

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19635

研究課題名(和文) Ph染色体陽性ALLに対するLenalidomideを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Lenalidomide as IKZF1 inhibitor induces Ph+ALL cells into apoptosis synergy with antileukemic agents

研究代表者

原間 大輔 (HARAMA, Daisuke)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10774078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フィラデルフィア染色体陽性白血病細胞株に対し、レナリドミド(LEN)とイマチニブ(IM)を同時に用いることにより、従来の治療法であるIM単剤使用よりも優れた抗腫瘍効果が示された。また、同効果は白血病治療に用いられるデキサメタゾン(DEX)を併用することにより、さらに増強された。抗腫瘍効果の主な機序はアポトーシスを介していた。白血病細胞を輸注し作製したモデルマウスを用いても、同様の効果が示された。治療を行わなかったマウスに対し、LENとIMを投与したマウスは生存期間が約180%延長した。LENとIM、DEXは全て内服薬であり、白血病患者のQOLを保った治療法につながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Combination use of lenalidomide (LEN) and imatinib (IM) on Philadelphia chromosome positive leukemia cell line showed synergistic antileukemic effect against using IM single agent. In addition, the same effect was further enhanced by using dexamethasone (DEX) in addition of LEN and IM. It was also observed that IKZF1 isoform was degraded in the presence of LEN, without mutated isoform Ik6, leading to be susceptible to TKI. This synergistic effect was also demonstrated in xenograft model using NOG mice. In comparison of mice without treatment, mice receiving LEN and IM longed survival time of approximately 180%. LEN, IM, and DEX are all internal medicines, indicating the possibility of leading to a treatment that maintains QOL of leukemia patients.

研究分野：血液学

キーワード：フィラデルフィア染色体 急性白血病 新規治療法 IKZF1

1. 研究開始当初の背景

Ph+ALL では、9;22 染色体転座により強力な融合チロシンキナーゼ(BCR-ABL)が生成され、通常の化学療法では完治しえない極めて難治性な急性白血病である。また、フィラデルフィア染色体陽性(Ph+)慢性骨髄性白血病(CML)や Ph+リンパ性白血病に対する分子標的薬である BCR-ABL 特異的なチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)である Imatinib(IM)が創薬、保健認可され、実際の治療に導入されることで予後が改善されてきているが、その成績は未だ十分とは言えない。

サリドマイドの毒性を軽減した誘導体であるレナリドミド(LEN)は、多様な生物学的活性を有し、免疫調整剤(IMiDs)と総称されている。最近、多発性骨髄腫や特定の骨髄異形成症候群の治療に有効であることが明らかになり、保健認可のもと臨床応用されている。サリドマイド誘導体は米国で悪性リンパ腫や成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する臨床治験が始まっているが、ALL に対する効果はこれまで全く調べられておらず、臨床応用もされていない。Ph+ALL に対する LEN の抗腫瘍効果を判定するとともに、IM 併存下において効果に変化を及ぼすかを検討したところ、Ph+ALL 細胞株である KOPN57bi 細胞では、AlamarBlue assay を用いた生細胞数比較で、LEN、IM 単独でも一定の増殖抑制が見られた。さらに併存下では、単独よりもさらなる細胞増殖抑制が見られることが示された。LEN 単独での抗腫瘍効果に加え、IM 協働での強力な抗腫瘍効果が期待される結果を得た。

2. 研究の目的

(1)ALL 細胞株を用いて抗腫瘍効果が得られるかを明らかにする

本研究室に保存されている多種の Ph+ALL を含めた ALL 細胞株を用いて、LEN 感受性を持つ細胞株が存在するかを判別する。該当する細胞株に対し、既存の治療薬である IM の存在下/非存在下でそれらがどのように細胞増殖に変化を及ぼすかに関して評価する。

(2)抗腫瘍効果のメカニズムの探索

抗腫瘍効果がどのようなメカニズムで引き起こされているかを明らかにする。既報によると、LEN は細胞周期停止とアポトーシス誘導による細胞死を同時に引き起こすとされているが、ALL 細胞株では未確認である。特に IM の存在下ではどのようなメカニズムが引き起こされるかは未知の領域であるため検討する。

(3)IKZF との関連について

現在、LEN は 4 つの Zinc Finger 構造を持つ転写因子 IKAROS の、Ikaros Kinase Zinc Finger Family(IKZF)1 と IKZF3 に対して作用し、抗腫瘍効果を示すことが多発性骨髄腫で示されている。しかし、LEN の多彩な薬理作用は多岐に渡るため、本研究での抗腫瘍効果

が IKZF を介するものであるか否かを明らかにする。

(4)チロシンキナーゼ阻害剤耐性 Ph+ALL に対する効果の検討

Ph+ALL のなかには、IM をはじめとするチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を持つものがあり、Ph+ALL の中でもさらに治療選択が狭まっている。これらの細胞において、LEN 存在下では、IM と単独使用よりも高い抗腫瘍効果が期待できる可能性がある。IM 耐性 ALL 細胞株、または患者検体を用いて、LEN、IM 存在下での細胞増殖抑制が見られるかを明らかにする。

(5)Ph+ALL 白血病モデルマウスに対する効果の確認

細胞株だけでなく、白血病モデルマウスに対しても抗腫瘍効果が得られるか検討する。免疫不全マウス対して白血病細胞を移植することで白血病モデルが樹立される技術は確立されており、同モデルに対して LEN、IM を投与し、全生存率や寛解導入率を評価する。

3. 研究の方法

当研究室で経年的に保存されている数十株の Ph+ALL、Ph-ALL 細胞株に対して、LEN、IM 各薬剤の存在/非存在下で主に以下の方法を用いて細胞増殖判定を行う。

・Thymidine 取り込み法

白血病細胞株を 96well 培養プレート(1×10⁵cells/well)にて LEN、IM 各存在/非存在下で 3-6 日間培養し、その後 H3-thymidine を添加し細胞増殖をシンチレーションカウンターで測定する。取り込み量を定量的に比較する方法と、薬剤非存在対照群との対照比%を算出する方法で細胞増殖判定を行う。

・AlamarBlue assay

白血病細胞株を 96well 培養プレート(1×10⁵cells/well)にて、LEN、IM 各存在/非存在下で 3 日間培養し、その後 AlamarBlue 色素を添加、2.5 時間後に吸光度を測定し、吸光度に応じた細胞増殖判定を行う。評価方法として、薬剤非存在対照群に対する対照比%で判定する。

・Flow Cytometry(annexin V, propidium iodide(PI)二重染色)

白血病細胞株を 24well 培養プレート(1×10⁵cells/well)にて、LEN、IM 各存在/非存在下で 3 日間培養し、FITC 標識 annexin V と propidium iodide(PI)で二重染色し、BD FACScalibur™を用いて、細胞死誘導率を検査する。

・Western Blotting 法

白血病細胞株を 24well 培養プレート(1×10⁶cells/well)にて、LEN、IM 各存在/非存在下で 3 日間培養し、得られた細胞を Lysis Buffer を用いてタンパク抽出を行う。その後 SDS-PAGE で分離したタンパクをニトロセルロース膜に転写し、標的タンパクに対する特

異的抗体(抗 IKZF1,3 抗体等)を用いて標識、ケミルミネッセンス法で発現を測定する。

・NOD/SCID/ null マウス(NOG マウス)をもちいた白血球モデルマウスでの検討

NOG マウスは、ヒトの造血幹細胞や腫瘍細胞を効率的に移植可能な免疫不全マウスとして研究に汎用されており、ヒト白血球細胞に対する薬剤の治療効果をマウス体内(in vivo)で検討が可能となる。Ph+ALL 細胞株 2×10^6 細胞をマウスの尾静脈から投与し、生食投与群、LEN 単独投与群 (30mg/kg/日)、Imatinib 単独投与群 (150mg/kg/日)、LEN/Imatinib 併用投与群に分けて経過観察を行う。投与2週間後のマウス骨髓血から単核球分画を分離し、ヒト白血球細胞に結合する抗ヒト CD45 抗体で染色した後に、Flow Cytometry で単核球分画中の Ph+ALL 細胞の割合を検討する。同様に、60日後までの各群のマウス生存率の変化を Kaplan-Meyer 法で検討する。

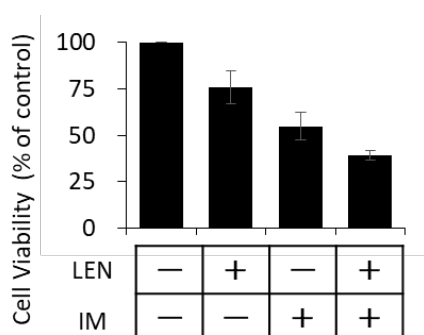
4. 研究成果

(1)LEN、IM の併用により、Ph+ALL 細胞株に対する相乗的な抗腫瘍効果を認めた

Ph 染色体陽性、陰性それぞれの白血球細胞株に対してレナリドミドを単独で作用させ、thymidine uptake 法で H3 取り込みを確認した。Ph 染色体の有無関わらず、取り込みは様々であり、両者に有意な差は見られなかった。なかでも、比較的取り込み低下が高い Ph 染色体陽性細胞株である KOPN57bi を用いて、IM との併用効果を検証した。LEN 単独で部分的にみられた取り込み低下が、IM を加えることでより相乗的に低下していた。また、取り込み低下は時間、濃度依存的にも確認された。LEN、IM の併用時には、LEN 単独時より 80% 濃度を低下させても相乗効果が得られた。

alamarBlue 法を用いて、細胞活性を調べたところ、同様に LEN、IM 併用での細胞増殖抑制効果が確認された(図 1)。ニトロセルロースを含む培地を用いて colony assay を行った。薬剤無投与の対照群では Colony 形成が確認された。LEN、IM 単独でも Colony 形成は阻害されたが、LEN+IM はさらに強力に抑制し、コロニーはほぼ形成されなかった。以上から、LEN、IM 併用による、相乗的な抗腫瘍効果が確認された。

(図 1)



(2)抗腫瘍効果のメカニズムはアポトーシスである

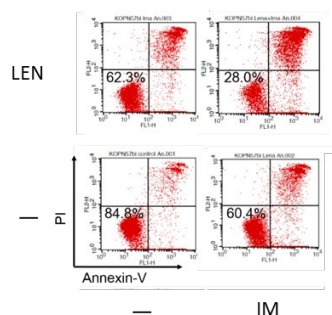
LEN、IM それぞれの単独/併用効果を、フローサイトメトリーを用いて観察した。併用することで、単独使用よりもアポトーシス分画が増加していることが確認され、細胞周期の停止を示す所見は見られなかった。一方、AnnexinV + PI 二重染色法では単独使用群よりも、併用使用群でアポトーシス分画割合の有意な増加が見られた(図 2)。

同様の系を用いた LEN、IM によるアポトーシスの誘導は、KOPN57bi 細胞株のみならず、その他複数 Ph+ALL 細胞株でも確認された。IM 以外に臨床的に多く用いられているダサチニブを用いても、LEN との相乗効果が確認された。さらなるアポトーシス誘導のメカニズムとして、アポトーシスを主導する分子である、active caspase-3 の陽性細胞数も検討した。併用群で active caspase-3 陽性細胞は有意に増加し、汎 caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK を用いることで、アポトーシス陽性細胞数は低下した。

アポトーシス制御に関わる分子を Western Blotting 法を用いて評価した。アポトーシスに対し抑制的に働く BCL-2、BCL-xL は発現量に変化を認めなかった。多発性骨髄腫(MM)で既報のある、C-myc や IRF4 の変化も認めなかった。

一方、アポトーシス促進分子である Bax は、LEN+IM 処理群では、通常形態である 21kDa タンパクに加え、活性の強い cleaved form である 18kDa タンパクの発現増加が認められた。同様に、アポトーシスに促進的に働く BIM に関しても、発現レベルの増加を認めた。

(図 2)

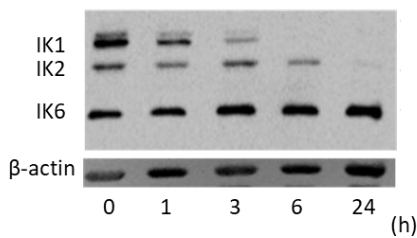


(3)Ph+ALL 細胞株の Ik isoform タイピングと LEN による IKZF1 の分解

IKZF1 遺伝子は 8 つのエクソンから構成される。エクソン 4 から 6 は DNA 結合能を有する zinc finger を、エクソン 8 は二量体形成を担う zinc finger をコードしている。これらのエクソンのスプライシングにより、IKZF は Ik1 から Ik10 までの異なる isoform をもつ。このうち、Ik6 は Ph+ALL に最も多く見られる IKZF1 変異であり、エクソン 4-7 を欠失することで DNA 結合能を失い、優性阻害作用を持つことが知られている。Ph+ALL 細胞株の IK isoform について、RT-PCR を用いてタイ

ピングを行った。13のPh+ALL細胞株のうち、77%でIk6を含む様々な変異を認めた。これらの変異とLENの感受性との関連は明らかでなかった。次に、IKZF1の発現をWestern Blotting法を用いて解析した。ドミナントネガティブ isoform であるIk6を発現する細胞株は、LENの投与により、24時間後に isoform はほぼ完全に消失したが、Ik6はほとんど影響を受けなかった。IKZF3は isoform の分解が認められた。Ik6だけが消失を免れた要因として、LENの受容体であるCRBNが結合する exon5 を欠損していることが原因と考えられた(図3)。

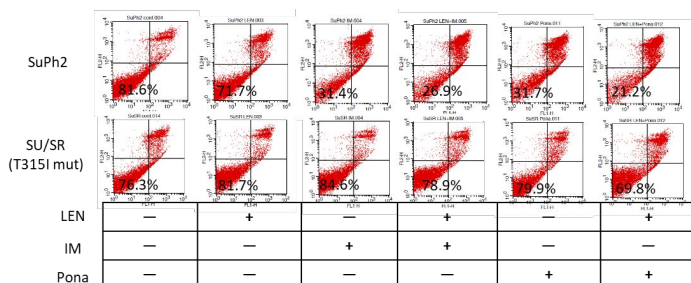
(図3)



(4) TKI 耐性 Ph+ALL 細胞株に対し、Ponatinib を用いることで LEN, TKI の相乗的な抗腫瘍効果を確認

イマチニブ(IM)存在下で長期培養することで、耐性を獲得した細胞株を用いた。耐性は、BCR-ABLのキナーゼドメインの点変異として最も頻度の高いT315I変異を有していた。LENやIMの単独、または共存在下ではアポトーシスは誘導されなかった。しかし、第3世代型のTKIであるポナチニブに対しては、細胞は感受性を示し、単独存在下でも部分的な、LENとの共存在下ではIM感受性細胞と同等な、相乗的抗腫瘍効果が得られることを alamarBlue 法、AnnexinV-PI 二重染色でのフローサイトメトリー法で確認した。TKI 耐性を有する T315I 変異を有する Ph+ALL 細胞株に対しても、第3世代型のTKIを用いることで、LENとの相乗効果は期待できることが明らかになった(図4)。

(図4)

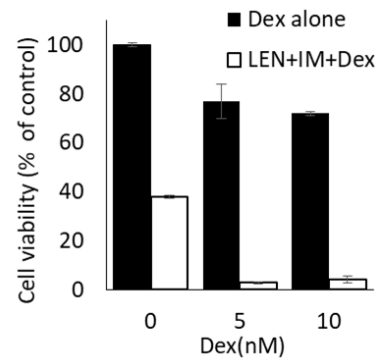


(5) Dexamethazone (DEX) と LEN, IM との併用効果

ALLの重要薬剤であり、かつMMに対してLENと併用されているDEXと、LEN, IMとの計3剤での相乗効果を検討した。これまでと同様に Flow Cytometry と alamarBlue assay を用

いて検討した。LEN, IMの2剤併用では、細胞死比率は約70%であったのに対し、3剤併用では24-48時間後の細胞死比率は90%以上となり、ほとんどの細胞が死滅していた(図5)。また使用したDEX用量は5nMと比較的低濃度で相乗効果が得られた。(4)に示したTKI耐性のT315Iを有するPh+ALL細胞株に対しても同等の効果が確認された。

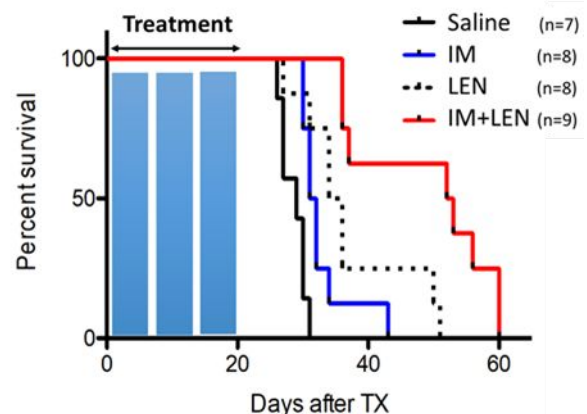
(図5)



(6) 異種移植モデルに対して、LEN, IMの併用投与は生着率を低下させ、生存期間を著明に延長させる

NOGマウスに対してPh+ALL細胞株を移植した異種移植モデルを作成し、生体内での細胞株の生存をみた。骨髄中のhCD45細胞率で生着率評価を行ったところ、コントロール群の生着率80%に対し、LEN, IM単独投与群は50-60%程度に生着率が低下したが、併用群では26%まで低下していた。移植、薬剤投与ののち、無投与での生存期間を検討した。コントロール群が生存中央値29日に対し、併用群は52.5日であり約180%の生存期間延長が認められた。(図6)

(図6)



LENがIKZF1を分解することでTKIとの相乗的な抗腫瘍効果を発揮することが示された。IKZF1の変異の発現状況や、LEN単剤の感受性は細胞株により異なっており、今後どのような性質によりこれらの違いが生じるかに

関して、検討する余地があると考えられた。

Ph+ALL は年齢とともに発症頻度が増加する傾向にあり、発症者の多くは高齢者である。現在一般的な治療は点滴による化学療法や骨髄移植であるが、高齢であるために、強力な化学療法や骨髄移植は患者への負担を考慮し行えないことも多い。それに対し、本治療で用いた薬剤はいずれも経口薬剤であり、深刻な有害事象が生じずに臨床応用が可能であれば、患者の生活の質(QOL)を損ねることなく、外来での治療も可能だと考えており、治療選択が限られている Ph+ALL 患者に対する影響は非常に大きい。

研究開始当初、ALL に対して LEN が用いられた報告は見られなかったが、本年に Ph+ALL を発症した患者に対して LEN と TKI を併用した症例報告がなされた。症例は寛解後に再発しており、一般的な予後は極めて不良である。通常骨髄移植を考慮されるが、2 剤の併用により、大きな有害事象なく、骨髄移植なしで現在も約 1 年以上の寛解を維持できているとのことであった(文献)。1 例のみの報告であるが、今後実臨床への応用が十分に期待される。

<引用文献>

Lai, Binbin, et al. "Durable remission in a patient of mixed phenotype acute leukemia with Philadelphia chromosome-positive treated with nilotinib and lenalidomide: A case report." *Medicine* 97.14 (2018).

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)

[学会発表](計3件)

原間大輔. Lenalidomide induces apoptosis of Ph positive ALL cells in synergy with Imatinib.

第 58 回日本小児血液がん学会学術集会. 2016 年

Daisuke Harama. Lenalidomide effectively induces philadelphia chromosome positive ALL cells into apoptosis in synergy with tyrosine kinase inhibitor.

58th ASH annual meeting. 2016

原間大輔. IKZF1 阻害剤としてのレナリドミドは他剤との相乗効果で Ph 染色体陽性細胞にアポトーシスを誘導する.

第 79 回日本血液学会学術集会. 2017 年

[その他]

<http://www.bloodjournal.org/content/128/22/1060>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原間 大輔 (HARAMA, Daisuke)
山梨大学医学部附属病院・医員