

令和元年6月18日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21176

研究課題名(和文) 中枢神経白血病における白血病細胞・血管内皮細胞のROCK1機能解析

研究課題名(英文) Molecular characterization of ROCK leukemia between leukemia cells and endothelial cells in CNS leukemia

研究代表者

大西 千恵 (Onishi, Chie)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30598115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：FLT3-ITD変異を有する白血病は難治の疾患である。わたしたちは、FLT3-ITD変異を導入したマウス由来の細胞を用いて、FLT3阻害剤(キザルチニブおよびギルテリチニブ)に対する治療抵抗性細胞を作製し、新たな治療戦略を探索する実験をおこなった。ROCK阻害剤であるファスジルは、FLT3阻害剤との併用によって、治療抵抗性細胞の増殖をおさえることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、FLT3阻害剤による白血病細胞の耐性化が問題視されている。今回の私たちの研究から、ROCK阻害剤が、FLT3-ITD陽性白血病細胞におけるFLT3阻害剤抵抗性を克服するの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：FLT3 inhibitor-resistant cells were generated by prolonged dose-escalation exposure to quizartinib and/or gilteritinib in FLT3-ITD+ Ba/F3 cells. Combination of Rho-kinase inhibitor, fasudil and FLT3 inhibitor (quizartinib or gilteritinib) reduced proliferation of FLT3 inhibitor-resistant FLT3-ITD+ Ba/F3 cells compared with the same cells treated with quizartinib or gilteritinib alone.

研究分野：血液内科

キーワード：FLT3-ITD 白血病 ROCK FLT3阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML)における internal tandem duplication mutation-Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3-ITD 変異)は、再発リスクの上昇や全生存率の短縮をもたらす予後不良の遺伝子変異である。中枢神経白血病は、血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB)への白血病細胞の侵入という点で、白血病細胞の能動的な生体防御システムの打破による病態といえる。私たちは以前に、FLT-ITD 変異が、FLT3-ITD 陰性細胞に比べて有意に細胞遊走を増大させ、その責任分子が ROCK であることを報告した。近年、FLT3-ITD 陽性白血病における FLT3 阻害剤が一定の効果をあげる一方、FLT3 阻害剤耐性クローンの出現が問題となっている。

## 2. 研究の目的

中枢神経白血病は未だ難治の疾患である。しかし、中枢神経白血病の分子メカニズムはほとんど解明されておらず、これを明らかにすることは新たな治療戦略の開発へつなぐと考えられる。本研究の目的は、白血病細胞が中枢神経系へみずから侵入する中枢神経白血病に対する新たな治療標的分子を同定することである。

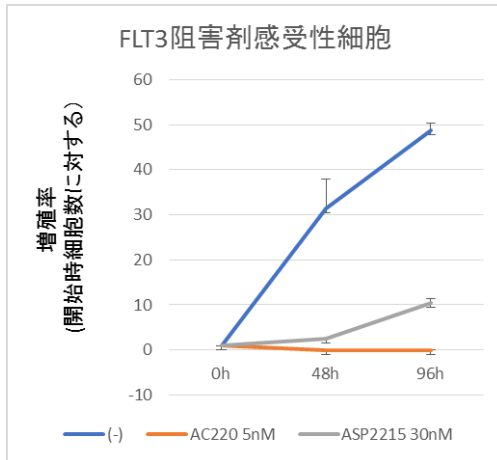
## 3. 研究の方法

- (1) AML 患者由来の ITD-FLT3 を導入した ITD-FLT3+Ba/F3 細胞において、CXCL12 に対して遊走した際の ULBP1 の発現を Q-RT-PCR により ITD-FLT3 陰性 Ba/F3 細胞 (wild type FLT3 を導入した細胞) と比較する。
- (2) ITD-FLT3+Ba/F3 細胞に対し、2 種の FLT3 阻害剤 (キザルチニブ、ギルテルチニブ) をそれぞれ dose-escalation しながら添加し、長期に培養することで、FLT3 阻害剤耐性細胞を作製する。
- (3) FLT3 阻害剤耐性細胞において、ROCK 阻害剤と FLT3 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果を検証する。

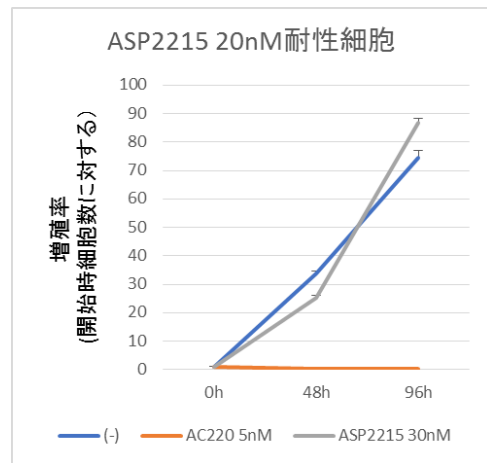
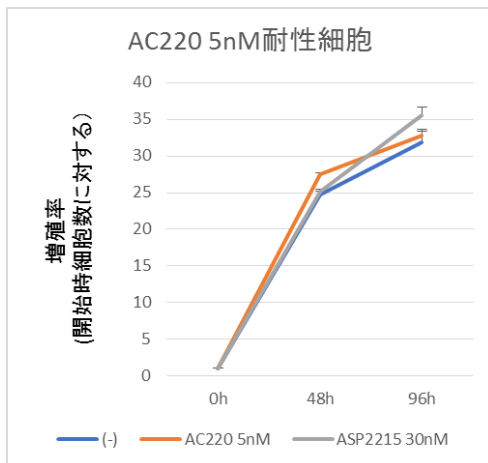
## 4. 研究成果

- (1) 当初、マクロファージに着目して、白血病細胞が BBB を超えて浸潤するメカニズムを解明することを目的としていたが、マクロファージの活性を促進的に制御する UL16 binding protein 1 (ULBP1) の発現が、FLT3-ITD+ Ba/F3 細胞において上昇している結果が Q-RT-PCR による再現実験では証明できなかった。よって、近年問題となっている FLT3 阻害剤耐性における ROCK の関与を検証することとした。
- (2) 5nM キザルチニブ耐性 FLT3-ITD+ Ba/F3 細胞と 20nM ギルテルチニブ耐性 FLT3-ITD+ Ba/F3 細胞を作製した。ギルテルチニブ耐性 FLT3-ITD+ Ba/F3 cells は 5nM のキザルチニブ

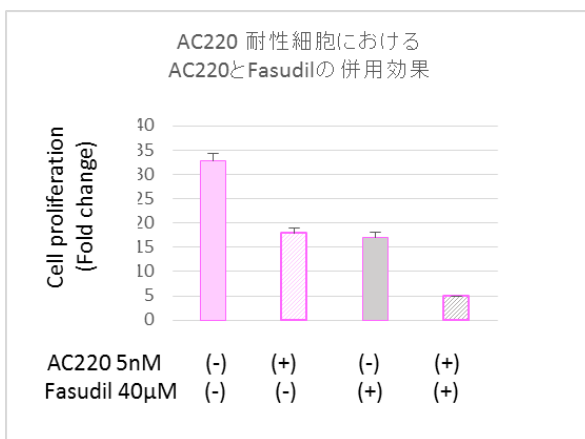
に対して感受性を示したが、キザルチニブ耐性 FLT3-ITD<sup>+</sup> Ba/F3 cells は 30nM のギルテルチニブに対して耐性を示した。

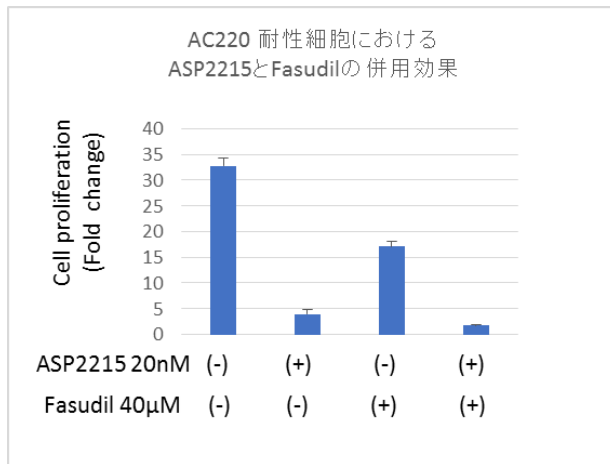
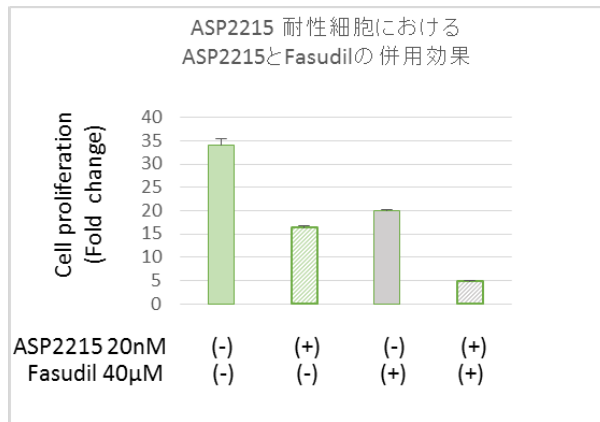


- キザルチニブ(AC220)
- ギルテルチニブ(ASP2215)
- ファスジル(Fasudil)



(3) ROCK 阻害剤であるファスジルはキザルチニブもしくはギルテルチニブとの併用によって、FLT3[阻害剤抵抗性 FLT3-ITD<sup>+</sup> Ba/F3 細胞]の増殖を抑制した。





以上の結果から、ROCK をターゲットとする治療は FLT3-ITD 陽性白血病における過剰な細胞遊走を抑えるだけでなく、FLT3 阻害剤の耐性を克服する治療となりうる可能性が示唆された。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。