

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08825

研究課題名(和文) ゲノム編集によるFLT3変異改変ヒト白血病細胞の作製と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Development of the novel target therapy for leukemia with FLT3 mutations, using genetically modified FLT3-mutation knock-in human myeloid leukemia cells

研究代表者

花村 一郎 (Hanamura, Ichiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70440740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FLT3変異陽性の白血病患者の多くは、従来化学療法に不応である。また、近年開発されたFLT3阻害薬の効果も不十分である。

本研究では、FLT3変異白血病の予後改善を目指し、独自に作製したFLT3変異改変ヒト白血病株とFLT3野生型の親株とで比較解析を行い、新規候補薬を探索・同定した。

本研究において、我々は、FLT3変異改変株では、STAT5の活性化に関連してCD52発現が亢進すること、抗CD52抗体アレムツズマブが、ADCCを介して高い抗腫瘍効果を発揮することを新たに見出した。すなわち、本研究により、アレムツズマブが、難治性血液がんであるFLT3変異白血病の、新規候補薬であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変細胞を利用した細胞実験では、遺伝子過剰発現系の細胞実験と比較して、変異遺伝子の機能を正確に解析できる。

本研究の学術的意義は、FLT3変異改変細胞を利用すれば、FLT3変異白血病の新規の分子病態や候補治療薬の発見が可能であることを示せたことである。本研究成果をもとに、FLT3変異白血病に対するアレムツズマブの臨床試験が実施され、適応拡大にいたれば、患者の予後改善に直結するため、本研究の社会的意義は大きい。既認可薬であるアレムツズマブの有害事象は想定範囲内である。また、アレムツズマブは、既存の抗がん剤やFLT3阻害剤と抗腫瘍機序が異なるため、併用薬としても期待できる。

研究成果の概要(英文)：Patients with acute myeloid leukemia having mutations in the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene are highly refractory to conventional chemotherapy. Recently developed FLT3 kinase inhibitors are clinically active; however, the treatment effect remains unsatisfactory. In this study, we generated genetically modified FLT3-ITD (internal tandem duplication) knock-in human myeloid leukemia K562 cells and investigated alternative therapies for the FLT3-mutated myeloid leukemia. We found that K562-FLT3-ITD cells showed increased expression of CD52 compared to K562-FLT3-wild type (WT) cells. Notably, an anti-CD52 antibody, alemtuzumab, induced significant ADCC in K562-FLT3-ITD cells compared to K562-FLT3-WT cells. In addition, alemtuzumab significantly suppressed the xenograft tumor growth of K562-FLT3-ITD cells in mice. Our findings may allow establishment of an alternative therapeutic option, alemtuzumab, to treat leukemia with FLT3 mutations.

研究分野：血液内科

キーワード：FLT3 CD52 白血病 CRISPR-cas9 ゲノム編集 アレムツズマブ ITD

1. 研究開始当初の背景

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) は、受容体型チロシンキナーゼで、ライガンドと結合すると下流のJAK-STATやRAS-MAPK、PI3K-AKT経路などが活性化し、細胞増殖は亢進する。*FLT3* 遺伝子の変異には遺伝子内縦列重複 (ITD, internal tandem duplications) 変異とチロシンキナーゼドメイン点突然変異とがあるが、これらの変異の結果、FLT3は恒常的に活性化状態となる。*FLT3*変異は急性骨髄性白血病 (AML, acute myeloid leukemia) 患者の約3割で認められ、変異のある患者は、従来化学療法に対して予後不良である。近年、多くのFLT3阻害薬が開発され、*FLT3*変異白血病の予後改善が期待されている。しかしながら、FLT3阻害薬に対する不応例や耐性化例も多く、その効果は不十分である。したがって、*FLT3*変異の克服には、より効果的なFLT3キナーゼ阻害剤の開発に加え、FLT3キナーゼ阻害以外の機序に基づいた新しい治療薬の開発が必要である。

そうした中、我々は、*FLT3*野生型のヒト白血病細胞株K562にゲノム編集をほどこし、独自に*FLT3*-ITD変異改変細胞株の樹立に成功した。遺伝子改変細胞は、従来の変異遺伝子導入法と異なり、変異遺伝子の過剰発現を来さないため、変異遺伝子の機能解析を正確に行える。我々は、*FLT3*-ITD変異改変K562株と*FLT3*野生型の親K562株のisogenic cell line間で比較解析実験を行えば、治療標的となる新規候補分子が発見できると考えた。

2. 研究の目的

FLT3-ITD変異改変ヒト白血病細胞を利用した、*FLT3*-ITD変異白血病に対する新規の候補治療薬の開発。

3. 研究の方法

ヒト骨髄性白血病株K562を用いて独自に樹立した*FLT3*-ITD改変K562株と、*FLT3*野生型の親K562株とで、以下に示したAからDの比較解析実験を行った。最初に、細胞増殖能や、細胞内シグナル変化などをisogenic cell line間で比較解析し、独自に樹立した*FLT3*-ITD改変K562株の性状解析を行った。次に、*FLT3*-ITD白血病の新規候補治療分子の探索を、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現比較や、化合物ライブラリーによるスクリーニング解析など利用して行った。候補分子の一つとしてCD52を同定し、抗CD52抗体アレムツズマブの、ADCC活性の比較やゼノマウスモデルでの抗腫瘍効果を検討した。

- A. MTTアッセイやコロニー形成アッセイ、アポトーシスアッセイにより、細胞増殖能やコロニー形成能、アポトーシス誘導の差を比較した。また、FLT3やAKT、STAT5などのリン酸化レベルをウェスタンブロットで比較解析した。
- B. cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の比較解析により、*FLT3*-ITD改変により発現変化する遺伝子をスクリーニングした。これらのうち、治療標的となりうると思った分子 (細胞増殖や薬剤耐性に関連した分子や、抗体やCART細胞などの標的となりうる細胞膜表面分子など) については、RT-PCRやウェスタンブロット、フローサイトメーターなどを用いて、isogenic cell line間での発現レベルの差を検証した。一部の分子は、*FLT3*-ITD改変株を*FLT3*-WTに再改変した細胞も利用して、ITD改変によって生じる遺伝子発現変化を

再検証した。

- C. 上述Bの実験から、**最初にCD52を候補分子として同定**し、*FLT3*-ITD改変株におけるCD52の発現亢進機序や、抗CD52抗体アレムツズマブによるADCC活性、ゼノマウスモデルを用いてアレムツズマブの抗腫瘍効果を検討した。
- D. 現在、他の候補分子の阻害剤や抗体薬の抗腫瘍効果を検討するとともに、化合物ライブラリーを用いて、*FLT3*-ITD改変株の細胞増殖を有意に抑制する化合物を探索・検証中である。

4. 研究成果

FLT3-ITD改変K562株では、*FLT3*野生型である親K562株と比較して、細胞増殖能およびコロニー形成能は低下し、アポトーシス細胞は増加した。これは、慢性骨髄性白血病の急性転化株であるK562株では、すでにBCR-ABLタンパクによる強力な増殖シグナルが入っており、K562細胞にさらに*FLT3*-ITD増殖シグナルが追加されることで“oncogenic death”が惹起されるためと推測した。また、*FLT3*-ITD改変K562株では、親K562株と比較して、*FLT3*やAKT、STAT5のリン酸化の亢進を認めた。

cDNAマイクロアレイによる比較解析から得られた候補治療標的分子のうち、まず、CD52に着目して実験を進めた。理由は、抗CD52抗体アレムツズマブは、慢性リンパ性白血病に対して、また同種造血細胞移植時のGVHD予防薬として、すでに国内認可されているため、臨床治験の実施が比較的容易と考えられたためである。

FLT3-ITD改変K562株における、CD52発現の亢進は、RT-PCRやウェスタンブロット、フローサイトメトリ解析で再確認できた。また、*FLT3*-ITD改変K562株におけるCD52の発現亢進は、STAT5阻害薬pimozideで抑制されたが、AKT阻害薬afuresertibでは抑制されなかった。したがって、*FLT3*-ITD改変K562株におけるCD52発現亢進に、STAT5活性化の関与が示唆された。

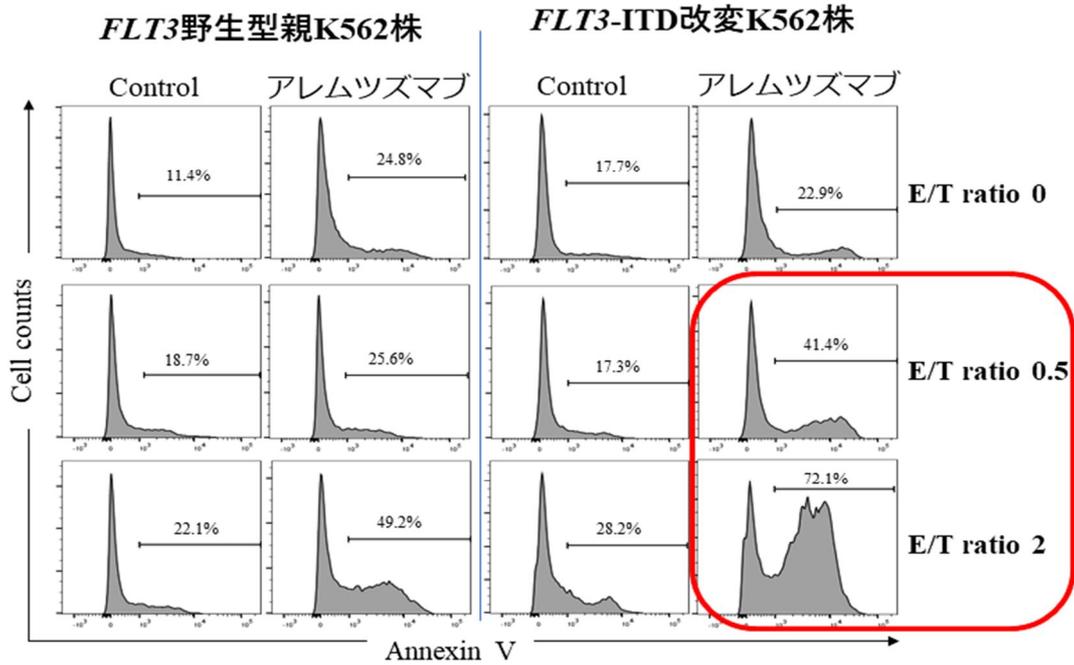
アレムツズマブのADCC活性は、*FLT3*-ITD改変K562株で有意に高かった（図1）。さらに、アレムツズマブは、SCIDマウスの皮下に移植した*FLT3*-ITD改変K562株の腫瘍増殖を著明に抑制した（図2）。

以上より、*FLT3*-ITD改変K562株ではCD52の発現が亢進し、**抗CD52抗体アレムツズマブは、*FLT3*-ITD改変K562株に対して、ADCCを介して高い抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。**

これらの結果は論文報告済みである（Cell Death Discov. 2021;7(1):121）。

現在、AML患者における*FLT3*変異の有無によるCD52発現の差の解析や、アレムツズマブを用いた臨床治験を検討・計画している。また、上述3のDのとおり、*FLT3*-ITD変異改変ヒト白血病細胞を利用して、他の候補治療薬を探索中である。同時に、AML株でも*FLT3*-ITD変異改変株を樹立中で、K562株での実験結果の検証とともに、有望治療法の探索を行う予定である。

図1. アレムツズマブのADCC活性はFLT3-ITD改変細胞で高い



E, effector細胞: 健常者NK細胞
 T, target細胞: 親K562またはFLT3-ITD改変細胞

図2. アレムツズマブはマウス皮下に移植したFLT3-ITD改変細胞の増殖を抑制

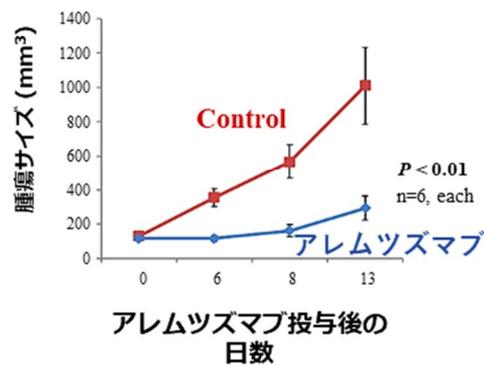
FLT3-ITD改変K562腫瘍

14日目

Control (PBS)



アレムツズマブ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Karnan Sivasundaram, Hanamura Ichiro, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00446-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花村一朗、カルナン・シバスンダラン、太田明伸、鈴木進、高杉壮一、中村文乃、高橋美裕希、村上五月、上田龍三、細川好孝、高見昭良
2. 発表標題 CD52はFLT3-ITD変異白血病の新規治療標的である
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花村一朗、カルナン・シバスンダラン、太田明伸、高杉壮一、中村文乃、高橋美裕希、内野かおり、村上五月、水野昌平、鈴木進、上田龍三、細川好孝、高見昭良
2. 発表標題 ゲノム編集をもちいた FLT3-ITD 変異白血病の新規治療標的の探索
3. 学会等名 第4回 東海北陸 HLA 研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 明伸 (Ota Akinobu) (30438048)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	シバスンダラン カルナン (Sivasundaram Karnan) (30557096)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	鈴木 進 (Suzuki Susumu) (70518422)	愛知医科大学・公私立大学の部局等・准教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関