

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：86202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08840

研究課題名(和文) MLL遺伝子再構成陽性乳児ALLに対するFLT3を標的とした分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Developing of target therapy directing FLT3 against infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement.

研究代表者

永井 功造 (Kozo, Nagai)

独立行政法人国立病院機構四国こどもととなの医療センター(臨床研究部(成育)、臨床研究部(循環器))・小児血液腫瘍内科・医長

研究者番号：90527508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：MLL(KMT2A)再構成においてFLT3が再構成陰性の細胞株と比較して20～60倍に発現されていることをRT-PCRで確認した。最もFLT3の発現が高かった細胞株KOCL69に対しFLT3阻害剤とその他の分子標的薬を併用して培養し、細胞増殖の抑制効果を確認した。メチル化阻害剤(アザシチジン)、Bcl2阻害剤、メニン阻害剤を使用した有効な相加相乗効果は得られなかった。さらなる併用する阻害剤の検索が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLL(KMT2A)遺伝子再構成陽性の乳児急性リンパ性白血病(乳児ALL)は造血幹細胞移植を含む強力な治療にも関わらず予後不良で、治療の影響による移植片対宿主病(GVHD)や成長障害、内分泌障害、心機能障害などの晩期障害は深刻である。MLL再構成ALLにおいてはFLT3の過剰発現が認められ、FLT3阻害剤と有効な併用阻害剤を同定して、治療関連合併症と晩期障害の少ない治療法の開発を試みた。細胞株に対しBcl-2阻害剤、Menin阻害剤、メチル化阻害剤を併用して検証したが、残念ながら有効な相加相乗効果は得ることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：RT-PCR demonstrated MLL rearrangement positive leukemia cell line expressed FLT3 20～60 times as much as negative one. KOCL69, leukemia cell line is most expressing FLT3 was cultured with FLT3 inhibitor and other inhibitor, and synergistic effect were evaluated. Neither methylation inhibitor, Bcl-2 inhibitor nor menin inhibitor showed effective synergistic activity with FLT3 inhibitor. Further investigation of inhibitor showing synergy with FLT3 inhibitor is required.

研究分野：小児白血病

キーワード：乳児白血病 分子標的治療 MLL(KMT2A)遺伝子再構成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳児白血病は1歳未満で発症する白血病と定義され、その中で多くを占めるのが急性リンパ性白血病(ALL)である。本邦での新規診断症例は25~30例と推定されている。特に、乳児ALLの70~80%に認められる染色体11q23領域に存在するMLL(Mixed-Lineage Leukemia)遺伝子の再構成(rearranged MLL; MLL-R)のある病型は予後不良であり、その5年生存率は概して50%前後であり小児白血病の中で最も予後不良な病型の一つである。治癒したとしても幼少期に受けた化学療法や同種造血幹細胞移植の影響による移植片対宿主病(GVHD)や成長障害、内分泌障害、心機能障害などの晩期障害は深刻である。

以上の状況から乳児MLL再構成ALLに対し分子標的療法による、効果的かつ副作用の少ない新たな観点に基づいた治療法の開発が求められている。MLL再構成でC末端を失ったMLL融合蛋白はHox遺伝子群(HoxA7, HoxA9, HoxA10)やMeis1発現の誘導を介してFLT3の高発現を引き起こす。このようにMLL再構成ALLにおいては、FLT3の発現変化・活性変化が白血病細胞の増殖や分化、アポトーシスに影響を与えている可能性が高いと考えられ、治療においてFLT3阻害剤は非常に有望な薬剤である。しかしながらFLT3阻害剤の臨床試験においては、そのMLL再構成ALLに対する臨床効果は十分ではなく、また耐性獲得などの問題が懸念される結果であった。

### 2. 研究の目的

FLT3抑制下のMLL遺伝子再構成ALLにおける白血病細胞の維持に重要な他のシグナルを同定し、その経路を標的とする分子阻害剤を併用することによる有効性を前臨床試験で証明する。FLT3阻害剤を投与する事によるその他のがん幹細胞の維持に重要なシグナル伝達系への影響は明らかにされていない。本研究により複数の細胞内シグナル伝達を抑える戦略が有効であれば、化学療法に代わり急性期および晩期合併症の少ない効果的な治療が確立させる。

### 3. 研究の方法

MLL再構成陽性ALL細胞株(KOCL45, KOCL58, KOCL69, KOPB26, KOCL44, KOPN1)に対し、FLT3阻害剤と乳児白血病の治療薬として有望なMenin阻害剤、メチル化阻害剤、bcl-2阻害剤等と併用し効果を相加的あるいは相乗的に高める組み合わせを同定し、機序として併用効果の要素となる遺伝子またはシグナル伝達を同定する。

そのシグナル経路が同定されたら、それを標的とする分子標的薬をFLT3阻害剤と併用してその効果を下記の指標を用いて検証する。

細胞増殖抑制効果	}	白血病細胞株を使用した実験
アポトーシス誘導効果		
細胞周期停止効果		
コロニー形成阻止効果		
NOGマウスを用いた <i>in vivo</i> での増殖抑制効果		
患者白血病細胞を用いた細胞増殖抑制効果		

### 4. 研究成果

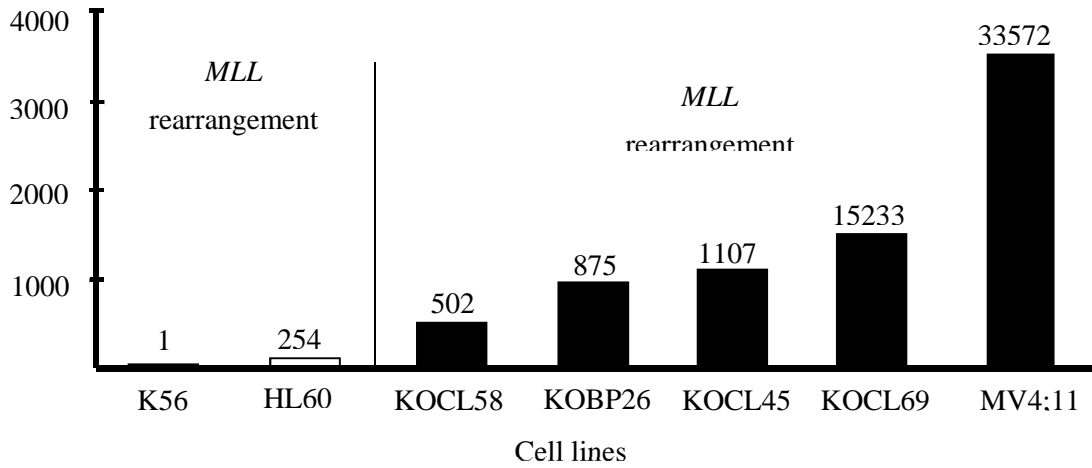
MLL遺伝子再構成乳児ALL細胞株 [KOCL45, KOCL58, KOCL69 (MLL-AF4)、KOPB26 (MLL-AF9)、KOCL44, KOPN1 (MLLENL)]を起こして、10%FCS/RPMIにて3日間培養し、RNAeasy mini kitを使用して分離・保存を行った。Reverse transcriptionによりcDNAを作成し、FLT3発現量をRT-PCR法により確認する。プライマーは、

FLT3 F: AGGATCAGGTGCTTTTGGAA, FLT3 R: TGCCTCTCTTTCAGAGCTGTCを使用した。

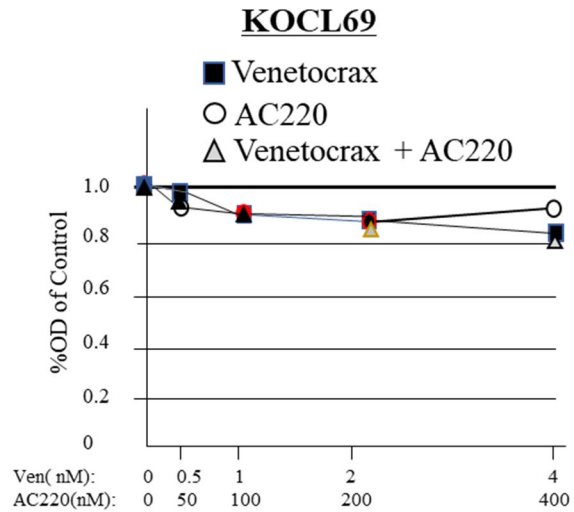
hGAPDHの発現をコントロールとしてFLT3発現を評価した。慢性白血病株K562のFLT3発現量を1として、MLL(KMT2A)再構成陽性株 KOCL58 :502, KOBP26:875, KOCL45:11074, KOCL69:15233であった。FLT3ITD陽性細胞株であるMV4;11では33572倍であり、MLL(KMT2A)再構成陽性株ではFLT3が過剰発現されていることが確認された。

Relative normalized  
expression  
( FLT3 expression/K562 )

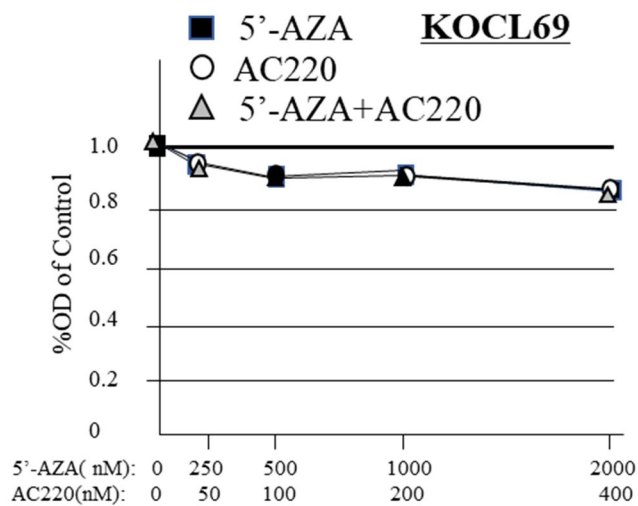
RT-PCR expression analysis



MLL 再構成陽性乳児白血病株である KOCL69 に対し、AC220(FLT3 阻害剤)を 0~400nM の濃度、Venetocrax ( bcl-2 阻害剤 ) を 0~4nM の濃度でそれぞれ単剤と併用で 10%FBS/RPMI に 48 時間培養して MTTassay を実施し各細胞増殖抑制効果を確認した。  
併用による細胞増殖抑制効果の増強は認められなかった。

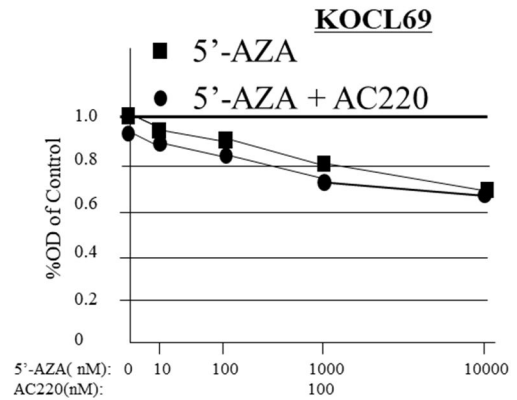
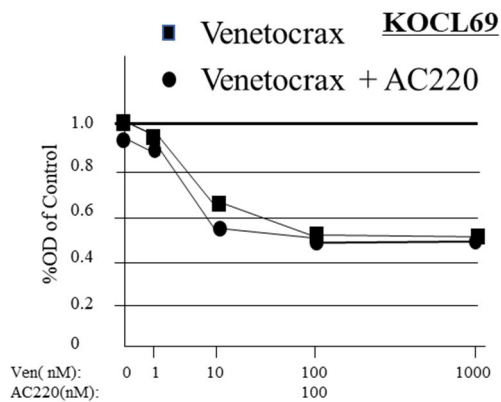


azacytidine (メチル化阻害剤) を 0 ~ 2000nM の濃度で、AC220 を 0 ~ 400nM の濃度でそれぞれ単剤と併用で 10%FBS/RPMI に 48 時間培養して MTTassay を実施し各細胞増殖抑制効果を確認した。併用による細胞増殖抑制効果の増強は認められなかった。

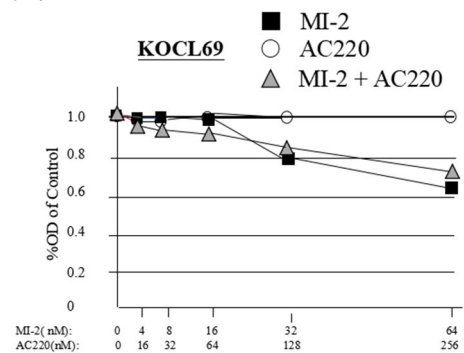


AC220 の濃度を 100nM に固定し、Venetocrax を 0 ~ 1000nM の濃度で振り分け AC220 と AC220 と Venetocrax の併用で KOCL69 を 10%FBS/RPMI に 48 時間培養して MTTassay を実施し各細胞増殖抑制効果を確認した。AC220 の有無に関わらず細胞増殖抑制効果には殆ど差が無く相加相乗効果は認められなかった。

Azacytidine においても 0 ~ 10000nM で濃度を振り分け同様に AC220 を 100nM に固定し MTTassay を行ったが、AC220 の有無の間に細胞増殖抑制の差はほぼ認められなかった。



Menin 阻害剤である MI-2 を 0 ~ 64nM の濃度で振り分け、AC220 を 0 ~ 256nM で振り分け、それぞれの単剤と併用の条件下で KOCL69 を 10%FBS/RPMI で 48 時間培養を行いそれらの細胞増殖抑制効果を検証した。AC220 単独と AC220 と MI-2 の併用との間に増殖抑制効果の差は認められなかった。



以上の実験内容より MLL( KMT2A )遺伝子再構成陽性乳児白血病細胞株 KOCL69 に対し、AC220 とメチル化阻害剤、bcl-2 阻害剤、Menin 阻害剤を併用したが、いずれも相加相乗効果が認められなかった。今後も、そのほかの候補となる阻害剤の検索が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 真理子  (EGUCHI MARIKO)  (40420781)	愛媛大学・医学系研究科・教授   (16301)	
研究分担者	江口 峰斉  (EGUCHI MINENORI)  (50420782)	愛媛大学・医学部附属病院・准教授   (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関