

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390192

研究課題名（和文）

分子標的治療における残存・耐性化機序の解明と克服に向けた基礎研究

研究課題名（英文）

Basic research aimed at understanding and overcoming of the primary and secondary resistance in molecular target therapy

研究代表者

直江 知樹 (NAOE TOMOKI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50217634

研究成果の概要（和文）：

イマチニブなどシグナル伝達阻害薬あるいはリツキシマブなど抗体薬によって、造血器腫瘍の治療成績は大きく向上したが、治療後の残存や耐性化が今日的な問題となっている。

本研究では、①慢性骨髄性白血病 CML における ABL 阻害剤、②B 細胞悪性リンパ腫におけるリツキシマブ療法、③急性前骨髄球性白血病 APL における亜ヒ酸療法における残存・耐性について、その機序の解明と克服について研究した。

研究成果の概要（英文）：

Although the outcome of patients with hematopoietic malignancies is significantly improved by using molecular target therapies, residual tumors and/or acquired resistance have become contemporary issues in the clinical field.

In this study, we elucidated the mechanisms of resistance after imatinib (IM), rituximab, and arsenic trioxide treatments, in chronic myeloid leukemia (CML), B-cell malignant lymphoma, and acute promyelocytic leukemia (APL), respectively, and searched for new therapies to overcome the resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：分子標的治療、残存、耐性、がん薬物治療、キナーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

CML に対するイマチニブの成功によって、分子標的治療は新たな地平を切り開いた。

しかしイマチニブ中断では早期の再発が認められることや BCR-ABL コピー数減少の数学モデルから、白血病幹細胞の残存が示唆されている。

申請者らは CML 幹細胞プールは縮小するが長期間残存すること、急転期では GMP 分画が増

大することを見いだしていた。しかし残存白血病をターゲットする手段が明らかではなかった。

その理由はヒト白血病幹細胞のモデル系がなく、薬剤スクリーニングができなかったからである。

また CML の急転期に対する治療についても、その耐性メカニズムとして ABL キナーゼ変異以外の機序については多くは不明であった。

一方、B細胞悪性リンパ腫に対するリツキシマブ抗体療法は、化学療法との併用で大きな成功を収めている。

しかし、リツキシマブ治療後再発リンパ腫ではその有効性は乏しい。我々はその原因として標的抗原の発現消失・減弱が多くの症例で見出されることを報告し、一部ではCD20遺伝子発現調節におけるHDAC複合体が転写抑制に関与することを報告した。しかしこの他、分子変異、蛋白修飾、膜での発現様式など多くの機序が示唆されている。

これら分子標的における残存・耐性機序には、標的分子の発現・変異という標的療法に特有のメカニズムの他、薬物動態・生存シグナルの亢進・腫瘍幹細胞・ニッチからのシグナルなど、従来の抗がん剤耐性とも共通するメカニズムが複雑に絡み合っている。

臨床における腫瘍細胞の生存・維持・分化はすべて、間質やニッチなど環境に依存的であり、しかも階層的であることが知られている。これらを踏まえ、新規標的薬を探索する重要性と共に、併用療法の開発や臨床検体を用いたvivoモデル系での評価系の確立が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、分子標的療法における残存・耐性化機構を理解し、それを克服するため、系統的かつ複眼的な研究を推進する。

具体的には、(1)キナーゼ阻害剤治療後の白血病残存・耐性化と、(2)抗体療法による耐性化について解析を進める。

また(3)急性前骨髄球性白血病APLにおける新たな亜ヒ酸耐性についても研究を進める。これらには、標的分子の発現・変異という共通するメカニズムの他、従来の抗がん剤耐性とも共通するメカニズムが絡み合うので、相乗的な研究促進を図る。

3. 研究の方法

(1) Ph 陽性白血病の BCR-ABL キナーゼ阻害剤イマチニブ (IM) に対する耐性克服検討の為、Ph 陽性 ALL プライマリー細胞を免疫不全 NOG マウスに移植継代する系、ストローマ S-17 共培養系を用いた。

標準阻害剤キット (化学療法基盤支援班より供与) を用いた網羅的なスクリーニングを行い、関連シグナルの同定を行なうとともに、mTOR 阻害剤エベロリムスと、PI3K/mTOR 阻害剤 BEZ235 による治療効果とバイオマーカーの検討を行なった。

また、ヘッジホッグシグナル伝達経路は、造血細胞の増殖と分化の重要な調節因子である。ヘッジホッグ経路はほとんどの正常成人組織において不活性であるのに対し、ヘッジホッグ経路の再活性化は、BCR-ABL1 陽性白血病を含むいくつかの腫瘍の病因に関与し

ている。

ヘッジホッグ経路および BCR-ABL1 陽性白血病の間に明確なリンクが経路をブロックする小分子を同定した。

(2) 慢性骨髄性白血病 (CML) は、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) による分子標的療法の成功が実現された最初の疾患である。

しかし、進行性 CML は一次的あるいは獲得性 TKI 耐性を示す。抵抗を克服する基礎となるメカニズムを解明することは、臨床転帰のさらなる向上のために不可欠である。

今回、TEL/MDS1/EVI1 融合遺伝子を有し、イマチニブ耐性を示した慢性骨髄性白血病患者より樹立した細胞株 NCMT-1 を用いて、イマチニブ耐性化機序の解明と耐性の克服について検討した。

特に EVI1 が PTEN 発現を抑制し、PI3K-AKT-BAD の経路を活性化することに着目し、それぞれの分子発現を siRNA で抑制し、リン酸化分子を免疫同定し、その分子や経路の重要性を実証した。

(3) リツキシマブ治療後再発時に樹立した CD20 低発現 B 細胞リンパ腫株 RRBL1 を樹立し、その低発現メカニズムについて、CD20 プロモーターメチル化や発現アレイなどを用いてその機序を検索した。

また CD20 の蛋白修飾や細胞膜への発現様式の リツキシマブ感受性に与える影響について検討した。

(4) 細胞株の検討では亜ヒ酸耐性 APL では細胞内の還元型グルタチオンが関与するとされるが、臨床でのメカニズムは不明である。名大で亜ヒ酸治療を受けた 15 例中 2 例に亜ヒ酸不応性があったことに注目し、その PML-RARA の構造変化を検索した。

また変異 PML-RARA の意義を探るため、発現実験も行った。

4. 研究成果

(1) S-17 共培養下 Ph 陽性白血病に対する IM 処理では、静止期 CD34 陽性分画は BCR-ABL および CrkL の脱リン酸化にも関わらず不応性で、標準阻害剤キットのスクリーニングでは、PI3K/AKT/mTOR シグナル経路に対する阻害剤が複数ヒットした。

IM とエベロリムス併用で静止期分画を含む細胞死が誘導され、マウス投与系での有効性も示された。エベロリムス投与により、AKT や FOXO リン酸化増強といった negative feedback-loop 効果が認められたが、BEZ235 低濃度での投与によって細胞死が誘導された。

免疫不全マウスで T315I BCR-ABL1 陽性細胞の再増殖にヘッジホッグ阻害剤 vismodegib と汎 ABL1 キナーゼ阻害剤 ponatinib の併用効果を検討し、末梢血中のヒト CD19 陽性白血病細胞の割合は

vismodegib プラス ponatinib でそれぞれ単独よりも有意に低かった (P < 0.001)。

脾臓重量は vismodegib+ ponatinib 処置マウスで ponatinib 単独に比べ縮小していた (P < 0.05)。骨髓細胞からの BCR-ABL mRNA を定量したところ、vismodegib + ponatinib で有意に低かった (P < 0.005)。

また vismodegib が大幅に in vivo での連続移植時ならびに in vitro で BCR-ABL1 陽性白血病細胞の自己複製を減少させることを見出した。

(2) 耐性のある細胞株で検出された染色体転座 t(3;12)(q26;p13) は TEL/MDS1/EVI1 融合タンパク質の発現をもたらした。TKI に対する耐性は BH3-mimetic、ABT-737 の同時投与によって克服された。

また、EVI1 特異 RNA 干渉によって、TEL/MDS1/EVI1 融合の発現を減少させると、TKI 抵抗性が減弱すると共に、ABT-737 に対する感受性が増加した。

また、BH3-only protein BAD が、PI3/AKT 依存的な経路を介して不活化されることも見いだした。

これらの知見は、EVI1 タンパク質によって TKI 耐性の新規経路を示し、AKT 阻害薬とイマチニブを併用における理論的な根拠が示された。

(3) CD20 プロモーターのメチル化は直接 CD20 低発現には関わっていないかった。

CD20 の蛋白修飾やラフトへの集簇がリツキシマブ感受性とも関わっていた。

(4) 亜ヒ酸不応 APL 患者において PML-RARA キメラ転写因子の PML 部分 B2 ドメインに点変異を見いだした。

元々の PML-RARA は細胞質・核に Microgranular に存在し亜ヒ酸治療によって SUMO 化および可溶性画分への移動、分解を受けるが、この変異 PML-RARA はこのような修飾や SUMO 化などには非感受性であった。

これらのことから、亜ヒ酸治療は PML-RARA を標的とした治療法であり、PML-B2 ドメインをターゲットすることが示唆された。

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 10 件)

1. Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, Naoe T. CML cells expressing the TEL/MDS1/EVI1 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737. *Exp Hematol*. 査読有 2012;40:724-737.
2. Iriyama C, Tomita A, Hoshino H,

Adachi-Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Kiyoi H, Naoe T. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2012;419:662-669.

3. Kajiguchi T, Katsumi A, Tanizaki R, Kiyoi H, Naoe T. Y654 of β -catenin is essential for FLT3/ITD-related tyrosine phosphorylation and nuclear localization of β -catenin. *Eur J Haematol*. 査読有 2012;88:314-320.
4. Minami Y, Abe A, Minami M, Kitamura K, Hiraga J, Mizuno S, Yamamoto K, Sawa M, Inagaki Y, Miyamura K, Naoe T. Retention of CD34(+) CML stem/progenitor cells during imatinib treatment and rapid decline after treatment with second-generation BCR-ABL inhibitors. *Leukemia*. 査読有 2012 ;26:2142-2143.
5. Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B Cell Receptor-ERK1/2 Signal Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1 through PAX5 Phosphorylation: A Mechanism of Antigen-Triggering Plasma Cell Differentiation. *J Immunol*. 査読有 2012;188:6127-6134.
6. Kuwatsuka Y, Minami M, Minami Y, Sugimoto K, Hayakawa F, Miyata Y, Abe A, Goff DJ, Kiyoi H, Naoe T. The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Cancer J*. 査読有 2011 May;1(5):e17.
7. Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood*. 査読有 2011 ;118:1600-1609.
8. Ono T, Miyawaki S, Kimura F, Kanamori H, Ohtake S, Kitamura K, Fujita H, Sugiura I, Usuki K, Emi N, Tamaki S, Aoyama Y, Kaya H, Naoe T, Tadokoro K, Yamaguchi T, Ohno R, Ohnishi K; Japan Adult Leukemia Study Group. BCR-ABL1 mutations in patients with imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia by use of the PCR-Invader

- assay. **Leuk Res.** 査読有 2011;35:598-603.
9. Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T. PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. **Oncogene.** 査読有 2011;30:1822-1830.
 10. Ishikawa Y, Kiyoi H, Watanabe K, Miyamura K, Nakano Y, Kitamura K, Kohno A, Sugiura I, Yokozawa T, Hanamura A, Yamamoto K, Iida H, Emi N, Suzuki R, Ohnishi K, Naoe T. Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a report from the BINGO study. **Cancer Sci.** 査読有 2010 ;101:2186-2192.
- [学会発表] (計 10 件)
1. Iriyama C, Tomita A, Naoe T, et al. Usefulness of Peripheral Blood Circulating DNAs As an Alternative to DNA From Bone Marrow Cells to Detect CpG Global Methylation Status and Genetic Mutations in Patients with Myelodysplastic Syndromes. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.10. Atlanta USA.
 2. Tomita A, Naoe T, et al. Rituximab Sensitivity to De Novo DLBCL Cells Showing the Specific Phenotype of CD20 Protein Immunohistochemistry-Positive / Flow Cytometry-Negative: Analyses of Its Clinical Significances and the Molecular Mechanisms. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.9. Atlanta USA.
 3. Sakura T, Naoe T, et al. Outcome of Pediatric-Type Therapy for Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Adolescents and Young Adults (AYA): A Study by the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG ALL202-U study). The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.8. Atlanta USA.
 4. Taki T, Kiyoi H, Naoe T, et al. Incidence and Clinical Features of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Collaborative Study of the Japan Adult Leukemia Study Group and the Korean Society of Hematology The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.8 Atlanta USA.
 5. Minami Y, Naoe T, et al. Wnt signaling is associated with anti-apoptosis in the interaction between acute myeloid leukemia cells and stromal cells. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.8. Atlanta USA.
 6. 島田和之, 直江知樹, 他. EVI1 elicits resistance to apoptosis which can be overcome through application of AKTi or ABT-737. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10.20. 国立京都国際会館 (京都市)
 7. Nishida T, Naoe T, et al. Correlation of serum IL-6 with exhaustion of CMV-specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. 平成 24 年日本血液学会. 2012.10.19. 国立京都国際会議場 (京都市)
 8. Murata M, Naoe T, et al. Leukaemia escape from HLA-specific T-lymphocyte pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched BMT. The 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2012.4.1. Geneva, Switzerland.
 9. Katsumi A, Naoe T, et al. RhoH Downregulates Rac Through RhoGAP Family Protein. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.12. San Diego USA.
 10. Minami Y, Naoe T, et al. Retention of Slow-Cycling CD34+ cells During Imatinib Treatment and Rapid Decline After 2nd ABL-TKI Treatment in Ph+ Leukemia Cells. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.12. San Diego USA.
 11. Hayakawa F, Naoe T, et al. A Novel STAT3 Inhibitor OPB-31121 Induces Tumor-Specific Growth Inhibition in a Wide Range of Hematopoietic Malignancies without Growth Suppression of Normal Hematopoietic Cells. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.12. San Diego USA.
 12. Tokunaga T, Naoe T, et al. CD20 Protein Immunohistochemistry-Positive/Flow Cytometry-Negative Diffuse Large B-Cell Lymphoma—Analyses of the

Molecular Mechanisms and Rituximab Effectiveness. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.11. San Diego USA.

13. Miho M, Naoe T, et al. Biomarkers In Cell Death of Imatinib-Resistant Ph-Leukemia Cells During Treatment with mTOR Inhibitor, Everolimus. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2010.12.6. Orlando USA.

〔図書〕(計1件)

1. 直江知樹 他 金原出版 造血器腫瘍取り扱い規約、2010、265

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：RNA内包キャリア組成物

発明者：国立大学法人岐阜大学、北海道システム・サイエンス株式会社、国立大学法人名古屋大学

権利者：同上

種類：特許

番号：特許出願 2011-537248

出願年月日：2010/10/19

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

直江 知樹 (Naoe Tomoki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50217634

(2) 研究分担者

富田 章裕 (Tomita Akihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378215

南 陽介 (Minami Yousuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・COE 特任講師

研究者番号：60513752