

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 14301

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2009~2011

課題番号 : 21390293

研究課題名 (和文) 慢性骨髄性白血病幹細胞と T315I 変異クローンの根絶

研究課題名 (英文) Eradication of chronic myelogenous leukemia stem cells and abnormal clone with T315I point mutation

研究代表者 前川 平 (MAEKAWA TAIRA)  
京都大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 80229286

## 研究成果の概要 (和文) :

ABL 阻害剤イマチニブ (IM、グリベック®) は、慢性骨髄性白血病(CML)患者の予後を劇的に改善したが、IM の効果をさらに高めたダサチニブ (Dasatinib、スプリセル®) やニロチニブ (Nilotinib、タシグナ®)、さらにわれわれが開発した INNO-406(Befetinib)などの第 2 世代 ABL 阻害剤はいずれも ABL キナーゼドメインの 315 番目のスレオニンがイソロイシンに変異している T315I の遺伝子異常を持つ症例には無効である。また、CML 幹細胞は低酸素状況に適応して骨髄のニッチに潜み再発の原因となっていることが明らかにされた。これらの問題を解決できれば CML 治療成績のさらなる向上が期待される。われわれはこの T315I 変異症例にも有効なオーロラキナーゼ阻害剤 AT9283(1-cyclopropyl-3[5-morpholin-4yl methyl-1H-benzimidazol-2-yl]-urea)が、T315I 変異を有する CML 細胞の増殖を抑制すること、さらに低酸素環境における CML 細胞の特異的代謝経路を阻害するグリオキシラーゼ阻害剤 (glyoxalase-I inhibitor) が CML 幹細胞の増殖を抑制する可能性があることを示した。また、放線菌 *Micromonospora* から分離したラキシジン A(Rakicidin A)が低酸素環境下特異的に抗白血病活性を示すことを明らかにした。これらの分子によりあたらしい観点に基づいた白血病「幹」細胞を標的とした CML 治療法の開発が期待される。

## 研究成果の概要 (英文) :

Imatinib mesylate (IM, Gleevec®), which specifically inhibits the autophosphorylation of the Abl tyrosine kinase (TK), has dramatically improved the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). However, resistance is often reported in patients with advanced-stage disease. Several novel TK inhibitors (TKI) of second generation such as dasatinib (Sprycel®), nilotinib (Tasigna®), and INNO-406 (Bafetinib) have been developed that override IM resistance mechanisms caused by point mutations within the Abl kinase domain. Because of their strong affinities for the ATP-binding site compared to IM, these new TKIs may be effective in IM-resistant patients. However, they could not inhibit the phosphorylation of T315I Bcr-Abl harboring the mutation of threonine 315 to isoleucine. We describe the *in vitro* and *in vivo* effects of AT9283 (1-cyclopropyl-3[5-morpholin-4yl methyl-1H-benzimidazol-2-yl]-urea), a potent inhibitor of kinases Aurora A and Aurora B. AT9283 showed potent antiproliferative activity on cells transformed by BCR-ABL/T315I. CML stem cells also survived in the bone marrow niche under severe hypoxia condition. We generated two hypoxia-adapted (HA)-CML cell lines. These HA-CML cells exhibited stem cell-like characteristics. Compared with the respective parental cells, HA-CML cells had higher levels of protein and higher enzyme activity of glyoxalase-I (Glo-I), that detoxifies methylglyoxal, a cytotoxic by-product of glycolysis. In contrast to Abl TKIs, Glo-I inhibitors were much more effective in killing HA-CML cells both *in vitro* and *in vivo*. It is likely that leukemic cells are able to survive and proliferate in severely hypoxic environments. The hypoxic conditions allow leukemic cells that reside there to become insensitive to cell death stimuli. To target leukemic cells in hypoxic conditions, we focused on the hypoxia-selective cytotoxin, Rakicidin A, produced by the *Micromonospora* strain. We describe Rakicidin A-induced cell death in HA-CML cells with stem cell-like characteristics. Rakicidin A is a promising compound for targeting TKI-resistant quiescent CML stem cells in the hypoxic environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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、幹細胞、治療抵抗性、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

ABL 阻害剤イマチニブ (IM、グリベック®) は、慢性骨髄性白血病(CML)患者の予後を劇的に改善した。そして IM の効果をさらに高めたダサチニブ (Dasa、スプリセル®) やニロチニブ(Nilo, タシグナ®)などの第2世代 ABL 阻害剤が開発された。われわれも IM より約 55 倍 ABL 親和性が高く、しかも副作用の原因となる PDGFR および c-KIT に対する阻害作用の弱い INNO-406(Befetinib)の開発に成功した。欧米での INNO-406 の臨床第 I 相試験は終了し、安全に有効血中濃度が得られ、Dasa 耐性にも有効例を認めた。INNO-406 を含め新規 ABL 阻害剤は、CML 患者の予後をさらに改善すると期待されるが、CML 完治には、いまだ 2 つの問題が残されている。いずれの ABL 阻害剤も、①CML“幹”細胞には効果が乏しく、また②T315I 変異 (ABL キナーゼドメインの 315 番目のスレオニンがイソロイシンに変異) には無効である。CML 治療成績のさらなる向上のためには、この両者の問題を解決する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本申請課題の目的は、上記の 2 つの問題を解決し、CML の治療成績のさらなる向上が期待できる治療法を開発することである。

具体的には、T315I に有効な薬剤として Aurora キナーゼ阻害剤 MK-0457 の臨床試験が開始されたが、QTc 延長のため中断された。われわれは、QTc 延長作用が弱く、MK-0457 より ABL 親和性が 10 倍強い新規 Aurora キナーゼ阻害剤 AT9283 が T315I 変異を有する CML 細胞の増殖を効率的に抑制しうるかどうかが本研究で検討したい。また、われわれは CML 幹細胞攻撃のキーワードを「低酸素」

と考えている。骨髄はきわめて「低酸素」環境にある。すでに、われわれは NOD/SCID/ $\square c^{null}$  (NOG) マウスに移植されたヒト CML 細胞が、低酸素な骨端部から生着を開始、さらに生着した白血病細胞は、盛んな増殖のため極めて低酸素状態 (1.3%以下) にあることをピモニダゾール染色で確認した。この結果から、低酸素状態への適応が CML 細胞での幹細胞性の維持に重要であると考え、2 種類の低酸素適応 CML 株 (hypoxia-adapted; HA) を樹立した。HA 株は IM に強い抵抗性を示し、また NOG マウスへの生着率が高い。本研究では、これら HA-CML 細胞の性状を詳細に検討し、低酸素状態への適応が白血病幹細胞の幹細胞としての性質をどのようにして維持しているのか、また薬剤耐性にどのように作用するのか明らかにしたい。

以上のように、本研究は、HA-CML 細胞および T315I 変異に有効な分子を見出し、CML 幹細胞の根絶が可能であるか動物モデルにより検証することを目的とするものである。

3. 研究の方法

- 1) 低酸素適応 (HA) CML 細胞株の性状解析
  - i) 幹細胞性：HA-CML 細胞が CML 幹細胞としての性格を有するかを親株と比較検証する。
    - a)  $G_0$  期細胞数を pyronin Y と Ki-67 の二重染色で求める。
    - b) 各種 ABL 阻害剤や既存の抗がん剤に対する感受性を検討する。また幹細胞では発現が亢進し、多剤耐性に関与する P 糖蛋白の発現レベルを測定する。
    - c) HA-CML 細胞移植群が早期に死亡することは確認している (図 3)。さらに limiting dilution assay および競合的造血再構築能アッセイ (2 次、3

- 次移植も含む)を行なう。
- d) 正常造血幹細胞の生着に重要と報告されている接着因子 (LFA-1, N-Cadherin, Tie2, c-KIT, CD44, CXCR4, VLA4) (Wilson et al. *Nat Rev Immunol* 2006) について、HA-CML 細胞での発現レベルを検討する。
- e) HA-CML 細胞に、低酸素応答 Hif-1 プロモーターにルシフェラーゼを繋いだプラスミドを導入する (K562/HA/Hif-1<sup>Luc</sup>)。同遺伝子のトランスジェニックマウスより分離した正常造血幹細胞に *bcr-abl* を導入した細胞 (Tg-HSC/BCR-ABL/Hif-1<sup>Luc</sup>) を作成する。K562/HA/Hif-1<sup>Luc</sup>あるいは Tg-HSC/BCR-ABL/Hif-1<sup>Luc</sup> をマウスに移植し、生着過程を追跡する。
- ii) シグナル伝達: HA-CML 細胞では BCR-ABL のリン酸化が減少していた。どのシグナルが代替的に HA-CML 細胞の生存を規定しているのか、細胞の生存や増殖に関するシグナル伝達を検討する。
- iii) Glyoxalase-I (Glo-I): 低酸素状態では ATP 産生のために解糖系が働く。Glyoxalase-I (Glo-I) は、その際に生じる代謝産物メチルグリオキサールを解毒する酵素であり、低酸素適応との関係が報告されている。我々はすでに HA-CML 細胞では Glo-I の発現が亢進していることを確認している。さらに Glo-I の活性や、他のシグナル (BCR-ABL, HIF-1 など) との関係について明らかにする。
- iv) Glo-I 阻害作用を有する 3 種類の Glo-I 阻害剤 (BBGC, COTC, methylgerfelin) は、親株より HA-CML で高い感受性を有していた。これら Glo-I 阻害剤に曝露された際の HA-CML 細胞の細胞死誘導機序および各シグナル伝達の変化について調べる。
- 2) T315I 変異を有する CML 細胞および低酸素環境でも有効な薬剤の *in vitro* および *in vivo* での探索
- i) 新規 Aurora 阻害剤 AT9283 の効果
- a) T315I を含む変異 12 種類が導入された Ba/F3 細胞、および異なった原因で IM 耐性を示すヒト CML 細胞株 (KBM5/STIR; T315I, K562/D1-9; P 糖蛋白高発現、MYL-R1; Lyn 高発現、K562/BCL-2; BCL-2 高発現など) に対する AT9283 の *in vitro* での増殖抑制効果を検討する。
- b) AT9283 は、ABL, Aurora, JAK2 の 3 つを標的とするマルチ阻害剤であることが我々の研究で明らかとなった。 *In vitro* での細胞死誘導効果が、どの標的

の阻害の寄与が大きいのか、また 3 つの標的阻害が強制的に作用するのかについて検討する。

- ii) 低酸素環境特異的な代謝経路を標的にした分子の効果
- a) ヒト CML 幹細胞 (CML 患者より分離した CD34 陽性 CD38 陰性白血病細胞) を NOG マウスに移植して作成したモデルに対して、平成 21-22 年度で見出した Glo-I 阻害剤および低酸素環境でも作用しうる Rakicidin A により微小残存病変の根絶が可能か検討する。

#### 4. 研究成果

- 1) われわれはこの T315I 変異症例にも有効なオーロラキナーゼ阻害剤 AT9283(1-cyclopropyl-3[5-morpholin-4yl methyl-1H-benzimidazol-2-yl]-urea) が、T315I 変異を有する CML 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。
- 2) 低酸素環境における CML 細胞の特異的代謝経路を阻害するグリオキシラーゼ阻害剤 (glyoxalase-I inhibitor) が CML 幹細胞の増殖を抑制する可能性があることを示した。
- 3) 放線菌 *Micromonospora* から分離したラキシジン A(Rakicidin A)が低酸素環境下特異的に抗白血病活性を示すことを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yamamoto-Sugitani, M., Kuroda, J., Ashihara, E., Nagoshi, H., Kobayashi, T., Matsumoto, Y., Sasaki, N., Kiyota, M., Nakayama, R., Akaji, K., Taki, T., Uoshima, N., Kobayashi, Y., Horiike, S., Maekawa, T., Taniwaki, M.: Galectin-3 induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(42):17468-17473, 2011.
2. Kitawaki, T., Kadowaki, T., Fukunaga, K., Kasai, Y., Maekawa, T., Ohmori, K., Ito, T., Shimizu, A., Kuzushima, K., Kondo, T., Ishikawa, T., Uchiyama, T.: Cross-priming of CD8(+) T cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy

- for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 39(4):424-433.e2, 2011.
3. Takeuchi, M., Ashihara, E., Yamazaki, Y., Kimura, S., Nakagawa, Y., Tanaka, R., Yao, H., Nagao, R., Hayashi, Y., Hirai, H., Maekawa, T.: Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci*. 102(3):591-596, 2011.
  4. Kitawaki, T., Kadowaki, T., Fukunaga, K., Kasai, Y., Maekawa, T., Ohmori, K., Itoh, T., Tada, H., Teramukai, S., Shimizu, A., Fukushima, M., Kuzushima, K., Kondo, T., Ishikawa, T., Uchiyama, T.: A phase I/II study of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia using dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells. *Brit J Haematol*, 53(6):796-799, 2011.
  5. Tsuchi, T., Okabe, S., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Ohayashiki, K.: Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. *Oncogene*, 30(24):2789-2797, 2011.
  6. Yao, H., Ashihara, E., Maekawa, T.: Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin Ther Targets*, 15(7):873-887, 2011.
  7. Nagao, R., Ashihara, E., Kimura, S., Strovel, J.W., Yao, H., Takeuchi, M., Tanaka, R., Hayashi, Y., Hirai, H., Padia, J., Strand, K., Maekawa, T.: Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315 mutation and hypoxia-adaptation by AV65 – a novel Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitor. *Cancer Letter*, 312(1):91-100, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.002
  8. Tanaka, R., Kimura, S., Ashihara, E., Yoshimura, M., Takahashi, N., Wakita, H., Itoh, K., Nishiwaki, K., Suzuki, K., Nagao, R., Yao, H., Hayashi, Y., Satake, S., Hirai, H., Sawada, K-I., Ottmann, O.G., Melo, J.V., Maekawa, T.: Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. *Cancer Letter* 312(2):228-34, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.009
  9. Yao, H., Ashihara, E., Strovel, J.W., Nakagawa, Y., Kuroda, J., Nagao, R., Tanaka, R., Yokota, A., Takeuchi, M., Sakai, K., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Strand, K., Padia, J., Hirai, H., Kimura, S., Maekawa, T.: A novel Wnt/ $\beta$ -catenin signal inhibitor successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. *Blood Cancer J*, 1:e43, 2011.
  10. Yokota, A., Kimura, S., Tanaka, R., Takeuchi, M., Yao, H., Sakai, K., Nagao, R., Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Maekawa, T.: Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res*. 34; 793-799, 2010.
  11. Ashihara, E., Kawata, E., Maekawa, T.: Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets*. 11(3):345-360, 2010. Review
  12. Takeuchi, M., Kimura, S., Kuroda, J., Ashihara, E., Kawatani, M., Osada, H., Umezawa, K., Yasui, E., Imoto, M., Tsuruo, T., Yokota, A., Tanaka, T., Nagao, R., Nakahata, T., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like

characteristics in a hypoxic environment. Cell Death Diff, 7:1211-1220, 2010.

13. Tanaka R, Squires M.S., Kimura S, Yokota A, Mallet K, Smyth T, Thompson N.T., Nagao R, Yamauchi T, Ashihara E, Ottmann O.G., Lyons J.F., Maekawa T: Activity of the multi-targeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL positive leukemic cells. Blood, 116(12):2089-2095, 2010.
14. Takeuchi M, Kimura S, Ashihara E, Maekawa T, Castaner R, Bolos J.: Befetinib. Dual BCR-ABL/LYN tyrosine kinase inhibitor, INNO-406. Drug Fut. 34(4):261-269, 2009.

[学会発表] (計 11 件)  
(国際学会)

1. Hayashi Y, Hirai H, Yao H, Yoshioka S, Satake S, Kamio N, Miura Y, Ashihara E, Fujiyama Y, Tenen DG, Maekawa T: BCR/ABL-mediated myeloid expansion is promoted by C/EBP $\beta$ , a regulator of emergency granulopoiesis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, USA, December 11-13, 2011
2. Tanaka R, Kimura S, Hosomi T, Hirai M, Nagao R, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T: A Novel Automated Assay for the Detection of BCR-ABL Kinase Domain Mutations. 15th Congress of the European Hematology Association (EHA) (Fira Barcelona Gran Via, Barcelona, Spain) (June 12, 2010)
3. Maekawa T: Development of new agents in the treatment of imatinib-resistant Ph+ leukemias. The 30th International Symposium by Princess Takamatsu Foundation for

Cancer Research.(Kyoto, Japan) (December 23, 2010)

4. Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino S, Kimura N, Satake S, Ashihara E, Maekawa T, Tenen DG, Imanishi J: CREB Is Involved in the Regulation of C/EBP $\beta$ ; During 'emergency' Granulopoiesis. The American Society of Hematology 51st Annual Meeting and Exposition (New Orleans, USA) (December 5, 2009)
5. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Yokota A, Tanaka R, Nagao R, Nakahata T, Fujiyama Y, Maekawa T: Hypoxia-Adapted CML cells are more primitive population and are Eradication by Glyoxalase-1 Inhibitors. The American Society of Hematology 51st Annual Meeting and Exposition (ASH) (Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA) (December 6, 2009)
6. Tanaka R, Kimura S, Hosomi T, Hirai M, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Adachi S, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T Automated and Rapid Detection of BCR-ABL Kinase Domain Mutations in IM Resistant Patients with Ph+ Leukemias. The American Society of Hematology 51st Annual Meeting and Exposition (ASH) (Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA) (December 6, 2009)
7. Tanaka R, Kimura S, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T: Overcoming CML with T315I Mutation ~ Detection and Therapeutics ~. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine"

2009. (Hyogo, Japan) (November 7, 2009)

(国内学会)

8. 平位秀世、林 嘉宏、前川 平：転写因子C/EBPβの慢性骨髄性白血病の病態形成への関与。厚生労働科学研究費補助金・がん臨床研究事業『成人難治性白血病におけるバイオマーカーに基づく層別化治療法の確立』班（直江班）国立がん研究センター・がん研究開発費『難治性白血病に対する標準的治療法の確立』班（小林班）平成23年度第2回合同班会議（名古屋大学）（名古屋）、国立がん研究センター・がん研究開発費「難治性白血病に対する標準的治療法の確立」班（小林班）、平成23年12月17日（2011）
9. 前川 平：アカデミアの立場から一創薬開発を経験して－。ワークショップ1「TRにおける産学連携の模索」、第7回トランスレーショナルリサーチワークショップ(TRワークショップ2011)「がん分子標的創薬とTR－産学の連携」（東京）平成23年1月28日(2011)
10. 木村晋也、前川 平：T315I遺伝子変異を持つCMLに対するオーロラキナーゼ阻害剤、AT9283の開発について。平成22年度第1回合同班会議（名古屋）厚生労働省がん研究開発費「成人白血病の難治機構の分子レベルでの解明とそれに基づく分子標的治療の開発に関する研究」班（直江班）平成22年6月19日（2010）
11. 前川 平：低酸素環境とCML幹細胞。平成21年度第1回合同班会議（名古屋）厚生労働省がん研究助成金『成人白血病の難治機構の分子レベルでの解明とそれに基づく分子標的治療の開発に関する研究』班（直江班）平成21年6月20日（2009）

〔産業財産権〕  
○出願状況（計1件）

名称：細胞培養容器及びその容器を用いた細胞培養方法  
発明者：務中達也（島津製作所）、阿部浩久（島津製作所）、叶井正樹（島津製作所）、明地将一（島津製作所）、前川 平、木村晋也（佐賀大学）、芦原英司（京都府立医科大学）、庄子習一（早稲田大学）、川合健太郎（早稲田大学）  
権利者：同上  
種類：特願  
番号：2010-200679  
出願年月日：2010年9月8日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
特記することなし

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
前川 平 (MAEKAWA TAIRA)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80229286
- (2) 研究分担者  
芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：70275197  
(平成21年度 京都大学)  
(平成22年度～平成23年度：  
京都府立医科大学)
  
- 木村 晋也 (KIMURA SHINYA)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：80359794  
(平成21年度～平成22年度  
佐賀大学)
  
- 平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：50315933  
(平成22年度～平成23年度)
  
- 三浦 康生 (MIURA YASUO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70605146  
(平成23年度)