

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390283

研究課題名（和文）新規 Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤による難治性白血病治療法の開発

研究課題名（英文）Molecular therapeutics for imatinib-resistant Ph-positive leukemias with newly developed Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor.

研究代表者：

前川 平 (MAEKAWA TAIRA)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：802292286

研究成果の概要：

Abl キナーゼドメインに遺伝子変異を持つイマチニブ (IM) 抵抗性慢性骨髄性白血病 (CML) に奏効する純国産の Bcr-Abl/Lyn 阻害剤 INNO-406 (NS-187、Bafetinib) を開発した。Bafetinib は Abl 親和性が IM より 25～55 倍高く、IM 耐性に関与する Lyn と Bcr-Abl を阻害するユニークな作用を持つチロシンキナーゼ阻害剤である。臨床第 I 相試験で有効性を確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2007 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：慢性骨髄性白血病、イマチニブ、INNO-406、バフェチニブ、遺伝子変異、BCR-ABL、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

フィラデルフィア染色体 (Ph) は、染色体相互転座 t(9;22)(q34;q11) により形成される。慢性骨髄性白血病 (CML) ならびに一部の急性リンパ性白血病 (ALL) では、Ph 染色体により産生される Bcr-Abl 融合蛋白の恒常的なチロシンキナーゼ活性化とそれに伴う多

彩な細胞シグナル異常が造血幹細胞の白血病化の原因である。この Bcr-Abl 融合蛋白を分子標的として開発されたメシル酸イマチニブ (Glivec®) は、単剤で特に慢性期 (chronic phase; CP) CML に対してきわめて高い臨床効果を示し、CML-CP に対する薬物療法の第一選択薬となった。さらに、これまで

効果的な治療が期待しづらかった進行期 CML や Ph 陽性 (Ph⁺) ALL に対しても一時的な効果をもたらすことで同種骨髄移植などのより強力な治療までの病勢コントロールを可能にし、これらの疾患に対する治療アプローチは大きく様変わりした。しかし症例の蓄積に伴い、白血病細胞の同剤に対する耐性獲得が問題となってきた。この耐性獲得機序として様々な Bcr-Abl 依存的、もしくは非依存的なメカニズムが報告されているが、なかでも頻度、多様性、難治性から最大の問題となっているのは Abl キナーゼドメインの点突然変異である。したがって、Abl キナーゼドメインの遺伝子変異によりイマチニブに耐性となった CML 患者にも奏効し、安全で副作用の少ないあらたな分子標的治療薬の開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

われわれは、点突然変異を有するイマチニブ抵抗性の慢性骨髄性白血病 (CML) にも奏効する純国産の Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤 NS-187¹を開発中である。周知のごとく CML は Bcr-Abl キナーゼの異常活性化によって発症する。Abl キナーゼ阻害剤イマチニブ (IM) が著効を示すが、耐性出現など治療効果の限界も明らかとなり、次世代型 Abl 阻害剤の開発競争が激化している。次世代型 Abl 阻害剤の多くは、Abl に対する作用だけでなく、Src family すべてを阻害するため、重篤な副作用の出現が懸念されている。

われわれは IM と Abl の複合体結晶 X 線解析結果から、バイオインフォマティクスを駆使して疎水性ポケットに構造展開の可能性を見出し多くの化合物を合成した。化合物のキナーゼ阻害作用および安全性を

¹ 研究開発当初 (前臨床) は NS-187、臨床試験では開発コードネーム INNO-406 である。また、一般名として bafetinib という名称が用いられることもあるが、すべて同一の分子である。

指標に、Abl 親和性が IM より 25~55 倍高く、Src family の一つであり IM 耐性に関与する Lyn を高い特異性を保ちながら Bcr-Abl とともに阻害する Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤 NS-187 をスクリーニングの結果同定した。本研究の全体構想は、メイド・イン・ジャパン の化合物 NS-187 を世界展開可能な医薬品とするため、IM 耐性機構に対する NS-187 の効果、作用機序を詳細に解析して効果を最大限にする使用法を明らかにするとともに、CML 以外の他疾患に対する作用を検討することであり、加えて NS-187 の効果をも凌駕する新規の化合物の探索も行う。

3. 研究の方法

(1) IM 耐性機構に対する NS-187 の効果を明らかにする。

- ① 13 種類の変異 Bcr-Abl を発現する BaF3 細胞および患者細胞の増殖に対する NS-187 の *in vivo* 効果を検討する。また NS-187 使用時に出現することが予想される変異を同定する。
- ② Lyn 活性化は IM 耐性に関与するが、詳細は不明である。Lyn 活性化抑制レベルと細胞増殖抑制の関連を検討する。キナーゼ阻害プロファイルの異なる薬剤の作用を比較し、Lyn の役割を明確にする。
- ③ IM が無効な中枢神経性白血病に対する NS-187 の効果、さらに血液脳関門に関与する P 糖蛋白 (P-gp) に対する阻害剤併用時の効果を明らかにする。
- ④ NS-187 の細胞膜透過メカニズムを明らかにする。
- ⑤ NS-187 の細胞外への排出メカニズムを検討する。
- ⑥ NS-187 によるネクローシス様細胞死

の誘導、またBH3 only 蛋白との関与を調べる。

(2) 他治療法とNS-187の併用

- ① 他剤（特に、予備実験の結果有望であったビスホスフォネート、シヤペロン阻害剤、インターフェロン）と NS-187 の併用効果について検討する。
- ② NS-187 暴露白血病細胞で刺激された樹状細胞の作用を検討する。

(3) 他疾患への応用。

- ① NS-187 の Lyn 阻害作用を利用し、Lyn 高発現の関与が疑われている他の血液疾患（多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病など）に対する効果を検討する。
- ② 消化管間質腫瘍（GIST）などの固形腫瘍に対する作用を検討する。

4. 研究成果

点突然変異を有するイマチニブ抵抗性の慢性骨髄性白血病(CML)にも奏効する純国産のBcr-Abl/Lyn同時阻害剤の臨床開発を目指して研究を行い、下記の成果をあげることができた。

(1) イマチニブ(IM)とAblの複合体結晶X線解析結果から、バイオインフォーマティクスを駆使して疎水性ポケットに化学的に構造展開の可能性を見出し多くの化合物を合成した。フルオロメチル基を導入した分子が、この疎水性ポケットにフィットし、分子とAblのATP結合領域の結合親和性が高まることを見出した。

(2) 上記のフルオロメチル基を導入した分子を多数合成し、化合物のキナーゼ阻害作用および安全性を指標に、Abl 親和性が IMより25~55倍高く、Src family

の一つでありIM耐性に関与するLynを高い特異性を保ちながらBcr-Ablとともに阻害するBcr-Abl/Lyn同時阻害剤NS-187をスクリーニングの結果同定した。

(3) 13種類の変異Bcr-Ablを発現するBaF3細胞および患者細胞の増殖に対するNS-187の*in vivo*効果を検討した結果、T315 Iの突然変異には無効であるものの、その他の変異Bcr-Ablを有する白血病細胞の増殖を低濃度で抑制することを明らかにした。

(4) 上記の白血病細胞の増殖抑制効果機序はアポトーシスの誘導であることを明らかにした。さらに、アポトーシス誘導以外のメカニズムについても検討した。

IMが無効な中枢神経性白血病に対するNS-187の効果、さらに血液脳関門に関与するP糖蛋白(P-gp)に対する阻害剤併用時の効果を検討した。その結果、NS-187はP-gpの基質となり、細胞外に排出されるが、中枢神経内に残存する濃度で有意に中枢神経に浸潤した白血病細胞の増殖を抑制することを、あらたに開発した中枢神経系白血病マウスをもちいて証明した。

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14件)

- ① Takeuchi, M., Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T. : Dual BCR-ABL/LYN tyrosine kinase inhibitor, INNO-406. (Drug of the Future, in press, 2009).
- ② Kamitsuji, Y., Kuroda, J., Kimura, S., Toyokuni, S., Watanabe, K., Ashihara, E., Tanaka, H., Watanabe, M., Matsubara, H., Mizushima, Y., Hiraumi, Y., Kawata,

- E., Yoshikawa, T., Maekawa, T., Nakahata, T., Adachi, S.: Modes of cell death execution and autophagy by INNO-406, a Bcr-Abl kinase inhibitor, in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Diff*, 15(11):1712-1722, 2008.
- ③ Tanaka, R., Kuroda, J., Stevenson, W., Ashihara, E., Ishikawa, T., Taki, T., Kobayashi, Y., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Takeuchi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Hirai, M., Majima, S., Taniwaki, M., Maekawa, T., Kimura, S.: Detection of the V617F mutation in JAK2 using a novel, fully automated, SNP super-rapid detector. *Leuk Res*, 32(9):1462-1467, 2008.
- ④ Morinaga, K., Yamauchi, T., Kimura, T., Maekawa, T., Ueda, T.: Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib, and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with *BCR-ABL* gene amplification. *Int J Cancer*, 122(11):2621-2627, 2008.
- ⑤ Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Nakagawa, Y., Kawata, E., Takeuchi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Tanaka, R., Andreeff, M., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Anti-myeloma effect of Homoharringtonine with concomitant targeting of multiple myeloma-promoting molecules, Mcl-1, XIAP and b-catenin. *Int J Hematol*, 87(5):507-515, 2008.
- ⑥ Deguchi, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Niwa, T., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T. Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib, and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines. *Leuk Res*, 32(6):980-983, 2008.
- ⑦ Kuroda, J., Kimura, S., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Ashihara, E., Kawata, E., Takeuchi, M., Tanaka, R., Tanaka, H., Matsumoto, Y., Andreeff, M., Taniwaki, M., Maekawa, T.: ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myelogenous leukaemias with diverse drug resistance mechanisms. *Brit J Haematol*, 140(2):181-190, 2008.
- ⑧ Maekawa, T., Ashihara, E., Kimura, S.: The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome positive leukemias. Review. *Int J Clin Oncol* 12(5):327-340, 2007.
- ⑨ Kuroda, J., Kimura, S., Strasser, A., Andreeff, M., O' Reilly, L. A., Ashihara, E., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Kawata, E., Deguchi, Y., Takeuchi, M., Tabe, Y., Taniwaki, M., Maekawa, T.: Dual molecular targeting by INNO-406, a second generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT737, an inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 proteins against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Diff*, 14(9):1667-77, 2007.
- ⑩ Yokota, A., Kimura, S., Masuda, S., Ashihara, E., Kuroda, J., Sato, K., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Deguchi, Y., Urasaki, Y., Terui, Y., Ruthardt, M., Ueda, T., Hatake, K., Inui, K., and Maekawa, T.: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph⁺ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its

in vivo activity. Blood, 109(1):306-314, 2007.

- ⑪ Kimura, S., Niwa, T., Hirabayashi, K., Maekawa, T.: Development of NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor. Cancer Chemo Pharmacol, 58 Suppl 7:55-61, 2006.
- ⑫ Naito, H., Kimura, S., Nakaya, Y., Naruoka, H., Kimura, S., Ito, S., Wakayama, T., Maekawa, T. and Hirabayashi, K.: *In vivo* inhibitory effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation of leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations. Leuk Res, 30(11):1443-1446, 2006.
- ⑬ Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T.: New tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia (review). Curr Pharma. Biotech, 7(5): 371-379, 2006.
- ⑭ Naito, H., Kimura, S., Nakaya, Y., Naruoka, H., Ito, S., Wakayama, T., Maekawa, T. and Hirabayashi, K.: *In vivo* inhibitory effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on the proliferation of leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations. Leuk Res, 30(11):1443-1446, 2006.

[学会発表] (計5件)

- ① Maekawa, T.: Novel dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor for imatinib-resistant leukemia. (Special lecture, Invited). Seoul National University (Seoul, Korea) (7th June, 2006)
- ② Maekawa, T.: Bcr-Abl mutations and new agents in the treatment of

imatinib-resistant Ph⁺ leukemias. The 12th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy (JFCR-ISGC) (Tokyo, Japan) (3rd December 3, 2007)

- ③ Maekawa, T.: On the cutting edge of cellular and molecular therapeutics developed in Kyoto university hospital. (Invited Plenary Lecture) The Annual Symposium 2008 of the Korean Society for Laboratory Medicine (W Seoul-Wakerhill Hotel, Seoul, Korea) (10th April, 2008)
- ④ Yokota, A., Kimura, S., Masuda, S., Ashihara, E., Urasaki, Y., Terui, Y., Ruthardt, M., Ueda, T., Hatake, K., Inui, K., Maekawa, T.: Cyclosporin A, a P-gp inhibitor, augments the anti-central nervous system Ph⁺ leukemia effects of INNO-406. The American Society of Hematology 48th Annual Meeting and Exposition (ASH) (Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA) (December 12, 2006) (Abstract#834) Blood 108:11 (supple): 198, 2006.
- ⑤ Takeuchi M, Kuroda J, Kimura S., Ashihara E., Umezawa K, Yasui E, Kawatani M, Osada H, Hodohara K, Fujiyama Y, Maekawa T.: Glyoxalase-I Is a Potential Therapeutic Target for Chronic Myelogenous Leukemia Cells That Have Acquired Drug Resistance through Adaptation to Hypoxia. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition (ASH) (Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, USA) (December 10, 2007) (Abstract #2931) Blood,

110:11(supple), 2007.

〔図書〕(計3件)

- ① Kimura, S., Maekawa, T.: Stem cell transplantation for Ph+ leukemias in the imatinib and post-imatinib eras. *In*, “Bone Marrow Transplantation: New Research.” (ed. By Davidson DF), Nova Science Publishers, Inc. review, pp.1-38, 2006.
- ② 前川 平、芦原英司、木村晋也: シグナル伝達系阻害剤. がんの分子標的治療 (鶴尾 隆 編集)、南山堂、東京、pp. 291-298, 2008.
- ③ 木村晋也、前川 平: イマチニブ以後の白血病に対する分子標的療法薬. Annual Review 血液 2006 (高久史磨、溝口秀昭、坂田洋一、金倉 譲、小島勢二 編集)、中外医学社、東京、p.99-113, 2006.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 変異の検出方法

発明者: 木村晋也、前川 平、平井光春、間嶋智史)

権利者: 京都大学、アークレイ株式会社

種類: 特願

番号: 2006-216194

出願年月日: 2006年8月8日

国内外の別: 国内

〔その他〕

- ① 脳の白血病に効果-新薬候補物質、少量で (日本経済新聞、2007年7月2日)
- ② がんナビ: 白血病対象 INNO-406 のフェーズ1が終了、予備的分析で好結果 <http://cancernavi.nikkeibp.co.jp/news/inno4061.html>

③ INNO-406 Demonstrates Positive Clinical Responses In Phase 1 Trial In Patients With Chronic Myeloid Leukemia. <http://www.medicalnewstoday.com/articles/129240.php>

④ INNO-406 - Wikipedia

<http://de.wikipedia.org/wiki/INNO-406>

⑤ <http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~dtm/>

⑥ <http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ccmt/>

⑦ <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/cira/>

⑧ <http://www.med.kyoto-u.ac.jp/GCOE/J/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 平 (MAEKAWA TAIRA)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 80229286

(2) 研究分担者

木村晋也 (KIMURA SHINYA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 80359794

芦原英司 (ASHIHARA EISHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70175197