

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(スタートアップ)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20890097
 研究課題名(和文) 慢性骨髄性白血病幹細胞の同定と治療モデルの開発
 研究課題名(英文) Development of model and targeted therapy for BCR-ABL positive leukemia

研究代表者
 南 陽介 (MINAMI YOSUKE)
 名古屋大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：60513752

研究成果の概要(和文)：

Ph 陽性白血病幹細胞の薬剤耐性検討のため、患者細胞を免疫不全 NOG マウスに移植継代する系において、静止期 CD34 陽性分画は、BCR-ABL 脱リン酸化にも関わらず ABL キナーゼ阻害剤イマチニブ不応性を示し、mTOR 阻害剤エベロリムスはそれらの分画を含めて細胞死を誘導し、T315I 変異をもつ耐性細胞株に対しても有効であった。詳細なバイオマーカーの検討、in vivo 効果を検討中であるが、Ph 陽性白血病幹細胞と T315I 変異によるイマチニブ耐性に対して、エベロリムスが有望な選択肢となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Recent studies suggest that leukemia stem cells (LSCs) are responsible for relapse of leukemia following conventional or targeted agents and that aberrant activation of mTOR signaling is involved in LSCs. To examine mechanisms of drug resistance in Ph-positive (Ph+) LSCs and seek strategies to overcome the resistance, Ph+ leukemia patient cells were serially xenotransplanted into immunodeficient NOG mice. Spleen cells derived from leukemic NOG mice were co-cultured with S17 stromal cells (Minami, et al., PNAS, 2008) and treated with imatinib and the mTOR inhibitor, everolimus (RAD001). While quiescent CD34+ cells were insensitive to imatinib in spite of BCR-ABL-dephosphorylation, substantial cell death including CD34+ population was induced by treatment with nM level of everolimus. In imatinib-resistant Ph+ leukemia cell lines harboring T315I-mutation, everolimus induced cell death with low IC50 values in PI-exclusion assays. We are also investigating detailed biomarkers during the cell death such as phospho-S6K and in vivo effects of these drugs. These results imply that treatment with everolimus can overcome the resistance to imatinib in Ph+ LSCs or T315I-mutated cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

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・幹細胞・キナーゼ阻害剤・BCR-ABL・mTOR シグナル

1. 研究開始当初の背景

近年の白血病研究において、少数の白血病幹細胞 (leukemia stem cells; LSCs) が、正常細胞に類似した分化過程を経て多彩な腫瘍組織を生み出すことや、従来の治療法に対して耐性であることが示されつつある。BCR-ABL 陽性 (Ph⁺) 白血病に対して、ABL キナーゼ阻害剤を用いた効果的な治療法が第1選択となったが、治癒の為には LSCs を適切に同定し、それらを標的とした選択的な細胞死誘導が可能となる治療が必要であると考えられている。

2. 研究の目的

最近、腫瘍細胞の全ての細胞は少数の癌性幹細胞 (Cancer stem cells) に由来し、この癌性幹細胞が正常細胞に類似した分化過程を経ることによって多彩な腫瘍組織を生み出しているということが、白血病をはじめいくつかの癌腫で示唆されている。慢性骨髄性白血病 (CML) に対する ABL キナーゼ阻害剤イマチニブ治療の様に、白血病に対し効果的な治療法が生み出されつつあるものの、長期的な治癒を得る為には白血病幹細胞 (Leukemia stem cells) を同定することとともに、それらを標的として選択的に細胞死誘導させる様な治療法を開発していくことが必要であると考えられている。本研究では、マルチカラー・フローサイトメトリー (FCM) の技術を用いて、白血病臨床検体におけるより精度の高い白血病幹細胞の同定・分離を試みるとともに、ヒトの免疫・造血系を容易に再構築できる免疫不全マウス (NOG マウス) に移植する

ことによって、よりヒト造血系を反映した白血病幹細胞マウスモデルを構築し、そのモデルを用いて、白血病幹細胞を標的とした治療法の開発に繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) これまで、CML 急性転化期における白血病幹細胞を同定した Catriona JM Jamieson 博士らとの共同研究によって、マウス多能性造血前駆細胞 (mHPC) を用いた CML 幹細胞モデルを樹立したが、引き続き、BCR-ABL 陽性白血病患者細胞を免疫不全マウス (NOG マウス) に移植することで継代可能な白血病細胞を用いて解析できる系を確立する。

(2) NOG マウスの系を用いて、プロテアゾーム阻害剤、mTOR 阻害剤など、新規薬剤の BCRABL 陽性白血病幹細胞に対する細胞死誘導効果の検討を進める。

4. 研究成果

Ph 陽性白血病幹細胞の薬剤耐性機序やその克服戦略の検討のため、BCR-ABL 陽性白血病患者細胞を免疫不全 NOG マウスに移植継代する系と、白血病 NOG マウス脾細胞をストローマと共培養系を構築した。ABL キナーゼ阻害剤イマチニブと mTOR 阻害剤エベロリムス (RAD001) 処理を行なった。静止期状態にある CD34 陽性分画は、BCR-ABL の脱リン酸化にも関わらずイマチニブに不応性を示した。一方、nM レベルのエベロリムスはそれらの分画を含めて細胞死を誘導するとともに、T315I 変異をもつイマチニブ耐性白血病細胞株に対しても有効であった。更に、詳細なバイオマ

ーカーの検討、および *in vivo* における効果を検討中である。以上の結果より、BCR-ABL陽性白血病幹細胞と T315I 変異に対するイマチニブ耐性に対して、エベロリムスが有望な選択肢となることが示唆された。

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 10 件)

1) BCR-ABL-independent and RAS/MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4
M Suzuki, A Abe, S Imagama, Y Nomura, R Tanizaki, Y Minami, F Hayakawa, Y Ito, A Katsumi, K Yamamoto, N Emi, H Kiyoi and T Naoe

Eur J Haematol, 84 (3): 229-238, 2010
査読有

2) Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and reestablishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOG mice
R Tanizaki, Y Nomura, Y Miyata, Y Minami, A Abe, A Hanamura, M Sawa, M Murata, H Kiyoi, T Matsushita and T Naoe
Cancer Sci, 101 (3): 631-638, 2010
査読有

3) The CML stem cell: evolution of the progenitor
SA Stuart, Y Minami and JYJ Wang
Cell Cycle, 8 (9): 1338-1343, 2009

査読有

4) KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation
Y Shiotsu, H Kiyoi, Y Ishikawa, R Tanizaki, M Shimizu, H Umehara, K Ishii, Y Mori, K Ozeki, Y Minami, A Abe, H Maeda, T Akiyama, Y Kanda, Y Sato, S Akinaga and T Naoe
Blood, 114 (8): 1607-1617, 2009

査読有

5) 慢性骨髄性白血病におけるイマチニブ耐性とその克服
南陽介 直江知樹
がん分子標的治療 第7巻 第1号: 26-30、2009年
査読無し

6) E2A 欠損多能性前駆細胞を用いた BCR-ABL 陽性白血病幹細胞モデル
南陽介
分子細胞治療 第8巻 第2号: 74-75、2009年
査読無し

7) 慢性骨髄性白血病におけるイマチニブ耐性とその克服
南陽介 直江知樹
癌と化学療法 第36巻 第4号: 544-547、2009年
査読無し

8) チロシンキナーゼ阻害剤による造血器腫瘍の治療
南陽介 直江知樹
Medical Science Digest 第35巻 第5号:

10-13、2009年

査読無し

9) BCR-ABL-transformed GMP as myeloid leukemic stem cells

Y Minami, SA Stuart, T Ikawa, Y Jiang, A Banno, IC Hunton, DJ Young, T Naoe, C Murre, CHM Jamieson and JYJ Wang

Proc Natl Acad Sci USA, 105 (46): 17967-17972, 2008

査読有

10) Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia after imatinib therapy

A Abe, Y Minami, F Hayakawa, K Kitamura, Y Nomura, M Murata, A Katsumi, H Kiyoi, CHM Jamieson, JYJ Wang and T Naoe

Int J Hematol, 88 (5): 171-175, 2008

査読有

[学会発表] (計15件)

1) Treatment with mTOR inhibitor, everolimus (RAD001) overcomes resistance to imatinib in Ph-leukemia quiescent or T315I-mutated cells

Y Minami, M Minami, Y Kuwatsuka, R Tanizaki, H Kiyoi and T Naoe

AACR; Cell Death Mechanisms and Cancer Therapy (Poster presentation), San Diego, USA, 2010.2.1

2) Treatment with mTOR inhibitor, everolimus (RAD001) overcomes resistance to imatinib in Ph-leukemia quiescent or T315I-mutated cells

Y Minami, M Minami, Y Kuwatsuka, R Tanizaki,

Y Nomura, A Abe, H Kiyoi and T Naoe
51st ASH meeting (Poster presentation), New Orleans, USA, 2009.12.6

3) Treatment with mTOR inhibitor, everolimus (RAD001) overcomes resistance to imatinib in Ph-leukemia quiescent or T315I-mutated cells

Y Minami

Workshop on Myeloid Development (Oral presentation), New Orleans, USA, 2009.12.4

4) Hsp90 inhibitor overcomes resistance to FLT3 inhibitor in FLT3/ITD-leukemia with N676K-mutation

南陽介 野村由佳 安部明弘 石川裕一
早川文彦 谷崎亮平 鎌塚八千代 清井仁
直江知樹

第71回日本血液学会総会(一般口演)、京都、2009.10.19

5) Ph 陽性白血病幹細胞におけるイマチニブ耐性とボルテゾミブによる克服の可能性

南陽介 鎌塚八千代 谷崎亮平 安部明弘
直江知樹

第68回日本癌学会総会(一般口演)、横浜、2009.10.12

6) Evaluation of BCR-ABL-positive leukemia stem cells: strategies for overcoming the resistance to imatinib

Y Minami

Gordon Research Conferences, Stem Cells & Cancer (Selected plenary speech & poster presentation), Les Diablerets, Switzerland, 2009.9.12

7) Ph 陽性白血病幹細胞におけるイマチニブ

耐性とボルテゾミブによる克服の可能性
南陽介 銚塚八千代 谷崎亮平 野村由佳
安部明弘 清井仁 直江知樹
第18回日本Cell Death学会(一般口演)、
長崎、2009.8.7

8) Evaluation of BCR-ABL-positive leukemia
stem cells with imatinib-therapy and apoptosis
induced by bortezomib-treatment

南陽介 安部明弘 銚塚八千代 野村由佳
谷崎亮平 直江知樹
第7回幹細胞シンポジウム(一般演題)、東
京、2009.5.14

9) 変異FLT3陽性白血病細胞におけるFLT3
選択的阻害剤耐性の克服:Hsp90阻害剤併用
療法の可能性

南陽介 野村由佳 安部明弘 谷崎亮平 銚
塚八千代 清井仁 直江知樹
第7回日本臨床腫瘍学会総会(一般口演)、
名古屋、2009.3.6

10) Treatment of Hsp90 inhibitor, 17-AAG
overcomes resistance to FLT3-selective
inhibitors in FLT3/ITD-positive leukemia
cells harboring N676K-mutation

南陽介 野村由佳 安部明弘 谷崎亮平 銚
塚八千代 清井仁 直江知樹
第1回名古屋大学医学部グローバルCOE国際
シンポジウム(一般演題)、名古屋、2009.1.27

11) Hsp90 inhibitor, 17-AAG overcome
resistance of FLT3-inhibitor in
MOLM13N676K

Y Minami, Y Nomura, A Abe, R Tanizaki, Y
Shiotsu, S Akinaga, H Kiyoi and T Naoe
50th ASH meeting (Poster presentation),
San Francisco, USA, 2008.12.8

12) Transformation of E2A-deficient
pluripotent progenitors by BCR-ABL generates
imatinib-resistant leukemic stem cells
Y Minami, A Abe, T Ikawa, S Stuart, CHM
Jamieson, T Naoe and JYJ Wang
50th ASH meeting (Poster presentation),
San Francisco, USA, 2008.12.7

13) Evaluation of residual leukemia stem
cells in chronic myeloid leukemia with
imatinib therapy

南陽介 安部明弘 銚塚八千代 早川文彦
谷崎亮平 勝見章 清井仁 直江知樹
第67回日本癌学会総会(ワークショップ)、
名古屋、2008.10.19

14) 慢性骨髄性白血病幹前駆細胞に対する
イマチニブの効果:マウス多能性造血細胞モ
デル及び治療後残存腫瘍解析

南陽介 安部明弘 伊川友活 早川文彦 北村
邦朗 野村由佳 Catriona HM Jamieson Jean
YJ Wang 直江知樹
第70回日本血液学会総会(一般演題)、京
都、2008.10.12

15) Transformation of E2A-deficient
pluripotent progenitors by BCR-ABL generates
imatinib-resistant leukemic stem cells

南陽介 伊川友活 安部明弘 Catriona HM
Jamieson 直江知樹 Jean YJ Wang
第6回幹細胞シンポジウム(一般演題)、東
京、2008.5.12

[図書](計1件)

1) Imatinibの分子作用機構と慢性骨髄性白
血病の治療

南陽介 直江知樹

がんの基礎から臨床へ(ベンチからベッドサ

イドへ): 118-122、2008年

査読無し

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 陽介 (MINAMI YOSUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 60513752