

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390273

研究課題名(和文) 難治性血液腫瘍疾患に対する新規治療法の開発と新規細胞死機序の探索

研究課題名(英文) Development of new therapy and search for new cell death mechanism in hematologic malignancies

研究代表者

足立 壯一 (Adachi, Souichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10273450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：難治性血液腫瘍疾患の新規治療法の開発を目指し、(1)難治性白血病のin vivoにおける細胞死機序の探索(2)難治性白血病の新規予後因子の探索(3)急性骨髄性白血病(AML)の微小残存病変(MRD)細胞の機能の検討、を行った。(1)Dasatinib投与後のNOGマウス(Ph1 ALL患者検体移植)の骨髄、脾臓、肝臓、中枢神経系においてautophagyが観察された。(2)AML-05患者検体のKIT変異を解析し変異陽性例は陰性例と比較して、無病生存率の低下、再発率の上昇が見られた。(3)骨髄回復期のCD34+CD33+細胞で、ダウン症候群患児のみ、CD56が発現していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have done the following three projects to develop new therapies for chemo-resistant hematologic malignancies. (1) To search new cell death mechanism of refractory leukemia in vivo (2) To search new prognostic factors in refractory leukemia (3) Analyze function of cells in minimal residual disease (MRD) of AML. (1) We detected autophagic cells in bone marrow, liver, spleen and craniospinal system of NOG mouse transplanted Ph1 ALL leukemic cells after treatment of dasatinib. (2) We analysed KIT mutations in AML-05 samples. Event free survivals are poor and relapse rates are high in KIT mutation positive patients. (3) We detected CD56 expression in CD34+CD33+ precursor cells only in Down syndrome patients and not in non-Down syndrome patients. We have to be carefully analyse MRD detection especially in Down syndrome patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：難治性血液腫瘍 アポトーシス オートファジー 新規予後因子 白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

難治性血液腫瘍疾患は、抗癌剤耐性や転移のため死に至るため、新規抗癌剤や分子標的療法薬の開発が必要である。これら新規薬剤の耐性克服、転移抑制の過程で血液腫瘍細胞が *in vivo* において細胞死に至るが、その機序の解析こそが治療法の開発においては必須の研究である。従来、白血病に対する *in vivo* での抗癌剤作用機序はアポトーシスであるとされてきたが、近年、オートファジー、ネクローシス、セネセンスといったアポトーシス以外の細胞死が *in vivo* の系で注目されている。(第69回日本血液学会シンポジウムで発表)我々はすでに難治性白血病や固形腫瘍に対する新規分子標的療法薬のいくつかの細胞死誘導系を *in vivo* 及び *in vitro* に確立し、**新しい細胞死の機序**の報告をしてきた。

2. 研究の目的

難治性血液腫瘍疾患の新規治療法の開発を目指し、(1) 難治性白血病及び難治性固形腫瘍の ***in vivo* における細胞死機序の検索**
(2) 難治性白血病の**新規予後因子の検索**
(3) 急性骨髄性白血病(AML)の**微少残存病変(MRD)分画における白血病幹細胞の同定と機能の検討**、を行う。

3. 研究の方法

(1) 難治性白血病 (Ph+ALL, CML-BC, AML) や 難 治 性 固 形 腫 瘍 (hepatoblastoma, osteosarcoma, rhabdoid tumor) の細胞株及び患者検体を NOG マウスに移植し、白血病あるいは腫瘍化したモデルを作成する。分子標的治療薬 (TKI, HDAC 阻害剤等) にて治療後の各臓器 (骨髄、脾臓、肝臓、中枢神経系) における細胞死誘導機序を検討する。
(2) JPLSG AML05 検体を用いて、予後不良因子 (Evi-1, CXCR4 高発現, BAALC exon 5, Pu.1 変異の有無) 予後良好因子 (CEBPA 変異, AML-ETO 9a の有無) 再発リスク因子 (G-CSF 受容体 type IV の高発現) について検討する。

(3) 再発 AML 患者検体を用いて、FACS による MRD システムを確立し、MRD 分画を CD34+CD38+, CD34+CD38-, CD34-CD38+, CD34-CD38- に分離し、NOG マウスに移植することにより、白血病幹細胞の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) Ph1 陽性白血病患者検体を NOG マウスに移植した系において、dasatinib 投与後の *in vivo* における骨髄、脾臓、肝臓及び中枢神経系における細胞死の解析を行った。透過型電子顕微鏡で観察したところ、濃度 20mg/kg 1 日 2 回、1 日間 dasatinib を投与した全てのマウス (3 匹) において、骨髄、脾臓に加え脳の白血病細胞においてもオートファゴソームの形成が確認できた。骨髄の白血病細胞を用いて LC3 タンパクの免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングを行った。免疫蛍光染色においては、dasatinib 投与群において LC3-II のドットパターンが、ウェスタンブロッティングにおいては、dasatinib 投与群において LC3-II バンドの増強が確認され、autophagy が同定された。

(2) 小児急性 AML の予後因子解析として、AML-05 プロトコール検体を用いて、Evi1 の発現量を測定した。登録症例 377 検体のうち、最終診断において monosomy 7 と診断された検体 9 検体、MLL 再構成 51 検体、FAB 分類 M6 7 検体, M7 31 検体を対象とした。定量結果を元に白血病型ごとの生存曲線を作成した。MLL 再構成症例に関しては、MLL 再構成症例全例での生存曲線に加え、もっとも症例数が多く、臨床的に重要と考えられる MLL-AF9 についても生存曲線を作成した。Monosomy 7, M6, M7 症例では Evi1 高発現群と低発現群で無病生存率 (RFS)、全生存率 (OS) 共に有意差はなかった。MLL 再構成全体では RFS で Evi1(+) が予後不良 ($P < 0.0001$)、MLL-AF9 では RFS、OS とともに Evi1(+) が予後不良であった (RFS; $P < 0.0001$ 、

OS; $P=0.0008$)。AML-05 プロトコル余剰検体を用いて、KIT 変異を解析した。t(8;21)107 例中 45 例(42%)、inv16 31 例中 12 例(39%)に同定され、変異陽性例は変異陰性例と比較して、無病生存率の低下 ($P=0.031$) 再発率の上昇($p=0.019$)が見られたが、全生存率には有意差はなかった ($P=0.901$)。

(3) ダウン症候群に合併した AML (AML-DS)におけるフローサイトメトリーにおける微小残存病変 (MRD) 検出システムの確立を AML-DS から樹立した細胞株 (KPMA1) を用いて行った。0.01%以上の濃度において MRD を確実に検出することができ、FACS による MRD 検出の系が十分に確立できた。すでに、JPLSG D11 プロトコルにおける中央診断施設として、臨床検体を用いて MRD 測定を開始している。また、AML-DS 患者では、治療終了後に、2 カラー法のフローサイトメトリーでの MRD 陽性 4 例とも長期生存していることから、DS 患者の骨髄回復期の抗原発現は非ダウン症 (NDS) 患者とは異なっている可能性が考えられた。DS 児および NDS 児の骨髄、末梢血を用いた FCM 測定により、DS 児の CD34+CD33+ 骨髄前駆細胞には CD56(NCAM)が発現していることが示された。一方、NDS 児においてはほとんど認められなかった。CD56 は DS 児においては、CD34+CD33+CD56+骨髄前駆細胞の存在を考慮した上で評価に用いる必要があり、本成果は、DS-AML における正確な FCM-MRD 評価の一助となることが期待される。

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 8 件)

1. Tomizawa D, Adachi S, et al. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher

incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia* 2013 Dec 27(12):2413-2416

2. Shiba N, Adachi S, et al. *NUP98-NSD1* gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2013 Jul; 52(7):683-693.
3. Toki T, Adachi S, et al. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013 Apr 18;121(16):3181-3184.
4. Sano H, Adachi S, et al. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 2013 Oct;98(4):437-445.
5. Yoshida K, Adachi S, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders *Nature Genet* 2013 Nov; 45 (11): 1293-1299.
6. Tomizawa D, Adachi S, et al. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Haematol* 2013 Nov;98(5):578-588
7. Muramatsu H, Adachi S, et al. Reduced intensity conditioning in allogeneic stem cell transplantation for AML with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2014 May; 61(5): 925-927

8. Shiba N, Adachi S, et al. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol in press*
9. Matsuo H, Itoh H, Adachi S, et al. Prognostic implications of *CEBPA* mutations in pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer Journal in press*

[学会発表](計 13 件)

1. Adachi S. JPLSG studies for AML. St. Jude Ground Rounds (招待講演) 2012年12月11日 Memphis, USA
2. Shimada A, Adachi S, et al. Poor prognosis with different induction rate was observed in children with acute myeloid leukemia and FLT3-ITD according to the ITD/WT allelic ratio: A result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. 2013年12月7日~12月10日、New Orleans, USA
3. Hara Y, Adachi S, et al. Comprehensive fusion gene analysis of pediatric non-Down syndrome acute megakaryo -blastic leukemia. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. 2013年12月7日~12月10日、New Orleans, USA
4. Shiba N, Adachi S, et al. Whole-exome resequencing identifies somatic mutations of BCOR and BCOR1 transcriptional corepressor genes and major cohesion complex component genes in pediatric acute myeloid leukemia. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. 2013年12月7日~12月10日、New Orleans, USA
5. Sano H, Adachi S, et al. CSF3R gene mutations in myeloid malignancy of childhood. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. 2013年12月7日~12月10日、New Orleans, USA
6. Ohki K, Adachi S, et al. Low frequency and poor prognosis of MLL-partial tandem duplications in pediatric acute myeloid leukemia using MLPA method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 trial. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. 2013年12月7日~12月10日、New Orleans, USA
7. 富澤大輔、足立壮一 他、小児急性骨髄性白血病の治療成績：JPLSG AML-05 臨床試験より 第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月19日~4月21日 広島市
8. 長谷川大一郎、足立壮一 他、小児急性骨髄性白血病寛解導入療法において支持療法が有害事象に与える影響：第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月19日~4月21日 広島市
9. Matsuo H, Itoh H, Adachi S, et al. Investigation of the clinical significance of CEBPA mutation in child AML: The JPLSG AML-05 study. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日~10月13日 札幌市
10. Tokumasu M, Itoh H, Adachi S, et al. Prognostic impact of KIT mutation in t(8;21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日~10月13日 札幌市
11. Takahashi H, Adachi S, et al. A diversity of cases in AML with promyelocytic differentiation; A report from JPLSG. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日~10月

13日 札幌市

12. Hiramatsu H, Watanabe K, Adachi S, et al. Four AML patients with Down syndrome who remain minimal residual disease positive without relapse. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日～10月13日 札幌市

13. Shimada A, Adachi S, et al. Chemotherapy prior to HSCT is beneficial for pediatric RAEB/RAEB-T. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11日～10月13日 札幌市

〔図書〕(計 2 件)

1. 足立壮一 直江知樹、堀部敬三監修 チーム医療のための血液がんの標準的化学療法 メディカル・サイエンスインターナショナル社 2013年第1版発行 279-293頁
2. 足立壮一 金倉譲、松村到編集 プリンシプル血液疾患の臨床 ここまできた白血病/MDS治療 中山書店 2013年第1版発行 233～241頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organizati-on-staff/research/human_health/mt0302/

<http://adachilab.web.fc2.com/member.htm>
↓

6. 研究組織

(1)研究代表者；足立 壯一
(ADACHI SOUICHI) 京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10273450

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)

連携研究者； 渡邊健一郎
(WATANABE KEN-ITIROU) 京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20324634

連携研究者 伊藤 洋志

(ITOU HIROSHI) 京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20362387