

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790674

研究課題名（和文）慢性骨髄性白血病における低酸素骨髄ニッチ環境由来治療抵抗性の克服

研究課題名（英文）Drug resistance mediated by hypoxic bone marrow leukemia environment in chronic myelogenous leukemia

研究代表者

黒田 純也 (JUNYA KURODA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70433258

研究成果の概要：低酸素環境における慢性骨髄性白血病(CML)細胞の薬剤耐性メカニズムと解糖系依存、ならびに低酸素下での薬剤耐性克服における分子標的としての解糖系解毒酵素 Glyoxalase-I 阻害の重要性が *in vitro*、*in vivo* で明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	510,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：慢性骨髄性白血病、低酸素、骨髄ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性骨髄性白血病 (CML) は疾患特異的な Philadelphia 染色体異常による Bcr-Abl 融合蛋白の恒常的なチロシンキナーゼ (TK) 活性亢進による造血幹細胞の腫瘍化により発症する。この分子異常を特異的に阻害するメシル酸イマチニブ (IM) が開発され、劇的に治療予後を改善したが、近年、Bcr-Abl TK 活性の阻害のみでは CML 細胞の完全な根絶は困難であること、その他の分子を同時に標的とすることの重要性が示唆され、次なる標的分子の同定と治療薬の研究が急務である。

(2) 骨髄微小環境において CML 細胞を Bcr-Abl TK 阻害剤などによる細胞死誘導シグナルから庇護し、増殖を許し、やがては致

命的状態を作り上げるメカニズムへの対策が必要である。白血病細胞の生育環境=骨髄ニッチに由来する治療抵抗性獲得機構について、それらが CML 細胞の形質へ与える効果とその分子機序を明らかにし、それらの制御を可能にする治療戦略を構築することが重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 低酸素状態が CML 細胞自身に及ぼす効果 (アポトーシス耐性、エネルギー産生、細胞内代謝、細胞遊走能や接着能に対する効果、さらにそれらが及ぼす Bcr-Abl 阻害に対する影響など) と、その分子メカニズムを *in vitro* において明らかにする。同時に、低酸素環境の与える骨髄構成細胞 (骨

髄ストローマ細胞など) と CML 細胞の相互作用について明らかにする。

(2) 低酸素による治療抵抗性メカニズムの *in vivo*での意義をマウス CML モデルにおいて検討する。CML 細胞の生着様式、Bcr-Abl 阻害剤による治療後の残存様式と低酸素領域との関係を骨髄などで解剖学的に検討するとともに CML 細胞の分子動態を *in situ*免疫染色やマイクロダイセクションによる遺伝子発現解析などで明らかにする。

(3) Bcr-Abl 阻害剤治療に対する耐性獲得に関わる分子メカニズムを克服しうるあたらしい分子標的治療戦略を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro*において定常酸素状態との比較により低酸素状態がCML細胞に及ぼす分子細胞生物学的効果を明らかにする。

- ① 低酸素耐性CML細胞株の低酸素条件下 (1% O<sub>2</sub>) でのBcr-Abl阻害剤の効果の検討
- ② 低酸素耐性CML細胞株のBcr-Abl阻害剤耐性メカニズムの解明
- ③ 低酸素条件でのCML細胞のBcr-Abl、Ras/MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT経路の活性、細胞周期制御分子、BH3-only protein(Bimなど)の発現の検討。

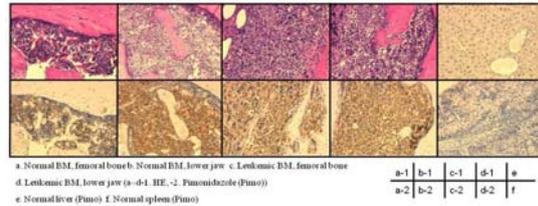
(2) CML 細胞に対する Bcr-Abl TK 阻害剤による治療反応における骨髄ニッチの影響の研究

CML細胞の骨髄内での局在、Bcr-Abl阻害剤投与下での残存細胞の組織解剖学的な局在と薬剤抵抗性に関わる分子メカニズムの検討を目的に以下を行う。

- ① 移植CML細胞の生着様式の検討：CML細胞の生着、拡大様式を解剖学的に検討することでCML細胞の骨髄ニッチを同定する。
- ② CML細胞の *in vivo*解剖学的局在とBcr-Abl TK阻害剤への抵抗性メカニズムの検討 *in vivo*での低酸素条件の及ぼすCML細胞への効果
- ③ 骨検体採取の数時間前にpimonidazoleを経静脈的に投与、免疫染色を行うことでCML細胞やニッチ構成細胞における低酸素条件の関わりについて確認する。

### 4. 研究成果

(1) CML 細胞の骨髄内低酸素領域における生着



ヒト CML 細胞を免疫不全マウスに移植し、骨髄内生着について検討したところ、移植 CML 細胞は骨髄内の低酸素領域に存在することが明らかになった。

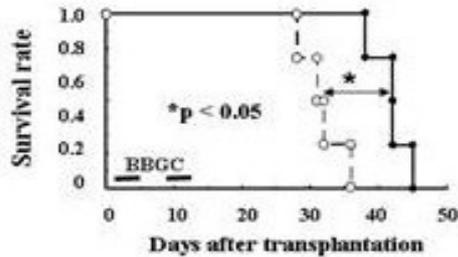
- (1) 低酸素適応 CML 細胞株の樹立  
1%酸素培養器にて CML 細胞株を培養したところ、多くの細胞がアポトーシスによる細胞死に誘導されたが、培養を継続したところ低酸素条件適応亜株が数種の CML 細胞株で樹立された。
- (2) 低酸素適応による薬剤耐性の獲得  
低酸素環境適応 CML 細胞亜株 (HR) は、imatinib、nilotinib、dasatinib、INNO-406 などの Bcr-Abl TKI、ならびにブスルファン、ダウノルビシンに対して抵抗性であった。
- (3) CML/HR 細胞株における解糖系解毒酵素である Glyoxalase-I (Glo-I) の高発現  
定量的 RT-PCR、Western Blot 法にて HR 亜株での Glo-I が 2 倍以上に高発現していることが分かった。また、Glo-I 活性が上昇していることが明らかになった。
- (4) TKI 抵抗性低酸素適応 CML 細胞株は Glo-I

		K562	K562/HA	KCL22	KCL22/HA
Abl TKIs	Imatinib (μM)	0.9	7.4	-	-
	Dasatinib (nM)	3.6	8.9	46.2	2264
	INNO-406 (nM)	10.7	142.6	-	-
Alkylating agents	Daunorubicin (nM)	-	-	105	954.3
	Busulfan (mM)	2.4	4.5	2.2	3.0
Glo-I Inhibitor	BBGC (μM)	21.6	5.7	40.7	12.6
	COTC (μM)	45.9	16.8	29.6	17.9
	m-GFN (μM)	>300	230.2	>300	174.2

阻害剤に対して高感受性である BBGC, COTC, methyl-Gerferin など Glo-I 活性阻害剤の抗腫瘍効果について *in vitro* で検討した。HR 細胞株は親株に比べ、Glo-I 阻害剤に高感受性であることが明らかになった。

- (5) BBGC は K562/HR を移植した CML モデルマウスの生存を延長する。  
K562/HR を経静脈的に免疫不全マウスである NOG マウスに移植し、CML モデルマ

ウスを作成。BBGC で治療した群は有意に



生存が延長した。

以上より、骨髄内低酸素環境に存在する CML 細胞は既存の TKI s に対して抵抗性であり微小残存病変の温床となること、それらの細胞はエネルギー産生において解糖系に依存しており、解毒酵素である Glo-I 活性に依存していること、また、Glo-I 阻害に高感受性であり細胞死に誘導されることから、Glo-I の新たな分子標的としての可能性が示された。

#### 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 4 件)

- ① Kamitsuji Y, Kuroda J, Kimura S, Toyokuni S, Watanabe K, Ashihara E, Tanaka H, Yui Y, Watanabe M, Matsubara H, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kawata E, Yoshikawa T, Maekawa T, Nakahata T, Adachi S. The Bcr-Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Differ*, 1712-1722;15, 2008
- ② Kuroda J, Kimura S, Andreeff M, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, Tanaka R, Murotani Y, Matsumoto Y, Tanaka H, Strasser A, Taniwaki M, Maekawa T. ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myelogenous leukaemias with diverse drug resistance mechanisms. *Br J Haematol*, 181-190, 140, 2008
- ③ Kuroda J, Kimura S, Strasser A, Andreeff M, O'Reilly LA, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, Tanaka R, Tabe Y, Taniwaki M, Maekawa T. Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ*. 1667-1677, 14, 2007

- ④ 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 KI, 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*, 306-314, 109, 2007

[学会発表] (計 6 件)

- ① 武内美紀, 黒田純也, 上辻由里, 木村晋也, 芦原英司, 程原佳子, 藤山佳秀, 川谷 誠, 長田裕之, 安井英子, 梅澤一夫, 鶴尾 隆, 前川平: 低酸素環境適応性 CML 細胞に対する Glyoxalase-1 阻害時の効果. 第 70 回日本血液学会総会. 平成 20 年 10 月 10-12 日 (京都) (2008)
- ② 武内美紀, 黒田純也, 木村晋也, 芦原英司, 上辻由里, 程原佳子, 藤山佳秀, 安井英子, 梅澤一夫, 前川平: 低酸素環境適応による慢性骨髄性白血病の治療抵抗性獲得機序とその克服. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会・合同総会 (横浜), 平成 19 年 10 月 13 日 (2007)
- ③ 黒田純也, 木村晋也, 芦原英司, 前川平: 新規 Bcr-Abl 阻害剤 INNO-406 と Bcl-2 阻害剤 ABT-737 の併用による慢性骨髄性白血病治療戦略. 第 11 回がん分子標的治療研究会総会 (大阪), 平成 19 年 7 月 6 日 (2007)
- ④ 黒田純也: 白血病の分子標的治療と Bcl-2 ファミリー. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会合同開催 (横浜), 平成 19 年 10 月 11 日 (2007)
- ⑤ Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Hodohara K, Nakahata T, Fujiyama Y, Maekawa T: Glyoxalase-I inhibition eliminates hypoxia-adapted CML cells resistant to imatinib, dasatinib, and INNO-406. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting and Exposition (San Francisco, California, USA) 平成 20 年 12 月 (2008)
- ⑥ 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 49th Annual Meeting of American Society of Hematology (Atlanta, Georgia, USA) 平成19年12月8-11日(2007)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

黒田 純也 (JUNYA KURODA)  
京都府立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70433258