

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17016029
 研究課題名（和文） 白血病に選択性を有する分子標的治療法ならびにその評価法の開発
 研究課題名（英文） Research & Development of molecular target therapy for leukemia and its assessment System
 研究代表者
 直江 知樹 (NAOE TOMOKI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50217634

研究成果の概要（和文）：

白血病に対する有効で安全性の高い標的治療の開発のため、1) 白血病に特異的な分子病態と標的分子の同定を行い、変異 FLT3 や変異 KIT、さらにキメラ転写因子 PML-RARA にリクルートされる N-CoR/HDAC3/TBLR1 複合体が新たな標的分子となり得ることを明らかにした。2) 標的のための阻害剤開発を行い、FLT3 阻害剤として FI-700、KW-2449、KIT 阻害剤として KI-328 を開発した。N-CoR/HDAC3/TBLR1 複合体に対してはデコイペプチドの開発を行った。3) チロシンキナーゼ阻害剤の評価系として、p-FLT3 あるいは p-STAT5 に対する抗体による FACS および血漿バイオアッセイ系を確立した。

研究成果の概要（英文）：

For the development of more effective and secure target therapy for leukemia, we clarified that mutated FLT3 and KIT, and N-CoR/HDAC3/TBLR1 complex that is recruited by chimera transcription factor PML-RARA are ideal target molecules/complex for therapy. We developed FLT3 inhibitors, FI-700 and KW-2449, and KIT inhibitor, KI-328. For targeting N-CoR/HDAC3/TBLR1 complex we designed a decoy peptide. We also established a laboratory system which can evaluate p-FLT3 or p-STAT5 of leukemia cells using FACS and estimate pharmacodynamismly plasma bioassay system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,500,000	0	9,500,000
2006 年度	9,100,000	0	9,100,000
2007 年度	9,100,000	0	9,100,000
2008 年度	9,100,000	0	9,100,000
2009 年度	9,100,000	0	9,100,000
総計	45,900,000	0	45,900,000

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, シグナル伝達, 幹細胞, 分子標的治療, キメラ転写因子

1. 研究開始当初の背景

腫瘍においては多くの“標的治療”が開発されているが、より効果的で安全な治療法を開発するために、腫瘍における分子病態、と

りわけ正常組織との違いに基づく標的治療を開発することが求められる。白血病ではいくつかのチロシンキナーゼ変異やキメラ転写因子が認められ、BCR-ABL に対するイマチ

ニブ治療は、治療理念がヒトで実証され、臨床上の大きな成果に結実した例である。次の標的分子・標的治療が望まれている。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病において変異の認められる分子ならびにそれらにリクルートされる機能分子あるいは下流シグナル分子を標的とし、結果的に白血病に選択性の高い新しい治療法を開発することを目標とした。具体的には、(1) 白血病に特異的な分子病態と標的分子の同定 (2) すでに明らかにされている標的分子群 (変異チロシンキナーゼおよび白血病キメラ転写因子複合体) に対する新しい標的治療の開発、(3) 臨床に近い治療評価系としてのヒト白血病マウスモデルおよびサロゲートマーカーの確立、を行う。

3. 研究の方法& 4. 研究成果

(1) 白血病に特異的な分子病態と標的分子の同定

これまで、FLT3 が標的分子となることはすでに報告してきた。本研究では新たに白血病における Wnt/ β catenin の活性化と KIT 変異について検討した。まず、非リン酸化 β カテニンに対するモノクロー抗体による免疫染色を行ったところ、AML の M6/M7 および ALL、CML-BC において高率に核内非リン酸化 β catenin (NNPBC) が同定され、免疫プロットでも確認された。これは予後不良ならびに Ph 染色体や 5 番/7 番染色体欠失に関連した。NNPBC は Wnt 阻害剤によっても NNPBC は抑制されず、 β catenin への異常シグナルが示唆された。 β catenin は血液腫瘍においても活性化しており、治療標的分子となる可能性がある。また 100 例の de novo AML (APL 以外) では 5 例に KIT 変異を認めた。KIT 分子の自己リン酸化や造腫瘍性は変異部位によって大きく異なり、D816V 変異が最も自己リン酸化が強く SCF 非依存性増殖をもたらした。一方、PML-RAR α に結合する転写抑制因子群の同定を試み、N-CoR/HDAC3/TBLR1 複合体がリガンド非存在下において PML-RAR α に結合することを見いだした。siRNA により HDAC3 蛋白発現を抑制すると、PML-RAR α の標的遺伝子である RAR β 、CYP26 の発現が有意に促進され、HDAC3 が PML-RAR α 依存性の転写抑制に重要な因子であることを確認した。

(2) 変異チロシンキナーゼおよび白血病キメラ転写因子複合体に対する新しい標的治療の開発

メーカと共同で恒常的活性化 FLT3 の阻害剤をスクリーニングし、FLT3 変異白血病細胞に高い選択性と阻害活性を示し、移植マウスモデルにおいて白血病の寛解あるいは治癒をもたらさう二つの化合物 FI-700 と KW-2449 を得た。薬物動態・代謝・毒性ならびにヒト白血病臨床検体に対する阻害活性結果などを評価し、一方の化合物の誘導体

KW-2449 の臨床開発試験が開始された。もう一方の FI-700 については、誘導体から KIT 特異的な FI-700 を得た。FLT3 阻害剤はいずれも FLT3 のリン酸化を 200nM 以下で抑制し、変異 FLT3 依存性の白血病細胞株・臨床検体の増殖抑制・アポトーシス誘導を引き起こす。マウスモデルでもきわめて有効性が高く、正常造血の抑制や体重減少は軽微であった。KW-2449 については臨床開発に進んでいる。N-CoR/HDAC3 蛋白結合を阻害するドミナントネガティブ蛋白については、PML-RAR α 依存性の転写抑制機能の解除と白血病細胞の分化に与える効果を検討する必要がある。

(3) 臨床に近い治療評価系としてのヒト白血病マウスモデルおよびサロゲートマーカーの確立

白血病細胞株やマウスモデルは白血病治療開発にとって必須の評価系であるが、臨床への予見性や近似性に乏しい。我々は、ヒト白血病検体を免疫不全マウス (NOG マウス) へ移植し継代することによって、新しい白血病モデルを構築した。継代白血病細胞の多くは体外での増殖が不可能で、移植後 2-3 日以内に、骨内膜の幹細胞ニッチあるいは血管外ニッチに生着し、骨内腔に向けて増殖を開始する。細胞表面抗原は臨床で得られた時とほぼ同じ分化マーカーを有するが、CD34 などは高発現する傾向にある。HSC/Progenitor 解析では、いずれも分化マーカー (Lin) 陰性 CD34 陽性かつ、CD38 陰性 CD90 陽性の幹細胞分画や CD123 (IL3R) 中等度陽性の前駆細胞が検出された。化学療法やキナーゼ阻害剤によって、白血病細胞は激減し、血管外あるいは骨内ニッチに残存した。

また、FLT3 阻害剤のキナーゼ阻害活性をモニター可能な分子マーカーとしてリン酸化 STAT5 を見出し、フローサイトメーターや免疫組織で検出可能な抗リン酸化 STAT5 単クローン抗体を作製した。さらにキナーゼ阻害剤投与中の患者における Pharco-dynamics を調べる目的で、白血病細胞株に患者血漿を添加することにより、リン酸化抑制効果を調べる系を構築した。イマチニブ治療では必ずしも薬剤血中濃度とは一致せず、薬剤開発におけるこのようなトランスレーショナルなアプローチが重要であることが示された。

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 25 件)

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

- leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol.* 84:229-38, 2010. (査読有)
- 2: Tanizaki R, Naoe T. et al. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R γ mice. *Cancer Sci.* 2009 (in Press) (査読有)
 - 3: Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T3151-mutated BCR/ABL translocation. *Blood.* 114:1607-17, 2009. (査読有)
 - 4: Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 83:90-8, 2009. (査読有)
 - 5: Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia.* 23:1270-7, 2009. (査読有)
 - 6: Abe A, Minami Y, Hayakawa F, Kitamura K, Nomura Y, Murata M, Katsumi A, Kiyoi H, Jamieson CH, Wang JY, Naoe T. Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia after imatinib therapy. *Int J Hematol.* 88:471-5, 2008. (査読有)
 - 7: Minami Y, Stuart SA, Ikawa T, Jiang Y, Banno A, Hunton IC, Young DJ, Naoe T, Murre C, Jamieson CH, Wang JY. BCR-ABL-transformed GMP as myeloid leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17967-72, 2008. (査読有)
 - 8: Iwasaki T, Katsumi A, Kiyoi H, Tanizaki R, Ishikawa Y, Ozeki K, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Amano M, Kojima T, Kaibuchi K, Naoe T. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 81:454-60, 2008. (査読有)
 - 9: Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 140:394-401, 2008. (査読有)
 - 10: Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, Naoe T, Levis MJ, Neckers L, Trepel JB. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 21:2476-84, 2007. (査読有)
 - 11: Kiyoi H, Shiotsu Y, Ozeki K, Yamaji S, Kosugi H, Umehara H, Shimizu M, Arai H, Ishii K, Akinaga S, Naoe T. A novel FLT3 inhibitor FI-700 selectively suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. *Clin Cancer Res.* 13(15 Pt 1):4575-82, 2007. (査読有)
 - 12: Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-retinoic acid receptor alpha inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBPepsilon expression in myeloid differentiation. *Mol Cell Biol.* 27:5819-34, 2007. (査読有)
 - 13: Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *Eur J Haematol.* 79:25-31, 2007. (査読有)
 - 14: Kiyoi H, Yamaji S, Kojima S, Naoe T. JAK3 mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia.* 21:574-6, 2007. (査読有)
 - 15: Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H, Towatari M, Naoe T. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia.* 21:403-10, 2007. (査読有)
 - 16: Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia.* 21:136-42, 2007. (査読有)
 - 17: Abe A, Kiyoi H, Ninomiya M, Yamazaki T, Murase T, Ozeki K, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Naoe T. Establishment of a stroma-dependent human acute myelomonocytic leukemia cell line, NAMO-2, with FLT3 tandem duplication. *Int J Hematol.* 84:328-36, 2006. (査読有)
 - 18: Kiyoi H, Naoe T. Biology, clinical relevance, and molecularly targeted therapy in acute leukemia with FLT3 mutation. *Int J Hematol.* 83:301-8, 2006. (査読有)

- 19: Atsumi A, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Histone deacetylase 3 (HDAC3) is recruited to target promoters by PML-RARalpha as a component of the N-CoR co-repressor complex to repress transcription in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 345:1471-80, 2006. (査読有)
- 20: Yamamoto T, Isomura M, Xu Y, Liang J, Yagasaki H, Kamachi Y, Kudo K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S. PTPN11, RAS and FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 30:1085-9, 2006. (査読有)
- 21: Suzuki M, Abe A, Kiyoi H, Murata M, Ito Y, Shimada K, Morishita Y, Kinoshita T, Naoe T. Mutations of N-RAS, FLT3 and p53 genes are not involved in the development of acute leukemia transformed from myeloproliferative diseases with JAK2 mutation. *Leukemia.* 20:1168-9, 2006. (査読有)
- 22: Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, Kobayashi T, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Emi N, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 24:460-6, 2006. (査読有)
- 23: Sawa M, Yamamoto K, Yokozawa T, Kiyoi H, Hishida A, Kajiguchi T, Seto M, Kohno A, Kitamura K, Itoh Y, Asou N, Hamajima N, Emi N, Naoe T. BMI-1 is highly expressed in M0-subtype acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 82:42-7, 2005. (査読有)
- 24: Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 106:2854-61, 2005. (査読有)
- 25: Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia.* 19:1306-11, 2005. (査読有)
1. Sugimoto T, Naoe T, et al. MS4A1 (CD20) Gene Expression Is Down-Regulated by Recruiting the Histone Deacetylase Protein Complex to the Promoter in the CD20-Negative B-Lymphoma Cells After Treatment with Rituximab. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec5-8 2009),New Orleans USA.
2. Kuwatsuka Y, Naoe T, et al. Treatment with Bortezomib Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent Cells. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec5-8 2009),New Orleans USA.
3. Goto E, Naoe T, et al. Double Genetic Mutations in PML-Rara Fusion Gene Confirmed in a Patient Showing Resistance to All-Trans Retinoic Acid and Arsenic-Trioxide Therapy. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec5-8 2009),New Orleans USA.
4. Mori Y, Naoe T, et al. FL-Dependent Wild-Type FLT3 Signals Reduce the Inhibitory Effects of FLT3 Inhibitors On Wild-Type and Mutant FLT3 Co-Expressing Cel. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec 5-8 2009),New Orleans USA.
5. Katsumi A, Naoe T, et al. FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through $\alpha 4\beta 1$ Integrin and Pyk2 Signalin. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec 5-8 2009),New Orleans USA.
6. Minami Y, Naoe T, et al. Treatment with mTOR Inhibitor, Everolimus (RAD001) Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent or T315I-Mutated Cells. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting. (Dec5-8 2009),New Orleans USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：急性骨髄性白血病治療剤の候補物質を同定する方法

発明者：直江知樹、早川文彦、岡本充功

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2006-155281

出願年月日：2006/6/2

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

直江 知樹 (NAOE TOMOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50217634

[学会発表] (計 1 5 件)