

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20591254

研究課題名（和文） 難治性血液腫瘍疾患に対する新規治療法の開発と新規細胞死機序の解析

研究課題名（英文） Development of new treatment for refractory malignant diseases and investigation of new cell death mechanisms

研究代表者

足立 壮一 (ADACHI SOUICHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10273450

研究成果の概要（和文）：Rhabdoid 腫瘍における depsipeptide の細胞死誘導機序にオートファジーが関与し、AIF の核からミトコンドリアへの偏移が関与すること、depsipeptide 耐性化に ERK シグナルが関与することを報告した。マウス骨肉腫好転移株を樹立し、zoledronic acid や CPT11 で肺転移を抑制でき、invasion も抑制されることを見出した。小児 AML 新規予後不良因子として BAALC exon5、新規予後良好因子として *CEBPA* 変異を同定した。

研究成果の概要（英文）： We reported autophagy in malignant rhabdoid cells induced by depsipeptide and found that AIF translocation from mitochondria to nuclei has been related with this autophagy. We also analysed resistant mechanism of depsipeptide from our depsipeptide-resistant cell lines and ERK pathway was activated in these resistant cells. We established mouse osteosarcoma cell line which is easily metastasize to lung and treated those mice by zoledronic acid and CPT11. CPT11 inhibited invasion of osteosarcoma cells and inhibited lung metastasis in vivo. We also reported that exon 5 of *BAALC* as a new poor prognostic factor and *CEBPA* mutations as good prognostic marker in child acute myelogenous leukemia (AML).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：難治性血液腫瘍疾患、細胞死、アポトーシス、オートファジー、転移抑制、予後因子解析

1. 研究開始当初の背景

難治性血液腫瘍疾患は、抗癌剤耐性や転移のため死に至るため、新規抗癌剤や分子標的療法薬の開発が必要である。これら新規薬剤の耐性克服、転移抑制の過程で血液腫瘍細胞が *in vivo* において細胞死に至るが、その機序の解析こそが治療法の開発においては必須の研究である。従来、白血病に対する *in vivo* での抗癌剤作用機序はアポトーシスであるとされてきたが、近年、固形腫瘍についてはオートファジー、ネクローシス、セネセンスといったアポトーシス以外の細胞死が *in vivo* の系で注目されている。また、難治性腫瘍の死因は抗癌剤の耐性化、転移が重要な問題であり、機序の解明の研究が必須である。難治性白血病の代表疾患である急性骨髄性白血病は、近年、遺伝子変異や遺伝子発現量が予後因子として報告が相次いでおり、診断の WHO 分類にも記載され、成人小児ともに、治療層別化にも加えられつつあり、予後因子の探索研究も重要な研究課題である。

2. 研究の目的

難治性血液腫瘍疾患の新規治療法の開発のために、以下の3つの柱で研究を行う。

(1) 新規分子標的療法薬と autophagy 阻害剤の併用による難治性血液腫瘍疾患に対する新規治療法の開発

(2) 転移抑制機構の解析と新規治療法の開発

(3) AML の新規予後因子の解析と新規治療法の開発

3. 研究の方法

(1) Rhabdoid 腫瘍細胞株に HDAC 阻害剤

(depsipeptide) を *in vitro* 及び *in vivo* において投与し、細胞死誘導機序を形態 (光顕、電顕) 及び FACS、免疫染色 (LC3) western blotting により検討した。また autophagy 阻害薬投与により、細胞死が増強するかどうかやオートファジーの機序に関与する分子 (AIF など) の検討を FACS や免疫電顕により解析した。

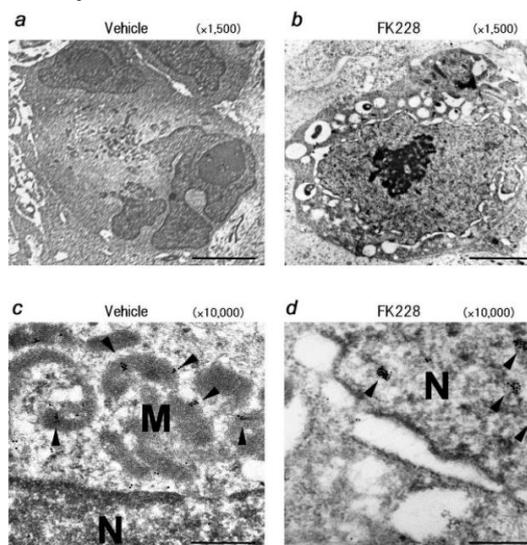
(2) Fidler 法によりマウス骨肉腫好転株を作成し、luciferase 遺伝子を導入し、この細胞を C3H マウスに皮下移植し、Real Time Imaging を用いた高感度 CCD カメラで、生きたままのマウスの体内光を検出し、肺転移を経時的に解析する系を確立した。この系で zoledronic acid や CPT11 を投与して転移抑制効果及び機序 (migration, 細胞極性等) の検討を行った。

(3) 小児 AML99 プロトコル登録検体において、BAALC 発現量を定量 PCR 法にて測定した。また正常核型の新規予後因子探索のため、BAALC isoform 及び CEBPA 変異を cDNA のシーケンス法にて解析した。

4. 研究成果

難治性固形腫瘍 rhabdoid 腫瘍における *in*

vitro 及び *in vivo* での HDAC 阻害剤 (depsipeptide) による細胞死の機序にオートファジーが関与し、AIF の核からミトコンドリアへの偏移がオートファジーに関与すること (Int J Cancer 124:55-67, 2009) を報告した。



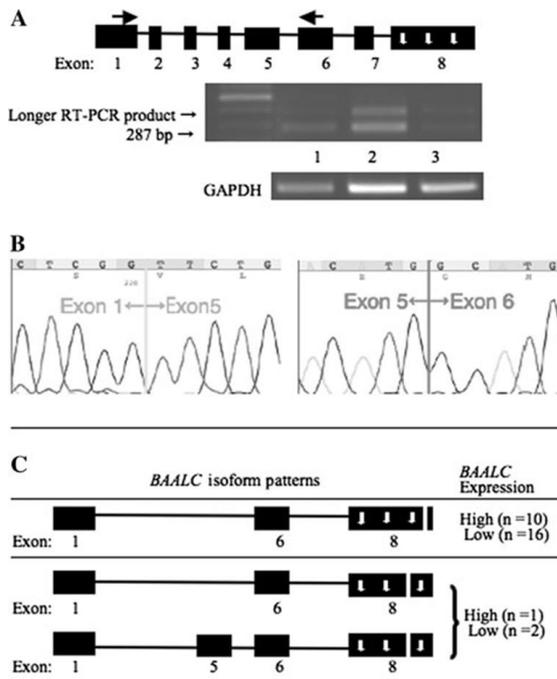
また、depsipeptide 耐性株を樹立し、耐性化の機序として従来から報告されている p-GP のみならず、ERK シグナルが関与することも報告した。(J Pharmcol Exp Ther 328:839-848, 2009)

抗癌剤 (doxorubicin) 投与後の心筋症マウスモデルにおいて、G-CSF を doxorubicin 投与直後から投与すると、心筋の細胞死が抑制され、特にミトコンドリア機能障害 (膜電位低下、呼吸鎖 complex IV 酸素消費能低下) が軽減されることを報告した。(Am J Physiol Heart Circ Physiol 296: H823-H832, 2009) 心筋の細胞死は tunnel 染色陰性であり、アポトーシス以外の細胞死と考えられ、G-CSF 投与により、*in vitro*, *in vivo* 共に doxorubicin 投与による細胞死が抑制された。また、抗酸化剤である EUK8 もマウス心筋症を改善した。(Circ J 73 :2125-2134, 2009) 緑茶に含まれるカテキンが、慢性骨髄性白血病細胞株にカスパーゼ非依存性アポトーシスを誘導することを報告した。(Cancer Sci 100: 349-356, 2009)

転移機構の解析としては、マウス骨肉腫好転株を樹立し、*in vivo* において経時的に肺転移を観察できる系において、zoledronic acid が転移を抑制できることも報告した。(Cancer Lett 274:271-278, 2009) CPT11 投与により、マウス骨肉腫転移が抑制され、*in vitro* の系において、invasion が抑制されることを見出した。(Clin Exp Metastasis *in press*)

成人急性骨髄性白血病 (AML) で予後不良因子と報告された BAALC 発現量 (高発現群が予後不良) を小児 AML99 プロトコル検体の normal

karyotype 29 例について、BAALC 高発現群と低発現群で OS 及び EFS を検討したが、小児では両群に有意差を認めなかった。次に BAALC isoform の解析を行った。解析可能であった 29 例中の 3 例では、1-6-8 以外にエクソン 5 を含む 1-5-6-8 isoform が同定された。3 例とも死亡症例で、エクソン 5 を含む isoform の予後不良因子としての意義が示唆された。また成人 AML で予後良好であることが報告されている CEBPA 変異解析もを行い、normal karyotype 49 例中 4 例 (8.2%) に、新規の CEBPA 変異を同定した。Double mutation 1 例、single mutation 3 例いずれも長期寛解であり、小児においても CEBPA 変異は、予後良好因子であることが示唆された。(Int J Haematol 2010, 91: 831-837)



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 17 件)

1. Yui Y, Watanabe K, Adachi S et al. : Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8. Clin Exp Metastasis 査読有 *in press*
2. Morishima T, Watanabe K, Adachi S, Heike T et al. : Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells for disease investigation. J Cell Physiol 査読有 *in press*
3. Kanazaki R, Adachi S, Ito E: Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. Blood

査読有 *in press*

4. Fujino H, Watanabe K, and Adachi S: Ring/marker chromosome derived from chromosome 7 in childhood acute megakaryoblastic leukemia with monosomy 7. Int J Hematol 査読有 *in press*

5. Mizushima Y, Watanabe K, Adachi S: Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Int J Hematol 査読有 91: 2010, 831-837

6. Nishinaka Y, Arai T, Adachi S: N-acetyl cysteine scavenges singlet oxygen but cannot protect cells from it. Life Sci 査読有 86; 2010, 808-813

7. Kubota M, Adachi S, et al.: Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children; a retrospective multi-center study. Int J Hematol 査読有 91; 2010, 252-257

8. Kato I, Adachi S: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by rituximab. Ped Blood Cancer 査読有 54; 2010, 329-331

9. Kawakami S, Adachi S, Shimizu T et al.: The antioxidant EUK-8 prevents murine dilated cardiomyopathy. Circ J 査読有 73; 2009, 2125-2134

10. Awaya T, Adachi S et al. ; Successful cord blood transplantation using reduced-intensity conditioning regimen for advanced childhood-onset cerebral adrenoleukodystrophy. Pediatr Transplant 査読有 2009 May 30 [Epub ahead of print]

11. Kanda J, Adachi S. et al. ; Long-term survival after HLA-haploidentical SCT from noninherited maternal antigen-mismatched family donors: impact of chronic GVHD. Bone Marrow Transplant 査読有 44: 2009, 327-329

12. Iwasaki R, Adachi S, et al. ; Catechin, green tea component, causes caspase-independent necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia. Cancer Sci 査読有 100: 2009, 349-356

13. Hiraumi Y, Watanabe K, Adachi S et al. ; Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 査読有 296: 2009, H823-H832

14. Matsubara H, Watanabe K, Adachi S et al. ; Involvement of ERK activation in human osteosarcoma cell resistance to the HDAC inhibitor FK228. J Pharmacol Exp Ther 査読有 328: 2009, 839-848

15. Koto K, Adachi S, Maekawa T et al. :

Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. Cancer Lett 査読有 274: 2009, 271-278

16. Toki T, Kanezaki R, Adachi S, et al.; The key role of stemcell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. Leukemia 査読有 23: 2009, 95-103

17. Watanabe M, Adachi S, Watanabe K, et al.: Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. Int J Cancer 査読有 124: 2009, 55-67

[学会発表] (計 8 件)

1. 足立壮一; 血液腫瘍疾患における細胞死ーアポトーシスとオートファジー 特別講演 第 17 回 Nagoya アポトーシス研究会 2011 年 2 月 3 日 名古屋市

2. 足立壮一; 小児造血幹細胞移植におけるシクロスポリン 3 時間点滴静注法と C₃ モニタリングの有用性の検討 第 5 2 回日本小児血液学会総会 第 2 6 回日本小児がん学会学術集会 2010 年 11 月 19 日 大阪市

3. 足立壮一; 難治性血液疾患におけるアポトーシスとオートファジー 特別講演 第 9 回血液腫瘍フォーラム 2010 年 2 月 26 日 津市

4. 足立壮一; 小児 ALL、AML に対する初回移植成績の解析ー小児移植のドナーソース選択のトレンドは? Which Stem Cell Source is Best for Pediatric All and AML? Retrospective Analysis of Pediatric ALL and AML for 1st SCT. 第 32 回日本造血細胞移植学会総会 2010 年 2 月 20 日 浜松市

5. 足立壮一; 血液疾患におけるオートファジー: 第 7 1 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 24 日 京都市

6. 足立壮一; 思春期と悪性腫瘍 第 21 回北海道思春期研究会 特別講演 2009 年 7 月 18 日 札幌市

7. 足立壮一; 難治性白血病、癌治療におけるアポトーシスとオートファジー 第 82 回日本薬理学会年会シンポジウム 2009 年 3 月 16 日 横浜市

8. 足立壮一; AML における dysplasia の意義 第 7 回京滋血液腫瘍懇話会 2009 年 2 月 27 日

[図書] (計 1 件)

足立壮一 中外医学社 小児白血病の治療 血液診療エキスパート Vol 1. 白血病 2009 年 108-111 頁 総頁数 229 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hs.med.kyoto-u.ac.jp/ac/hieve-mtl.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

足立 壮一 (ADACHI SOUICHI)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10273450

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者:

渡邊 健一郎 (WATANABE KEN-ICHIROU)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20324634