

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591102
 研究課題名（和文） マルチ薬剤耐性による難治性白血病へのゲノム薬理学に基づく
 テーラーメイド治療戦略
 研究課題名（英文） Tailor-made therapy based on pharmacogenomic strategy
 for refractory leukemia due to multifactorial drug resistance
 研究代表者
 上田 孝典（UEDA TAKANORI）
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：40160171

研究成果の概要（和文）：しばしば multifactorial な薬剤耐性により難治性である白血病の克服につき、抗がん薬、白血病細胞、宿主（ヒト）3者の相互関係の面から検討した。その結果 Temozolomide による他のアルキル化薬の耐性克服効果、GST-M1 によるリンパ性白血病ステロイド耐性の dual mechanism, シタラビンの効果予測の酵素学的指標、イダルビシンにおける pharmacokinetic self-potentialiation などの興味ある知見を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Tailor-made therapy based on pharmacogenomic strategy for refractory leukemia due to multifactorial resistance was explored from the viewpoint of drug-leukemic cell-human (host) relationship. As a result, circumvention of other alkylating agent resistance by temozolomide, dual mechanism of glucocorticoid resistance in GST-M1 positive lymphoblastic leukemia cell lines, enzymatic marker for cytarabine sensitivity in leukemic cells, pharmacokinetic self-potentialiation of idarubicin were clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病，薬剤耐性，ゲノム薬理学，テーラーメイド治療，シタラビン，イダルビシン，GSTM1

1. 研究開始当初の背景

近年の分子標的治療薬をはじめとする新規抗白血病薬の導入や、薬剤投与方法の進歩、また分子腫瘍学の格段の進展にもかかわらず、

急性白血病の治療成績における画期的な向上は認めない。この大きな理由は、白血病治療は多剤併用で行われるため、難治・再発例においては、複数の薬剤に対する耐性が共

存し (Takemura H, Ueda T, et al, Cancer Res, 2001)、かつ一薬剤に対する耐性機序も multifactorial である (Urasaki Y, Ueda T, et al, Cancer Sci, 1994) にもかかわらず、このことに対する対応がなされず、ともすれば Ara-C 大量療法等の単剤の大量療法での対応、もしくは一つの耐性機序に対する耐性克服薬の使用などが主としてなされることにあると思われる。すなわち、耐性クローンの発現或いはその選択的増殖は、このいわば 1 対 1 的な戦略では克服が困難であるが十分な対応はなされていない状況にあった。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえた治療戦略として (1) 耐性が multifactorial におこること、および (2) 悪性腫瘍の治療には、薬剤・腫瘍・宿主 3 者の相互関係の検討が重要であることを考慮に入れた、集学的薬物療法の戦略モデルを考案する。具体的には、

1) 抗白血病薬の要因：シタラビン等の代表的薬剤耐性のゲノム薬理的解析など (Yamauchi T, Ueda T, Biochem. Pharmacol, 2005)。

2) 白血病細胞の要因：白血病細胞内グルタチオン関連酵素の解析など。

3) 宿主側の要因：アントラサイクリン系薬剤イダルビシンの特異な薬物動態の検討。

の 3 者を総合したテーラーメイド治療戦略のための解析を計画した。このことにより、個々の症例における複数の耐性関連因子の抽出を行い、各々に対するテーラーメイドな治療計画をあわせ実行することの有効性の検討を行う。このことは、臨床的には今だ決め手となる方策の見出せぬ難治性白血病克服への大きな break through となりうる。

3. 研究の方法

1) 抗白血病薬の要因

① 5 種の lineage の白血病細胞株 (HL-60, K562, CEM, THP1, U937) において、5-50 倍程度のシタラビン耐性細胞株を樹立し DNA マイクロアレイにより解析した。

② アルキル化薬 BLNU 耐性 CEM 細胞を樹立し、新アルキル化薬 temozolomide (TMZ) の耐性克服効果につき DNA 修復能との関連を中心に、Comet assay, 修復関連酵素の RT-PCR による解析などにより検討した。

2) 白血病細胞の要因

① Glutathione S-transferase (GST) のサブクラスである GSTM1 は、解毒作用に加え、キナーゼ調節も行う多機能蛋白質である。また、ヒトにおいて遺伝子多型のため約 40% が欠損しており、近年、非欠損小児急性リンパ性白血病 (ALL) 患者では欠損患者に比し再発率が高いことが報告された。そこでその耐性に関する役割を明らかにするため、リンパ性白血病細胞株 CCRF-CEM を用いて GSTM1 を強発現させた細胞株を樹立し、非発現細胞とその薬剤感受性プロファイルについて比較検討した。

② 小児 ALL 患者で Key drug である glucocorticoid 感受性との関連が示唆された G 欠損共役型受容体である Purinergic receptor P2RY5 遺伝子を pre-B ならびに T-ALL 細胞株である 697 および CCRF-CEM にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、腫瘍感受性を比較した。

③ ara-C の細胞内活性化物 ara-CTP の代謝関連因子を解析し感受性予測因子としての重要性を検討した。

3) 宿主側の要因

イダルビシン (IDA) 投与による代謝酵素 carbonyl 還元酵素 (CREs) の活性化とそれによる活性型 13-OH 体イダルビシノール (IDAo1) の産生亢進の可能性につきラット及びその肝細胞由来 RLN-B2 細胞において検討した。

4. 研究成果

1) 抗白血病薬の要因

①5種の耐性細胞すべてで *c19orf2*, *HSPA8* の発現上昇, *LGALS1*, *POU4F3*, *PSAP* などの発現低下を認めた。これらは、アポトーシス, *survival pathway*, 分子シャペロンに関わる遺伝子群であるが、いずれも著明な上昇ではなく、その意義の明確化のためさらなる検討を行っている。

②TMZ は、monofunctional なアルキル化薬である。一方、BCNU は通常 bifunctional であり、興味あることに BCNU 耐性細胞では TMZ に collateral sensitivity を認めた。その機序として BCNU 耐性細胞では、DNA 切断の修復過程が亢進しているが、TMZ はこのミスマッチペア時により大量に DNA 鎖に作用するため感受性が亢進するものと推測され、臨床的有用性が期待された。

2) 白血病細胞の要因

①レトロウイルスを用いて遺伝子導入した *GSTM1* 発現細胞では非発現細胞と比較して dexamethasone (DEX) に約 10 倍の耐性 ($p < 0.01$) を獲得し、chlorambucil, melphalan, carmustine などのアルキル化薬と亜砒酸に軽度耐性 ($p < 0.01$) を示した。*GSTM1* 発現細胞における DEX 耐性の機序として、グルタチオン抱合による解毒機構の関与は阻害薬を用いた実験系により否定的であり、*GSTM1* による apoptosis の抑制機構の関与が認められた (図 1)。そのひとつとして、*GSTM1* 発現細胞では DEX による p38-MAPK のリン酸化の抑制と、その下流にあり apoptosis に直接関与する BH3 only protein である Bim の発現抑制を認めた (図 2)。更に、*GSTM1* 発現細胞では Nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) p50 の構成的活性化をきたしており ($p < 0.05$)、p50 の活性化因子である Bcl-3 の発現上昇も認めた。NF-kappa B 阻害薬の存在下では *GSTM1* 発現細胞において DEX による Bim の発

現誘導され、非発現細胞と比較して耐性度も 2 倍まで減弱した。

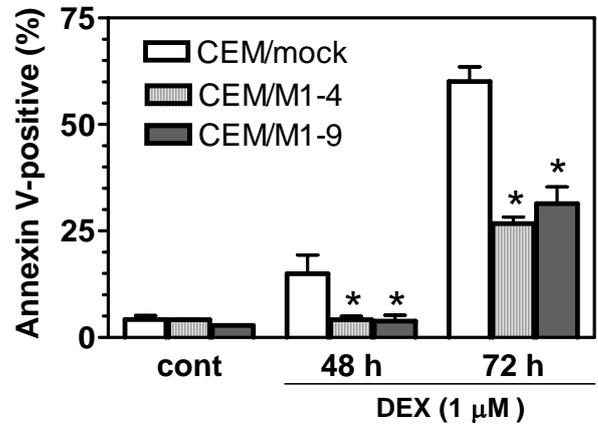
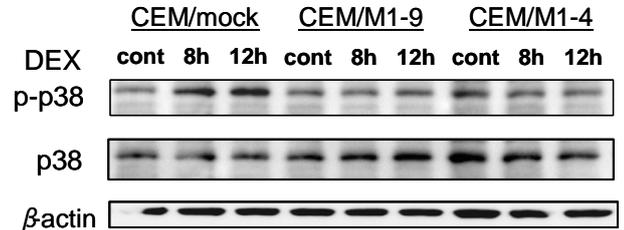


図 1. *GSTM1* 発現と DEX によるアポトーシス抑制。2 種の *GSTM1* 発現クローン (CEM/M1-4, CEM/M1-9) において Annexin V 陽性率により DEX 誘導アポトーシスの抑制を認めた。

(* $p < 0.01$)

a)



b)

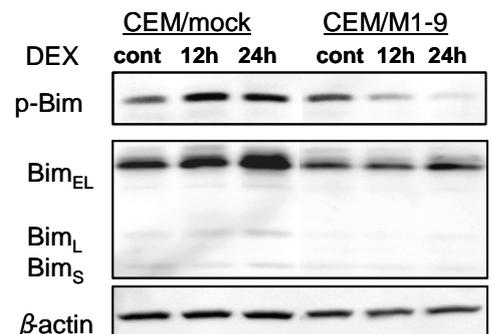


図 2. *GSTM1* 発現細胞における DEX に誘導された a) p38-MAPK および b) Bim のリン酸化の抑制 (Western blot 法による)。

以上の如く、GSTM1 と DEX 耐性との関連を初めて明らかにし、その機序として p38-MAPK のリン酸化を介した Bim のリン酸化の抑制と、NF-kappa B (p50) を介した Bim の発現抑制という dual mechanism による apoptosis 抑制の獲得という、興味ある知見を見出した。

②P2RY5 遺伝子を過剰発現させた細胞においては、P2RY5 は細胞膜表面に強くその発現を認め、DEX に対する感受性が有意に高値を示し、治療効果との関連性が示唆された。

③細胞内のシタラビン活性化酵素

deoxycytidine kinase(dCK)と Ara-C 三リン酸分解酵素 5'-nucleotidase II (cN-II)の比は、ara-CTP 産生量及び ara-C の感受性と相関することを急性白血病患者から得られた検体で明らかにし、その予後予測因子としての可能性を示唆した (図 3)。

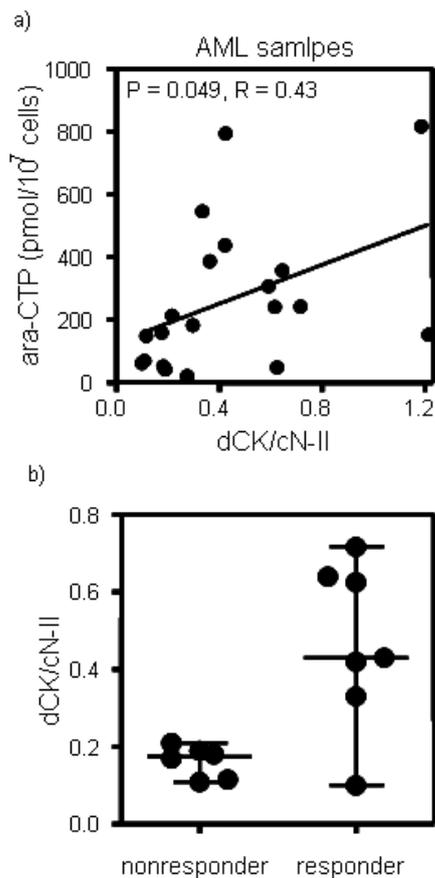


図 3. dCK/cN-II 比は a)AML 群で、ara-CTP 産生量と有意の相関を認め、b)responder (寛

解群) で nonresponder (非寛解群) より高い傾向を認めた。

3)ヒト (宿主) 側の要因

In vitro: ラット肝細胞由来 RLN-B2 細胞を用い 10^{-5} ($p=0.05$), 10^{-4} , ($p<0.05$) $\mu\text{g/ml}$ IDA 存在下での先行培養の結果、IDA 非存在下での培養と比べて高い CRE s 活性を認めた (図 4)。

In vivo: 10 週齢ラットに $0.3\text{mg/kg} \times 2$ 日の IDA 先行投与を行い 1 週間後の摘出肝で CRE s 酵素活性を測定し、IDA 先行投与が酵素活性誘導をもたらすことを示した ($p<0.05$)。さらにこの酵素活性誘導条件下で IDA を静脈内投与し 4 時間後採血で IDA から IDAol への変換率を検討し、酵素活性非誘導群と比べ誘導群における IDA から IDAol への変換率の亢進を示した ($p<0.05$) (図 5)。このように IDA 先行投与により CRE s が活性化され、先行投与による酵素活性誘導下での IDA 投与 4 時間後の IDA から IDAol への変換率の亢進は IDAol の AUC の亢進をもたらすことが推測された。他のアンソラサイクリン系薬剤では 13-OH 体の抗腫瘍活性は弱く、CRE s の活性化が無毒化 (detoxification) による薬剤耐性に向かう可能性があるのに対して IDA の場合は 13-OH 体は抗腫瘍活性を示すため複数回投与により CRE s を誘導し薬物動態が変化することにより、抗腫瘍効果が増強することを示唆し、薬物動態的自己増強 (pharmacokinetic self-potential) という、新たなる概念を提唱した。

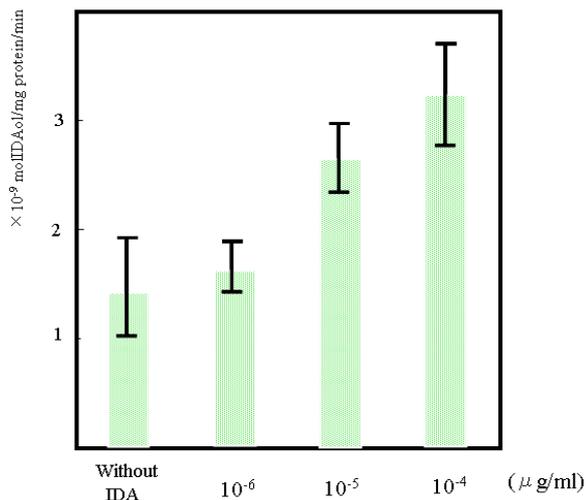


図 4. RLN-B2 細胞における IDA 先行投与時の CRE s の誘導による IDAol の産生増加。
10⁻⁵(p=0.05), 10⁻⁴(p<0.05) μg/ml

	Control group (n=11)	IDA preadministered group (n=11)	
Conversion rate	0.263 ± 0.091	0.425 ± 0.12	p<0.05

Conversion rate : $AUC_{IDAol} / AUC_{IDA} + AUC_{IDAol}$

図 5. ラットにおける IDA 先行投与による IDAol への変換率の亢進

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 13 件)

- ① N. Hosono, S. Kishi, S. Iho, Y. Urasaki, A. Yoshida, H. Kurooka, Y. Yokota, T. Ueda, Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line, *Cancer Sci*, 査読有、101、2010、767-773
- ② T. Yamauchi, R. Nishi, K. Kitazumi, T.

Nakano, T. Ueda, A new high-performance liquid chromatography method determines low production of 9-β-D-arabinofuranosylguanine triphosphate, an active metabolite of nelarabine, in adult T-cell leukemia cells, *Oncology Rep*, 査読有、23、2010、499-504

- ③ T. Yamauchi, E. Negoro, S. Kishi, K. Takagi, A. Yoshida, Y. Urasaki, H. Iwasaki, T. Ueda, Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells, *Biochem Pharmacol*, 査読有、77、2009、1780-1786
- ④ T. Yamauchi, M. Ogawa, T. Ueda, Carmustine-resistant cancer cells are sensitized to temozolomide due to enhanced mismatch repair during the development of carmustine resistance, *Mol Pharmacol*, 査読有、74、2008、84-91
- ⑤ K. Inai, K. Takagi, N. Takimoto, H. Okada, Y. Imamura, T. Ueda, H. Naiki, S. Noriki, Multiple inflammatory cytokine-productive ThyL-6 cell line established from a patient with thymic carcinoma, *Cancer Sci*, 査読有、99、2008、1778-1784
- ⑥ I. Sakamaki, K. Inai, Y. Tsutani, T. Ueda, H. Tsutani, Binding of monosodium urate crystals with idiotypic protein efficiently promote dendritic cells to induce cytotoxic T cells, *Cancer Sci*, 査読有、99、2008、2268-2273
- ⑦ K. Morinaga, T. Yamauchi, S. Kimura, T. Mae

kawa, T. Ueda, Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib, and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with BCR-ABL gene amplification, *Int J Cancer*, 査読有、122, 2008, 2621-2627

- ⑧ T. Yamauchi, E. Negoro, H. Arai, S. Ikegaya, K. Takagi, H. Takemura, K. Inai, A. Yoshida, Y. Urasaki, H. Iwasaki, T. Ueda, Combined low-dose cytarabine, melphalan and mitoxantrone for older patients with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome, *Anticancer Res*, 査読有、27, 2007, 2635-2639

[学会発表] (計 12 件)

- ① 細野 奈緒子、岸 慎治、伊保 澄子、浦崎 芳正、上田 孝典、白血病細胞株における P2RY5 遺伝子発現による glucocorticoid 感受性の検討、第 70 回日本血液学会総会、2008. 10. 11、国立京都国際会館
- ② E. Negoro, Y. Urasaki, T. Yamauchi, T. Ueda, Characterization of resistance to cytosine arabinoside (Ara-C) in leukemia cells with five different cell lineage, The 99th AACR Annual Meeting, 2008. 4. 14, San Diego, U. S. A.
- ③ N. Hosono, S. Kishi, S. Iho, Y. Urasaki, A. Yoshida, H. Kurooka, Y. Yokota, T. Ueda, Unique resistance mechanism to dexamethasone by Glutathione S-transferase M1 involving p38 MAPK and NF- κ B pathways, possible prognostic role for childhood ALL, The

49th ASH Annual Meeting, 2007. 12. 8, Atlanta, U. S. A.

- ④ 山内 高弘, 上田 孝典、Cytarabine sensitivity of leukemic cells determined by the intracellular pharmacokinetics、第 66 回日本癌学会総会、2007. 10. 4、横浜市

[図書] (計 6 件)

- ① 上田 孝典、南江堂、悪性リンパ腫治療マニュアル (改訂第 3 版)、2009、80-83
- ② 上田 孝典、篠原出版新社、入門腫瘍内科学、2009、114-119
- ③ 上田 孝典、日本医事新報社、造血器腫瘍アトラス-形態、免疫、染色体と遺伝子-、2009、440-450
- ④ 上田 孝典 (分担)、南江堂、白血病治療マニュアル改訂第 3 版、2009、181-189

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 孝典 (UEDA TAKANORI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40160171

(2) 研究分担者

吉田 明 (YOSHIDA AKIRA)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80252005
山内 高弘 (YAMAUCHI TAKAHIRO)
福井大学・医学部・講師
研究者番号：90291377
岸 慎治 (KISHI SHINJI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：30334816