

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21591356

研究課題名（和文）難治性小児白血病に対する移植片対白血病効果における細胞傷害因子の臨床意義の解明

研究課題名（英文）Clinical significance of cytotoxic factor-mediated graft-versus-leukemia effect against high-risk childhood leukemia

研究代表者

犬飼 岳史（INUKAI TAKESHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：30293450

研究成果の概要（和文）：

難治性の小児急性リンパ性白血病においては、同種造血幹細胞移植による移植片対白血病（GVL）効果が残存白血病を駆逐する可能性が知られている。GVL 効果の機序として、細胞傷害性 T リンパ球や NK 細胞上に発現されている細胞傷害因子である TRAIL が、白血病細胞上に発現されている death 受容体を介して白血病細胞に細胞死を誘導することが、その 1 つにあげられる。本研究では、17;19 転座や Philadelphia 染色体陽性の白血病において、転座に由来する融合遺伝子が白血病細胞の death 受容体の発現を増強して TRAIL 感受性に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Graft-versus-leukemia (GVL) effect after allogeneic stem cell transplantation can potentially eradicate residual disease in high risk childhood acute lymphoblastic leukemia patients. TRAIL, which is one of cytotoxic factors expressed on cytotoxic T-cells and natural killer cells, is known to play a role in the GVL effect by inducing apoptotic cell death of leukemia cells through death receptors expression on leukemia cells. In the present study, we demonstrated that oncogenic fusion products derived from chromosomal translocations sensitized leukemia cells to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating death receptor expression in t(17;19) and Philadelphia chromosome-positive leukemia.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 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：白血病、造血幹細胞移植、移植片対白血病効果、TRAIL

1. 研究開始当初の背景

（1）白血病に対する同種造血幹細胞移植の成否のカギを握る移植片対白血病（GVL）効果

難治性の小児白血病症例に対しては同種造血幹細胞移植 (allo-SCT) を行なうことで治療成績が改善してきている。白血病に対す

る allo-SCT の臨床効果は、移植前処置の抗白血病効果のみならず、ドナー由来の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) や NK 細胞が残存する白血病細胞を免疫学的に攻撃して根絶する移植片対白血病 (GVL) 効果が大きく寄与していることが明らかになってきている。一方、CTL や NK 細胞が正常の上皮系組織を攻撃した場合は移植片対宿主病 (GVHD) を発症するが、GVL 効果はしばしば GVHD を伴い時に致死的である。従って、GVHD を回避しつつ十分な GVL 効果を誘導することが治療成績の向上には重要であるが、臨床的に GVL 効果のみを安全に誘導することは現状では困難である。

(2) GVL 効果に中心的な役割を果たす細胞傷害因子 TRAIL

われわれはこれまで、CTL および NK 細胞上に発現される細胞傷害因子に注目して、ヒトの白血病細胞株の解析を中心に GVL 効果の分子学的解明に取り組んでおり、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) が GVL 効果において重要な役割を果たす可能性を支持する知見を得ている。これは、マウスの移植モデル実験において、FasL が主に GVHD に関与する一方で、perforin と TRAIL が主に移植片対腫瘍 (GVT)・GVL 効果に関与する可能性が示唆されていることに一致するものである。

(3) 白血病細胞における TRAIL 受容体の発現機構の解明は重要な課題

TRAIL の臨床的に際立った特徴として、高い抗腫瘍効果を示す一方で正常細胞への傷害性が極めて弱いことが挙げられる。CTL および NK 細胞上の TRAIL は、標的細胞となる白血病細胞上に発現される death 受容体を介して細胞死を誘導することで GVL 効果を仲介していることから、death 受容体の発現制御機構の解明が極めて重要であるが、白血病における TRAIL 受容体発現の機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 白血病細胞の TRAIL 感受性と同種造血幹細胞移植の成否との関係

TRAIL 感受性が GVL 効果の有無に関係している可能性を直接的に明らかにするために、再発した急性リンパ性白血病 (ALL) 症例に対する全国共通プロトコール (JPLSG R-06 研究) において、臨床検体を用いた前向き研究を行う。

(2) 転座由来の融合遺伝子産物による TRAIL 受容体の制御機構の解明

極めて難治性の 17;19 転座型 ALL や Philadelphia 染色体陽性 (Ph+) ALL において、白血病細胞が TRAIL に対する death 受容体を

発現して TRAIL に高い感受性を示すことを確認している。したがって、17;19 転座に由来する E2A-HLF や Ph 染色体に由来する BCR-ABL が、death 受容体の発現を誘導する可能性とその分子学的機序の解明を目指す。

(3) TRAIL 耐性機構の解明と耐性の克服

TRAIL 耐性の機序の 1 つとして、一部の癌腫では、death 受容体遺伝子の発現調節領域であるプロモーターのメチル化状態の関与が報告されていることから、その ALL における TRAIL 耐性機序への関与を明らかにする。また、脱メチル化剤を用いることで death 受容体の発現が誘導されて TRAIL 耐性が克服される可能性についても検討する。さらに、小胞体ストレス (ER stress) を誘導することで、death 受容体の発現が誘導されて、TRAIL 耐性が克服される可能性も報告されている。特に、imatinib が、心筋細胞に ER stress を誘導している可能性が報告されており (文献)、imatinib の Ph+白血病細胞に対する臨床効果に、ER stress を介する death 受容体の誘導が関与している可能性について検討する。

(4) 白血病幹細胞の TRAIL 感受性の解析

近年、白血病にも幹細胞が存在し、その排除が治癒に必須であることが明らかになってきた。白血病幹細胞は通常休止期にあって化学療法には耐性を示すが、TRAIL の効果は細胞周期に依存しないと考えられ白血病幹細胞の排除にも有効であると想定されるが、モデル実験系を用いてこの点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TRAIL 受容体解析

death 受容体の DR4 と DR5 および decoy 受容体の DcR1 と DCR2 のそれぞれに対するビオチン化モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーで解析した。

(2) TRAIL 感受性

遺伝子組み換え型ヒト可溶性 TRAIL を用いて、細胞死の誘導は ³H-thymidine uptake およびフローサイトメトリーによる PI/Annexin V 結合で評価した。

4. 研究成果

(1) 再発 ALL 症例における TRAIL 受容体発現の解析

新規登録症例において受容体の発現解析が継続的に行なわれており、新規登録の打ち切り後に最初の集計を行なう予定である。

(2) ER stress の Ph+白血病受容体発現に対する影響の解析

Tunicamycin や thapsigargin などの ER stress 誘導剤は、Ph+白血病細胞の death 受容体発現を誘導して、TRAIL 感受性を増強した。しかし、Imatinib は Ph+白血病細胞には ER stress 誘導効果は示さずに、むしろ BCR-ABL の抑制作用を通じて death 受容体発現を抑制して TRAIL 感受性を低下させた。この研究成果は Leuk Res 誌に報告した。

(3) Ph+白血病における TRAIL 受容体発現機構の解明

前述の解析で、Ph+ALL では BCR-ABL 自体が death 受容体発現に直接に関与している可能性が示唆された。さらに、siRNA によって bcr-abl 発現を抑制した場合にも death 受容体の発現が低下する一方で、Ph 陰性 ALL 細胞に bcr-abl を遺伝子導入すると death 受容体の発現が誘導されることから、BCR-ABL の death 受容体発現への関与が明確になった。この研究成果は Oncogene 誌に報告した。

(4) 17;19 転座型 ALL における TRAIL 受容体発現機構の解明

17;19 転座型 ALL では、death 受容体が陽性で、TRAIL 感受性が極めて高いことを確認した。また、転座産物である E2A-HLF を遺伝子導入すると death 受容体の発現が誘導されることから、17;19 転座型 ALL の death 受容体に E2A-HLF が直接に関与していることを明らかにした。これらの解析結果から、17;19 転座型 ALL では TRAIL を介した GVL 効果が発揮されやすい可能性が示唆される。17;19 転座型 ALL 症例は、化学療法で治療された全例が1年半以内に再発して死亡していることから、新規の17;19 転座型 ALL 症例において第一寛解期早期から積極的に同種造血幹細胞移植を行なったところ、長期の無病生存が得られた。この研究成果は Leukemia 誌に報告した。

(5) T-ALL における TRAIL 耐性機序の解析

T-ALL 細胞では、death 受容体の細胞表面発現が陰性で TRAIL 耐性を示し、遺伝子レベルでも death 受容体の発現が弱いことを確認した。また、death 受容体遺伝子発現が低い細胞では、death 受容体遺伝子のプロモーターがメチル化によって不活性化されていることを確認した。そこで脱メチル化処理による発現誘導の可能性を検討したが、細胞表面レベルでは明確な発現の誘導は認められなかった。その理由としては、プロモーターの転写活性が低いことが示唆された。この研究成果は Exp Hematol 誌に報告した。

(6) 白血病幹細胞における TRAIL 受容体発現の解析

ALL 細胞株の一部で、CD9 強陽性分画に白

血病幹細胞としての能力があることを見出し、CD9 発現レベルによる death 受容体発現の解析への影響を検討している。これまでの解析では、CD9 発現と death 受容体発現の間には関連性は認めていない。

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 Zhang X, Inukai T(2), Hirose K(3), Akahane K(4), Kuroda I(5), et al (18). Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. Leukemia in press. 査読有り
- ② Kuroda I(1), Inukai T(2), Akahane K(7), Hirose K(8), et al (16). BCR-ABL regulates death receptor expression for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Philadelphia chromosome-positive leukemia. Oncogene in press. 査読有り
- ③ Zhang X, Inukai T(2), Akahane K(3), Hirose K(4), Kuroda I(5), et al (11). Endoplasmic reticulum stress inducers, but not imatinib, sensitize Philadelphia chromosome-positive leukemia cells to TRAIL-mediated apoptosis. Leuk Res. 2011;35:940-9. 査読有り
- ④ Akahane K(1), Inukai T(2), Hirose K(4), Kuroda I(5), et al (14). Resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor--related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis. Exp Hematol. 2010;38:885-95. 査読有り
- ⑤ 犬飼岳史. 小児難治性白血病の細胞傷害因子 TRAIL に対する感受性の意義(総説). 日本小児血液学会雑誌 2009;23:332-344. 査読なし

[学会発表] (計4件)

- ① Kuroda I, Inukai T, Akahane K, Hirose K, et al. BCR-ABL regulates death receptor expression for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Philadelphia chromosome-positive leukemia. 53th American Society of Hematology Annual Meeting. 2011年12月11日 San Diego.
- ② 張曉春, 犬飼岳史, 黒田格, 赤羽弘資, 廣瀬衣子, ほか. Philadelphia 染色体陽性白血病細胞における Imatinib による小胞体ストレス誘導作用と TRAIL 感受性の検討. 第51回日本小児血液学会総会. 2009年11

月 28 日 幕張

③ 赤羽弘資, 犬飼岳史, 廣瀬衣子, 黒田格, ほか. T 細胞型急性リンパ性白血病の TRAIL 耐性への TRAIL 受容体 DR4/DR5 遺伝子のメチル化とプロモーター活性の関与. 第 71 回日本血液学会総会. 2009 年 10 月 23 日 京都

④ 黒田格, 犬飼岳史, 張曉春, 廣瀬衣子, 赤羽弘資, ほか. BCR-ABL は Ph1 陽性白血病細胞の TRAIL に対する death 受容体の発現に関与する. 第 71 回日本血液学会総会. 2009 年 10 月 23 日 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/fpe/fpe110804.html>

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/fpe/fpe101110a.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 岳史 (INUKAI TAKESHI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
准教授
研究者番号：30293450

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

赤羽 弘資 (AKAHANE KOSHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90377531

廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：70436880

黒田 格 (KURODA ITARU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：30402051