

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461404

研究課題名(和文) Ph陽性急性リンパ性白血病のチロシンキナーゼ阻害剤抵抗機序の解析と克服

研究課題名(英文) Analyzing the mechanism of TKI-resistance in Ph-positive ALL

研究代表者

近藤 健 (KONDO, TAKESHI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70333606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)では治療困難なフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ球性白血病(Ph+ALL)の治療抵抗性機序の克服を目的とした。FRETの原理を応用して確立したBCR-ABLキナーゼ活性を可視化する技術を用いて、Ph+ALL細胞群に存在するTKI抵抗性を示す細胞集団を同定しTKI抵抗性細胞群において発現亢進している遺伝子を同定した。タンパク修飾系の一つであるSUMO化酵素の発現亢進が観察され、BCR-ABLがSUMO化修飾を受ける事を見いだした。更に、SUMO化阻害剤はPh+ALLの細胞死誘導を引き起こす事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Using the FRET-based drug sensitivity test, we identified and isolated TKI-refractory cell population in Ph-positive ALL. Analysis of gene expression profile in TKI-refractory cells indicated that so many intracellular pathways were activated. One of them was sumoylation pathway. In vitro analysis, we proved that BCR-ABL is sumoylated. Moreover, inhibition of sumoylation effectively induced apoptosis in Ph+ALL cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：BCR-ABL TKI Ph+ALL

#### 1. 研究開始当初の背景

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph1+ALL)は、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の登場により高い寛解率が得られるようになりましたが、高率に再発し、化学療法では治療困難な疾患です。これは白血病細胞の一部は、TKIを含む治療に抵抗性を示すためと考えられ、この課題を克服するにはPh+ALLに存在するTKI抵抗性細胞群の同定および遺伝子発現プロファイルを明らかにし、抵抗性機序の克服が必要と考えられます。

#### 2. 研究の目的

本研究においては、Ph+ALL細胞に混在するTKI感受性および抵抗性細胞群を同定し、それぞれ単離する事により、遺伝子発現プロファイルを明らかにする。TKI感受性および抵抗性細胞群の遺伝子発現を比較して、TKI抵抗性細胞群に特徴的な発現遺伝子を同定し、TKI感受性に与える影響を解析する。また同定遺伝子を分子標的としてTKI抵抗性克服への応用を目指すものである。

#### 3. 研究の方法

1) Ph+ALL由来細胞株にCrklを改変して作成したFRETプローブを導入しBCR-ABLキナーゼ活性をモニタリングした。この細胞に、TKI処理を行う事で、BCR-ABL活性が抑制される細胞群と抑制されない細胞群が同定されるが、蛍光強度をFACSで測定し、各々の細胞を単離した。

2) TKI感受性細胞群、抵抗性細胞群のそれぞれからRNAを抽出し、マイクロアレイにて発現遺伝子の比較を行った。

3) 発現亢進した遺伝子に関して、翻訳後修飾系に関して、BCR-ABLが修飾を受ける事を検討した。

4) 上記3)での翻訳後修飾系の低分子阻害剤によりPh+ALLへの細胞死誘導の確認を行った。

#### 4. 研究成果

TKI感受性細胞、抵抗性細胞を分離、回収し、遺伝子発現プロファイルを明らかにした所、TKI抵抗性細胞では多岐にわたる遺伝子の発現亢進が観察された。これをThe Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)により解析したところ、中でも脂質代謝やSUMO化経路の活性亢進が認められた。

脂質代謝についてはメバロン酸経路の活性亢進が示唆されており、本経路の阻害剤として、高脂血症治療薬であるHMG-CoA阻害剤があるため、TKIとHMG-CoA阻害剤の効果を、Ph+ALL細胞株で確認した。HMG-CoA阻害剤では細胞増殖には影響はなかったが、TKIと併用することにより、TKI抵抗性が解除された。またSUMO化経路については、BCR-ABLが細胞内でSUMO化修飾を受ける事を確認した。SUMO化阻害剤については、ギンコール酸がSUMO化E1酵素を阻害することが報告されているため、Ph+ALL細胞株への効果を検討した所、

強力に細胞増殖を抑制し、細胞死誘導を引き起こす事が確認できた。今後、BCR-ABLがSUMO化修飾により細胞内での機能修飾が生じる可能性を検討する計画である。

#### 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 4件)

- 1) Kasahara K, Kondo T. 18名、17番目) Cytogenetically Unrelated Clones in Acute Myeloid Leukemia Showing Different Responses to Chemotherapy. *Case Rep Hematol.* 2016;2373902, 2016. doi: 10.1155/2016/2373902. 査読有
- 2) Ishida Y, Kondo T. (21名、14番目) Inter-Michinoku Dasatinib Study Group (IMIDAS). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dasatinib in the chronic phase of newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 72:185-93, 2016. doi: 10.1007/s00228-015-1968-y. 査読有
- 3) Haga N, Kondo T. (10名、9番目) Mucocutaneous pyoderma gangraenosa due to trisomy 8 neutrophilic infiltrates in a patient with myelodysplastic syndrome. *Br J Dermatol.* 174(1):239-41, 2016 doi: 10.1111/bjd.14102. 査読有
- 4) Shiratori S, Kondo T. (16名、11番目) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning for mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Hematol Oncol.* 34:9-16, 2016. doi: 10.1002/hon.2162. 査読有
- 5) Takahata M, Kondo T. (12名、9番目) Occurrence of adverse events caused by valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation is reduced by low-dose administration. *Transpl Infect Dis.* 17:810-5, 2015. doi: 10.1111/tid.12456. 査読有
- 6) Shibayama Y, Kondo T. (6名、2番目) Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients. *Oncol Rep.* 33:2176-82, 2015. doi: 10.3892/or.2015.3839. 査読有
- 7) Shiratori S, Kondo T. (16名、14番目) Ultra-high level of serum soluble interleukin-2 receptor at diagnosis predicts poor outcome for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(9):2592-7. doi: 10.3109/10428194.2014.1001985. 査読有

- 8) Iwasaki J, Kondo T, Darmanin S, Ibata M, Onozawa M, Hashimoto D, Sakamoto N, Teshima T. (8名、2番目) FIP1L1 presence in FIP1L1-RARA or FIP1L1-PDGFRA differentially contributes to the pathogenesis of distinct types of leukemia. **Ann Hematol.** 93:1473-81, 2014. doi: 10.1007/s00277-014-2085-1. 査読有
- 9) Shiratori S, Kondo T. (13名、10番目) Stenotrophomonas maltophilia infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. **Clin Transplant.** 28:656-61, 2014. doi: 10.1111/ctr.12356. 査読有
- 10) Hayase E, Kondo T (14名10番目) Epstein-barr virus-associated smooth muscle tumors after bone marrow transplantation. **Transplantation.** 97(1):e1-3, 2014. doi: 10.1097/TP.0b013e31829f7595. 査読有
- 11) Takahashi N, Kondo T, (30名、11番目) Multicenter phase II clinical trial of nilotinib for patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia from the East Japan CML study group evaluation of molecular response and the efficacy and safety of nilotinib. **Biomark Res.** 2:06, 2014 doi: 10.1186/2050-7771-2-6. 査読有
- 12) Shiratori S, Kondo T (12名、10番目) Successful engraftment in HLA-mismatched bone marrow transplantation despite the persistence of high-level donor-specific anti-HLA-DR antibody. **Transplantation.** 96(5):e34-44, 2013. doi: 10.1097/TP.0b013e31829f7595. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

- 1) 近藤 健、大橋一輝、長村登紀子、東條有伸、内田直之、中前博久、矢野真吾、福田隆浩、橋本尚子、鬼塚真仁、高梨美乃子、一戸辰夫、熱田由子、豊嶋崇徳：成人 CML における移植前チロシンキナーゼ阻害剤使用と移植成績の解析～TKI 時代での検討。第 38 回日本造血細胞移植学会総会、2016 年 3 月 4 日 名古屋
- 2) 近藤 健：TKI 登場後の慢性骨髄性白血病治療 第 274 回 日本内科学会北海道地方会 教育セミナー 2015 年 7 月 11 日 旭川
- 3) Kondo T, Ibata I, Iwasaki J, Fujioka Y, Nakagawa K, Darmanin S, Onozawa M, Hashimoto D, Ohba Y, Hatakeyama S,

Teshima T IDENTIFICATION OF FIP1L1-PDGFRA ASSOCIATING MOLECULE THAT LOCATES IN THE NUCLEUS AND AUGMENTS THE ACTIVITY OF FIP1L1-PDGFRA. European Association of Hematology 20<sup>th</sup> Congress in Vienna, June 14<sup>th</sup> 2015, Austria

- 4) Kondo T, Ohba Y, Fujisawa S, Miyagishima T, Mori A, Iwasaki H, Shindo M, Kakinoki Y, Kobayashi N, Yamamoto S, Haseyama Y, Ando S, Kohgo Y, Teshima T. FRET-based drug sensitivity test predicts clinical response of nilotinib in CML-CP patients. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 11 月 1 日 大阪
- 5) Kondo T, Ohba Y, Miyagishima T, Mori A, Iwasaki H, Shindo S, Kakinoki Y, Kobayashi N, Yamamoto S, Haseyama Y, Ando S, Fujimoto N, Nishio M, Kurosawa M, Kohgo Y, Teshima T. MULTICENTER CLINICAL STUDY TO EVALUATE A UTILITY OF FRET-BASED DRUG SENSITIVITY TEST THAT PREDICTS EARLY MOLECULAR RESPONSE IN NEWLY DIAGNOSED CML PATIENTS TREATED WITH NILOTINIB. European Association of Hematology 19<sup>th</sup> Congress in Milan, June 14<sup>th</sup> 2014, Italy
- 6) Kondo T, Fujisawa S, Sato K, Mori A, Imai K, Yamamoto S, Kakinoki Y, Miyagishima T, Tsutsumi Y, Haseyama Y, Wada A, Kurosawa M, Iwasaki H, Imamura M, Teshima T. Impact of Genetic Alterations and MRD Reduction on the Outcome of Intermediate-Risk Acute Myelogenous Leukemia. the 5th JSH International Symposium in Hamamatsu, May 24, 2014

〔図書〕(計 0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 健 (KONDO TAKESHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70333606

### (2) 研究分担者

大場 雄介 (OHBA YUSUKE)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30333505

### (3) 連携研究者

南 陽介 (MINAMI YOSUKE)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60513752