

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18790720  
 研究課題名（和文） 11q23 転座型白血病に対する Rapamycin の効果に関する研究  
 研究課題名（英文） Efficacy of Rapamycin in leukemia with chromosomal 11q23 translocation  
 研究代表者  
 竹谷 健（TAKETANI TAKESHI）  
 島根大学・医学部・講師  
 研究者番号：30359880

## 研究成果の概要：

予後不良な経過をとる MLL 遺伝子再構成を有する 11q23 転座型白血病において、Rapamycin の抗腫瘍効果およびその機序を検討した。MLL 遺伝子再構成を有する白血病細胞株において分化誘導能、アポトーシス促進能、細胞増殖抑制能がみられたが、MLL 遺伝子が正常な細胞株と同程度であった。さらに、他の抗がん剤との相乗効果を細胞増殖能およびアポトーシス誘導能で検討したところ、付加的効果が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：小児血液学、小児腫瘍学、小児遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Rapamycin, 乳児白血病、MLL 遺伝子、FLT3 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

11q23 転座型白血病は白血病/骨髄異形成症候群(MDS)にみられる染色体転座で、乳児白血病や治療関連白血病/MDS に多くみられる。特に乳児白血病の急性リンパ性白血病

(ALL)の 80%以上にこの転座が関与している。この 11q23 転座型白血病/MDS において、染色体 11q23 の切断部位から単離された MLL 遺伝子の関与が報告されている。MLL 遺伝子が関与する白血病/MDS は化学療法だけで治癒することが少なく、造血幹細胞移植を行

っても生命予後は不良である。そのため、新しい治療法の開発が望まれている。

我々は MLL 遺伝子が関与する乳児白血病に注目して、Genechip を用いて遺伝子プロファイリングを行った。その結果、他のグループと同じく細胞増殖に関わる FLT3 遺伝子が高発現していることを見出した (Cancer Res.63:4882-4887,2003)。また、FLT3 遺伝子変異は AML の予後不良因子であるが、これまで ALL には変異が認められなかった。

我々はこの変異を MLL 遺伝子が関与する乳児 ALL の 18%に認められることを報告した (Blood.103: 1085-1088,2004)。この FLT3 遺伝子の target にした分子標的剤が開発されたが、治療効果は十分とは言えない。最近、臓器移植の拒絶反応を防ぐために使用されている免疫抑制剤である Rapamycin が細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用および分化促進作用を有することが報告されて、抗腫瘍効果を持つことが明らかとなった。さらに抗がん剤の併用により抗腫瘍効果が増強されることが報告された。

## 2. 研究の目的

我々は、MLL 遺伝子が関与する 11q23 転座型白血病細胞株および白血病細胞検体を用いて in vitro と in vivo において Rapamycin の抗腫瘍効果およびその機序を明らかにすること。将来の治療法の発展に貢献すること。

## 3. 研究の方法

(1) MLL 遺伝子再構成陽性白血病細胞株 6 株 (骨髄性白血病細胞株 3 株、リンパ性白血病細胞株 3 株)、MLL 遺伝子再構成陰性白血病細胞株 6 株 (骨髄性白血病細胞株

3 株、リンパ性白血病細胞株 3 株) を用いて、細胞培養を行う。培養した細胞に Rapamycin を添加した前後で、分化誘導能を形態および fluorescence activated cell sorting(FACS)で検討した。アポトーシス誘導能は fluorescence activated cell sorting(FACS)およびウェスタンブロット法で検討した。また、細胞増殖能はコロニーアッセイおよびサイミジンの取り込みで評価した。

(2) Rapamycin と抗がん剤との併用での抗腫瘍効果を調べるために、数種類の抗がん剤 (エトピシド、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ステロイド、シタラビン) を用いて、細胞増殖能およびアポトーシス誘導能を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) Rapamycin による分化誘導能

MLL 遺伝子再構成に関わらず、骨髄性白血病細胞株は Rapamycin 濃度依存性に核にくびれのある好中球に類似した形態の細胞が認められた。FACS でも CD11b 陽性細胞が認められた。一方、リンパ性白血病細胞株は Rapamycin 投与で成熟した細胞に分化することが認められなかった。このことから、MLL 遺伝子の再構成に関係なく骨髄性白血病細胞株は Rapamycin により分化誘導されることが示された。これらの効果は PI3 キナーゼ阻害剤である wortmannin で阻害されるため、PI3 キナーゼが関与していることが示唆された。

### (2) Rapamycin のアポトーシスへの影響

各細胞株において、Rapamycin 投与 24、48 および 96 時間後にアポトーシスを調べた。

FACS 解析において、24~48 時間後に MLL 遺伝子再構成に関わらず、濃度依存性に、AnnexinV 陽性 PI 陰性の早期のアポトーシス細胞が認められ、また、48~96 時間後に AnnexinV 陽性 PI 陽性の後期アポトーシスおよび壊死を示す細胞群が認められた。また、活性型 Caspase3 陽性細胞も増加した。ウェスタンブロット解析では、48 時間をピークにほぼすべての細胞株において、Rapamycin 濃度依存性に、Caspase3/7、チトクローム C、切断された PARP が検出された。しかし、どちらの解析方法でも、MLL 遺伝子再構成の有無によるアポトーシスの強さには違いがみられなかった。なお、骨髄性白血病細胞株がリンパ性白血病細胞株よりも Rapamycin によるアポトーシスを誘導される傾向はみられた。このアポトーシス作用は wortmannin により一部阻害されるため、PI3 キナーゼがアポトーシスに一部関与していることが示唆された。

### (3) 細胞増殖能

細胞増殖能をコロニーアッセイで検討した。Rapamycin を投与すると濃度依存性にすべての細胞株においてコロニー数が Rapamycin を投与していない場合と比べて、優位に減少した。この現象は骨髄性細胞株において顕著に認められた。また、サイミジンの取り込みでも検討したところ、Rapamycin を投与された細胞群は投与されていない細胞群よりも優位にサイミジンの取り込みが減少した。このことから、Rapamycin が白血病細胞株において細胞増殖を抑制することが明らかとなった。しかし、MLL 遺伝子再構成の有無による違いは認めることができなかった。なお、この細胞増殖効果は wortmannin で阻害されるため、細胞増殖には PI3 キナーゼが関与していることが示唆さ

れた。

### (4) 他の抗がん剤併用による効果

Rapamycin は通常免疫抑制剤であり、上記に記載した分化誘導能の亢進、アポトーシス促進作用、細胞増殖能の抑制作用による抗腫瘍活性を *in vivo* で発揮することは単独では困難である。そのため、他の抗がん剤と併用することで抗腫瘍活性が増強するかを検討した。Rapamycin と異なった 5 種類の抗腫瘍剤（エトピシド、シクロフォスファミド、ドキシソルビシン、ステロイド、シタラビン）を併用して検討した。細胞増殖能について、Rapamycin 単独よりも併用群の方がコロニーアッセイでコロニー数の減少がみられた。骨髄性白血病細胞株においては、エトピシド、シクロフォスファミド、ドキシソルビシンおよびシタラビンの 4 剤との併用で細胞増殖が抑えられた。リンパ性白血病細胞株においては、併用したすべての抗腫瘍剤で細胞増殖が抑えられた。サイミジンの取り込み実験でも同様の結果が得られた。アポトーシスについても、Rapamycin 単独よりも、使用された抗腫瘍剤併用群すべてにおいて FACS で AnnexinV 陽性細胞や活性型 Caspase3 陽性細胞の数の増加が認められた。また、ウェスタンブロット解析でも Caspase3/7、チトクローム C、切断された PARP が検出された。これらのことから、Rapamycin と抗腫瘍剤との併用は、細胞増殖の抑制およびアポトーシスの亢進を惹起させることが明らかとなった。この効果は、MLL 遺伝子再構成の違いによる差は認めなかったが、細胞株毎に併用薬との効果の違いは認められた。これらの結果が相乗効果を得ているかどうか検討したところ、Rapamycin と抗がん剤の併用は使用されたすべてにおいて、相乗効果は認められなかったが、付加的な効果は認められた。

(5) ヒト白血病細胞での検討

以上の実験をヒト白血病細胞において検討した。しかし、細胞保存状態が悪かったこと、細胞数が少なかったこと、検討した細胞が5検体 (MLL 遺伝子再構成陽性細胞2検体、MLL 遺伝子再構成陰性細胞3検体) と少なかったことなどから、ヒト白血病細胞における Rapamycin の効果を証明することができなかった。

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5件)

1. Taketani T, Taki T, Sako M, Ishii T, Yamaguchi S, Hayashi Y. MNX1-ETV6 fusion gene in an acute megakaryoblastic leukemia and expression of the MNX1 gene in leukemia and normal B cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;186:115-9. 査読あり
2. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 50:264-9, 2008. 査読あり
3. Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. Mutations of GATA1, FLT3, MLL-partial tandem duplication, NRAS, and RUNX1 genes are not found in a 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2) having a good prognosis. *Cancer Genet Cytogenet.* 180:74-8, 2008. 査読あり

4. Horie A, Akimoto M, Tsumura H, Makishima M, Taketani T, Yamaguchi S, Honma Y. Induction of differentiation of myeloid leukemia cells in primary culture in response to lithocholic acid acetate, a bile acid derivative, and cooperative effects with another differentiation inducer, cotylenin A. *Leuk Res.* 32:1112-1123, 2008. 査読あり

5. Shimada A, Taketani T, Kikuchi A, Hanada R, Arakawa H, Kimura H, Chen Y, Hayashi Y. AML1 Mutation and FLT3-internal Tandem Duplication in Leukemia Transformed From Myelodysplastic Syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29:666-667, 2007. 査読あり

[学会発表] (計1件)

1. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi: Correlation of FLT3-ITD and KIT mutations with clinical features in myeloid malignancies with NUP98-HOX fusion genes. 50<sup>th</sup> American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹谷 健 (TAKETANI TAKESHI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：30359880