

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19616

研究課題名(和文) Runx1を標的とした治療抵抗性小児AMLに対する新たな治療戦略

研究課題名(英文) Runx1 as a Novel Therapeutic Target against Refractory Pediatric AML

研究代表者

平出 智裕 (Hirade, Tomohiro)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：40638540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：FLT3/ITD + AMLはFLT3/ITD抑制剤に治療抵抗となる。私達は、Runx1がFLT3/ITD抑制剤抵抗に関わることを検証した。FLT3/ITDは細胞増殖亢進と分化抑制作用が示したが、Runx1抑制はいずれの作用も部分的に解除した。FLT3/ITD抑制剤AC220は、当初FLT3/ITD + 32D細胞の増殖を減少したが、その後Runx1発現上昇を伴ってAC220耐性細胞が出現した。一方、Runx1抑制は、耐性細胞の出現と増殖を抑制した。したがって、Runx1は、FLT3/ITD抑制剤耐性の要因であり、FLT3/ITD抑制剤抵抗性のFLT3/ITD + AMLに対する治療標的となりうる。

研究成果の概要(英文)：FLT3/ITD in patients with acute myeloid leukemia (AML), becomes refractory to FLT3 inhibitors. We investigated the function of RUNX1 in FLT3/ITD signaling. FLT3/ITD induced growth-factor-independent proliferation and impaired myeloid differentiation in 32D hematopoietic cells, coincident with increase of RUNX1 mRNA. Silencing RUNX1 expression significantly decreased proliferation and partially abrogated the impaired myeloid differentiation of FLT3/ITD+ 32D cells. Although the number of FLT3/ITD+ 32D cells declined in the presence of FLT3 inhibitor AC220, the cells became refractory to AC220, concomitant with increased expression of RUNX1. Silencing RUNX1 abrogated the emergence and proliferation of AC220-resistant FLT3/ITD+ 32D cells. Our data indicate that FLT3/ITD deregulates cell proliferation and differentiation and confers resistance to AC220 by up-regulating RUNX1 expression, suggesting that RUNX1 represents a therapeutic target in patients with refractory FLT3/ITD+ AML.

研究分野：小児科学

キーワード：AML Runx1 FLT3/ITD

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)患者に見られる FLT3 遺伝子上の FLT3/ITD 変異は、小児では約 10%、成人では 20-30% に検出され、生命予後不良と関連する。これまでにいくつかの FLT3/ITD 抑制剤が開発され、治療が試みられてきたが、いずれも効果は芳しくない。これは FLT3/ITD 抑制剤に耐性の細胞が出現するためである。したがって、FLT3/ITD 陽性白血病が治療抵抗性を起こす分子機構を解明し、それらも加えて治療標的とすることが新たな治療戦略となりうる。

これまでに、FLT3 遺伝子に別の遺伝子変異が導入されること、他のシグナル経路が活性化することなどが FLT3/ITD 抑制剤に対する抵抗機構として知られていた。今回は FLT3/ITD の機能的な下流に存在する分子が抑制剤抵抗に関連するかどうかに関して検証することにした。特に造血幹細胞の増殖と分化に必要で、AML の発症にも関わることが知られている転写因子 Runx1 に注目した。Runx1 の造血器腫瘍における機能は、いくつか報告されているが、Runx1 は腫瘍抑制的に機能する(ブレーキ役)という報告と、反対にがん遺伝子(アクセル役)とする報告があり、今回は FLT3/ITD 陽性細胞に於いて Runx1 が「がん抑制」的に機能するのか、または「がん遺伝子」として働くのかに関して解析した。更に Runx1 が FLT3/ITD 抑制剤に対する抵抗性に関わるのかに関して解析した。

2. 研究の目的

本研究の長期目標は、治療抵抗性 FLT3/ITD 陽性 AML の新しい治療介入戦略を考案することであり、その結果患者の予後改善に貢献することである。

本研究では、以下の仮説を考え検証した。

1. Runx1 が FLT3/ITD によって発現が上昇する
2. Runx1 が FLT3/ITD 陽性細胞に於いてがん遺伝子として FLT3/ITD 促進的に働く
3. Runx1 が FLT3/ITD 陽性細胞の FLT3/ITD 抑制剤抵抗に関わる

これらが証明されることは、Runx1 が FLT3/ITD 陽性 AML において治療標的となりうることを示すことに結び付くので、治療抵抗性 FLT3/ITD 陽性 AML の新しい治療介入戦略を考案する上で有用である。

3. 研究の方法

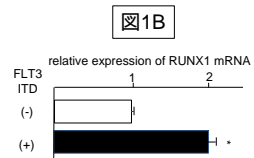
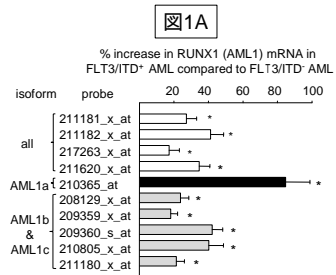
AML 遺伝子発現データベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, accession number GSE1159) を用いて Runx1 発現を FLT3/ITD 陽性 AML と陰性 AML で比較した。また、FLT3/ITD を導入したマウス造血細胞と導入していない細胞を比較して Runx1 の発現を比較した。次に FLT3/ITD 導入細胞内に Runx1 に対する

shRNA を導入することで Runx1 発現を抑制し、細胞増殖、G-CSF によって生ずる骨髄球細胞への分化を検討した。更に FLT3/ITD 陽性細胞の自己複製能もコロニー再形成の有無を指標として検証した。更に FLT3/ITD 抑制剤 AC220 に対して抵抗性となる FLT3/ITD 陽性細胞を長期培養後に確立し、その中で shRNA を用いて Runx1 を抑制することで Runx1 が AC220 抵抗性に及ぼす機能を解析した。

4. 研究成果

1. Runx1 が FLT3/ITD によって発現が上昇する

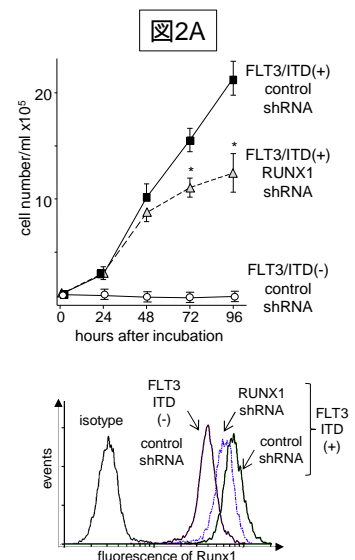
Runx1 の mRNA は FLT3/ITD 陰性患者 (N=190) に対して、FLT3/ITD 陽性患者 (N=78) で有意の上昇していた。ヒト Runx1 には 3 種類のスプライスバリエントが存在するが 3 種類いずれも上昇していた(図 1A)。



また、FLT3/ITD を導入したマウス造血細胞に於いても導入していないコントロール細胞と比較して有意に Runx1 発現は上昇していた(図 1B)。

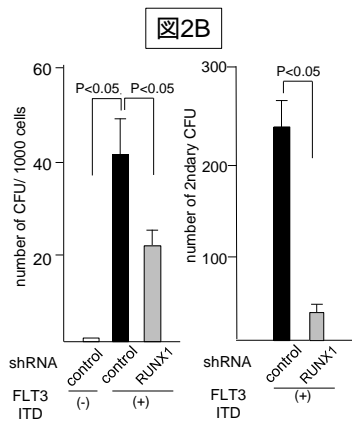
2. Runx1 が FLT3/ITD 陽性細胞に於いてがん遺伝子として FLT3/ITD 促進的に働く

FLT3/ITD をマウス造血細胞に導入すると、非導入細胞と比較して Runx1 発現が上昇すると同時に、造血因子非存在下で培養すると増殖が亢進した。即ち、FLT3/ITD は細胞増殖亢進作用を持つ。次に



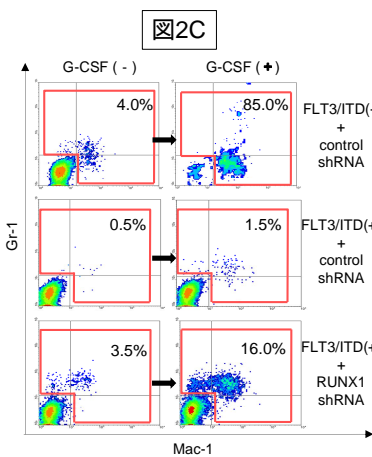
Runx1 が FLT3/ITD によって惹起される細胞増殖作用に促進的に関わるかどうかを検証した。Runx1 を抑制すると FLT3/ITD 陽性細胞では、その増殖が部分的に減少した(図 2A)。また、それらの細胞をコロニー形成能も

Runx1 を抑制すると有意に減少した(図2B左)。更に、それらのコロニーを再度プレートイングすると自己複製能を持つ細胞は再度コロニーを形成するが、Runx1



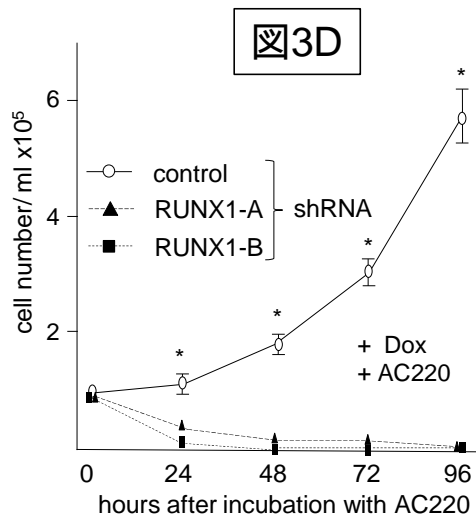
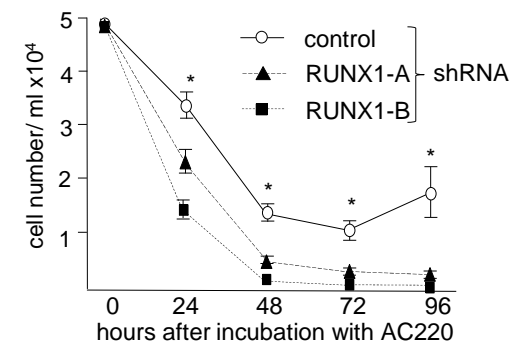
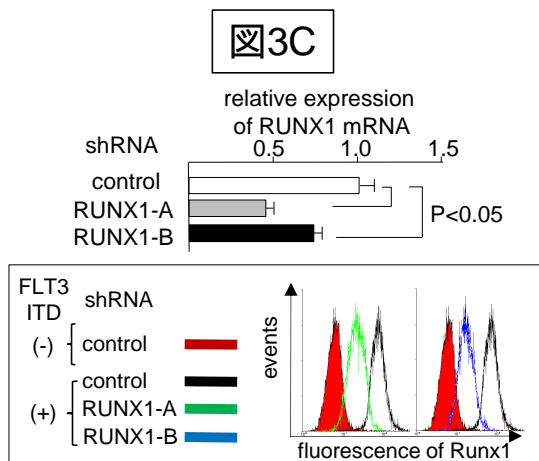
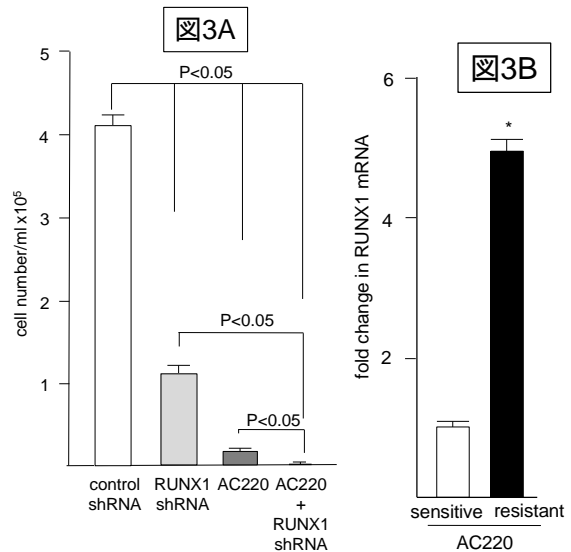
の抑制は2度目のコロニー形成能を有意に減少させた(図2B右)。これらのデータはRunx1がFLT3/ITDによって発揮される細胞増殖能と自己複製能に促進的に関わることを示す。次にRunx1がFLT3/ITDによって生ずる造血細胞分化能の抑制に関わるかを解析した。FLT3/ITD非導入マウス造血細胞をG-CSFで培養するとMac-1陽性またはGr-1陽性の骨髓系へ分化成熟する。しかし、FLT3/ITD導入細胞では、分化成熟は抑制された。この細胞にRunx1shRNAを導入し、Runx1発現を抑制すると、一部の細胞が骨髓系細胞に分化し成熟した(図2C)。したがって、Runx1は、FLT3/ITD

によって生ずる造血細胞分化能の抑制に関わる。以上のデータはRunx1がFLT3/ITD陽性細胞に於いて、がん遺伝子として、FLT3/ITD機能を促進する機能を発揮することを示唆する。



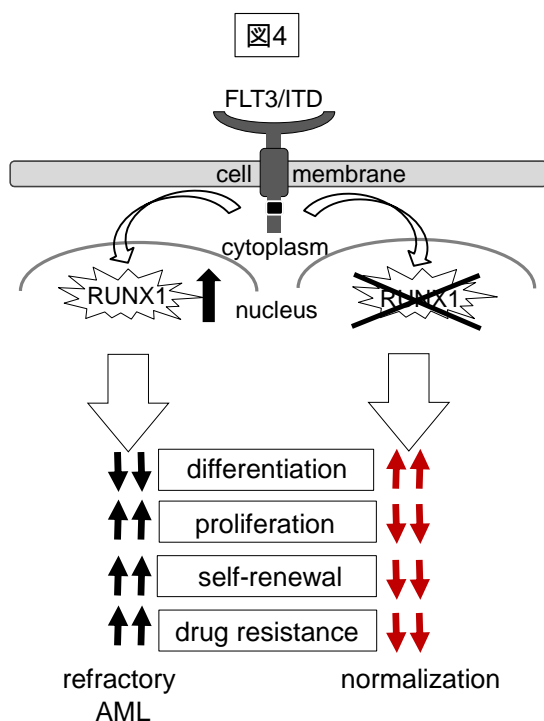
### 3. Runx1がFLT3/ITD陽性細胞がFLT3/ITD抑制剤抵抗に関わる

Runx1の抑制、FLT3/ITD抑制剤AC220はいずれもFLT3/ITD陽性細胞の増殖を減少させ、Runx1抑制とAC220を双方作用させると更に細胞増殖は減少した(図3A)。FLT3/ITD陽性細胞をAC220存在下で培養すると、細胞数は減少したが、その後再増殖し、AC220抵抗性細胞が出現した。この細胞でRunx1発現はAC220感受性細胞と比較して有意に増加していた(図3B)。そこで、Runx1を抑制するとAC220抵抗性細胞の増殖は有意に減少した(図3C)。また、感受性細胞で予めRunx1を抑制しておくともAC220抵抗性細胞の出現が抑



制された (図 3D)。

以上のデータは Runx1 が AC220 抵抗性 FLT3/ITD 陽性細胞の増殖とその出現を促進的に制御することを示す。



したがって、FLT3/ITD 阻害剤に抵抗性の FLT3/ITD 陽性 AML の抵抗性は、Runx1 を治療標的にすることで、解除可能であることを示唆する (図 4)。

#### 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 2 件)

1. Abe M, Pelus LM, Singh P, Hirade T, Onishi C, Purevsuren J, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S. Internal Tandem Duplication in FLT3 Attenuates Proliferation and Regulates Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Modulating p21<sup>Cdkn1a</sup> and Pbx1 in Hematopoietic Cells *PLOS ONE* 2016. 11(7) DOI:10.1371/journal.pone.0158290. 1-26
2. Hirade T, Abe M, Onishi C, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S. Internal Tandem Duplication of FLT3 Deregulates Proliferation and Differentiation and Confers Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Up-regulating RUNX1 Expression in Hematopoietic Cells *International Journal of Hematology*

103(1):95-106, 2016

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Fukuda S, Abe M, Hirade T, Yamaguchi S. Disrupting Cdkn1a secondary to FLT3/ITD inhibition is responsible for resistance to FLT3/ITD inhibitor AC220 in FLT3/ITD<sup>+</sup> cells, 44<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society of Experimental Hematology, Kyoto, Japan, 2015
2. Fukuda S, Hirade T, Abe M, Yamaguchi S. FLT3/ITD confers resistance to FLT3 inhibitor AC220 by up-regulating Runx1 77<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Hematology, Kanazawa, Japan, 2015
3. Fukuda S, Abe M, Hirade T, Onishi C, Taketani T, Yamaguchi S. FLT3/ITD Regulates Resistance to FLT3/ITD inhibitor AC220 by Modulating Cdkn1a and Pbx1 78<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Hematology, Yokohama, Japan, 2016

〔図書〕(計 1 件)

Fukuda S, Hirade T, Abe M, Taketani T, Onishi C. Molecular Interaction between the Microenvironment and FLT3/ITD<sup>+</sup> AML Cells Leading to the Refractory Phenotype *Myeloid Leukemia 2018 InTech - Open Access Publisher*, ISBN 978-953-51-5750-2

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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://ped-shimane-u.jp/study/hematological\\_malignancy](http://ped-shimane-u.jp/study/hematological_malignancy)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平出 智裕 (HIRADE, Tomohiro)

島根大学・医学部・特別研究員

研究者番号：40638540

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )