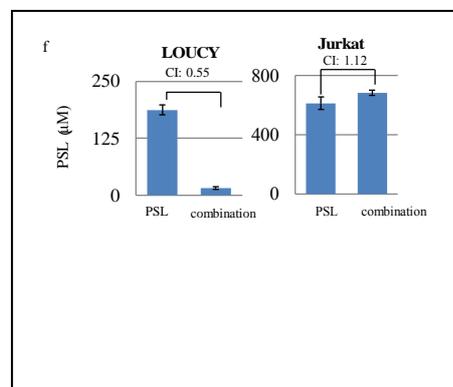


図2 ABT737 は LOUCY 細胞株において、PSL 抵抗性を改善する。

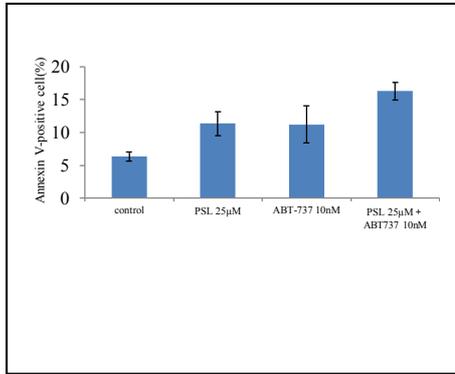


図3 ABT-737 と PSL 併用は、LOUCY 細胞の Annexin V 陽性細胞数を増加させる。

- (2) マウスの ALL 細胞株である BaF3 にレトロウイルスにより MEF2C を強制発現させ、ABT737 に対する感受性を検討したところ、MEF2C 発現 BaF3 細胞株で、MEF2C 強制発現前に比して、PSL の IC50 をより強く低下させることが明らかとなり、MEF2C の発現量の増加に伴い、ABT-737 に対する感受性が増した(図 4、5)。

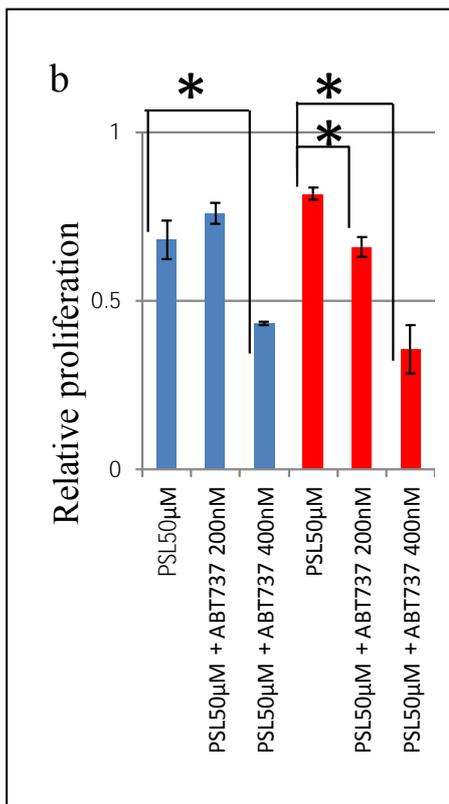


図4 ABT737 は MEF2C 発現 BaF3 細胞株 (赤色) で、よりステロイドの細胞増殖抑制効果を増強する。

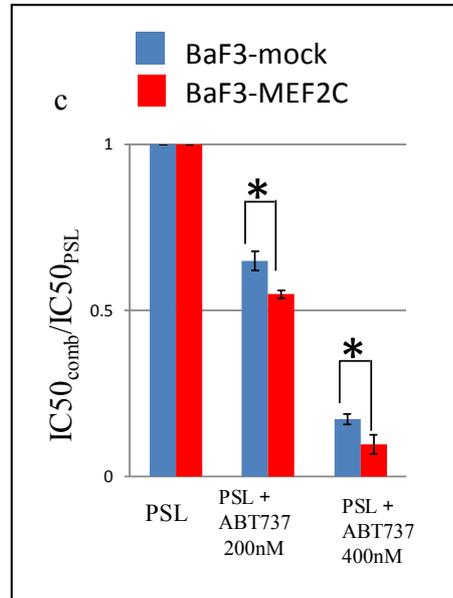


図5 ABT737 は MEF2C 発現陽性 BaF3 細胞株において、より強く PSL の IC50 を低下させる。

- (3) MEF2C 高発現の T-ALL 患者白血病細胞 (n=2) と MEF2C 低発現 T-ALL 患者白血病細胞 (n=2) に対して、マウス骨髄支持細胞より樹立された細胞株 MS-5 との共培養を行い、PSL、ABT-737 に対する感受性を検討した。PSL 感受性については、実際の患者での有効性を同様の結果 (MEF2C 高発現 2 症例はステロイド耐性であり、MEF2C 低発現 2 症例は PSL 感受性) であった。ABT-737 については、MEF2C 高発現の 1 症例において、PSL との併用で、PSL 単剤に比して、有意な細胞増殖抑制効果を認めた(図 6)。

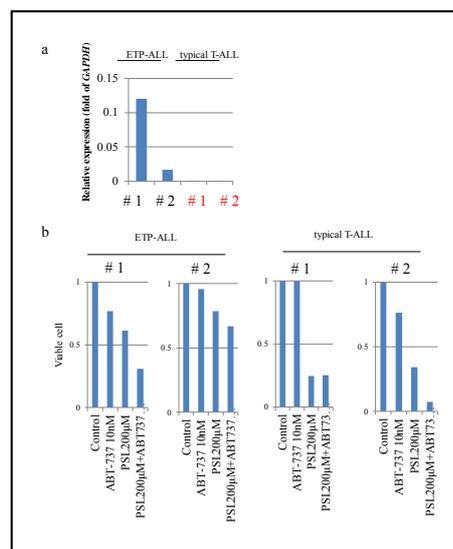


図 6 (a) ETP-ALL 患者では、RQ-PCR により、MEF2C の発現上昇を認める。
(b) ABT-737 は、ETP-ALL 患者における PSL 抵抗性を MS-5 との共培養系においても改善する。

以上の結果より、MEF2C 高発現は、ETP-ALL における PSL 耐性にかかわっており、BCL2 阻害剤によって、PSL 耐性の解除が可能である事が示された。BCL2 阻害剤の ETP-ALL に対する有効性を示す、*in vitro* での貴重なデータであると思われた。

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 1 件)

Kawashima-Goto S, Imamura T, Tomoyasu C, Yano M, Yoshida H, Fujiki A, Tamura S, Osone S, Ishida H, Morimoto A, Kuroda H, Hosoi H. BCL2 Inhibitor (ABT-737): A Restorer of Prednisolone Sensitivity in Early T-Cell Precursor-Acute Lymphoblastic Leukemia with High MEF2C Expression? PLoS One. 10(7): e0132926, 2015. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0132926.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 秀樹 (Yoshida, Hideki)
京都府立医科大学医学 (系) 研究科 (研究院)・助教
研究者番号 : 10643546