

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 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790911

研究課題名（和文）

CBF 白血病における KIT 遺伝子変異付加による予後増悪分子機構の解析

研究課題名（英文）

The molecular mechanism of prognostic exacerbation by the addition of KIT mutations in CBF leukemia

研究代表者

福島 健太郎（FUKUSHIMA KENTARO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70546879

研究成果の概要（和文）：

本来予後良好である CBF 白血病において、KIT 変異が加わることにより予後不良となる事が知られているが、本研究は、その予後増悪の分子機構を明らかにする事を目的とするものである。申請者は、レトロウイルスを用いて CBF 融合遺伝子と KIT 活性化変異遺伝子を同時にマウス造血幹前駆細胞に導入し、KIT 変異が薬剤耐性遺伝子の誘導と遺伝子修復関連遺伝子の発現阻害を介して CBF 白血病の予後増悪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）：

Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia (AML) has a relatively favorable prognosis. However, activating KIT mutations are reported to be associated with higher risk of relapse and shorter survival. This project aims to clarify the molecular mechanism of such unfavorable effects by KIT mutations. The applicant explained that KIT mutations give poor prognosis to CBF leukemia through the induction of drug resistance genes and the reduction of DNA repair-related genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：CBF 白血病、KIT 遺伝子変異、薬剤耐性遺伝子、DNA 修復遺伝子

1. 研究開始当初の背景

白血病のみならず「がん」は、多段階の変異が蓄積することにより発症することが知られている。このような中で急性骨髄性白血病 (AML) 発症に関わる遺伝子異常は、主に造血細胞の増殖を促進する変異と、分化障害をもたらす変異の 2 種類に大別され、前者がクラ

ス I、後者がクラス II に分類されている。クラス I は、Flt3 や KIT などの白血病関連チロシンキナーゼ (LTK) や Ras などのシグナル伝達分子の異常であり、クラス II は AML1-MTG8、CBFβ-MYH11、MLL など主に転写制御分子の異常が含まれる。

申請者らのグループは、従来よりクラス I

に含まれるチロシンキナーゼ KIT や Flt3 変異の恒常的活性化機構、細胞生物学的特性を解析するとともにその下流の Ras/MAPK、STATs、PI3-K/Akt、NF- κ B の役割を明らかにしてきた (Mol. Cell 9:1017, 2002, Blood 99:3342, 2002, Blood 101:3668, 2003, Blood 101:3164, 2003, Blood 101:1094, 2003, J Biol Chem. 279:55578, 2004, Oncogene. 24(55):8144, 2005)。最近、申請者らは、慢性好酸球系白血病の原因遺伝子である恒常的活性化型チロシンキナーゼ FIP1L1-PDGFR \cdot が、未分化造血細胞の増殖因子非依存性の増殖を可能とし、白血病クローンの過剰増殖に関わること、FIP1L1-PDGFR \cdot が、マウス骨髄造血幹細胞や骨髄球系前駆細胞の好酸球系への分化を増強するのみならず、すでに他系統に分化したリンパ系共通前駆細胞をも好酸球系細胞に系統転換すること、さらにその分化誘導においては Ras/MEK/ERK1/2 および p38MAPK の活性化とそれに伴う系統特異的転写因子の発現と活性の制御が重要であることを明らかにした (J Biol Chem. 284:7719, 2009)。これらの結果から、クラス I に属するチロシンキナーゼ分子は下流の分子の活性化を通じ、細胞増殖を促進するだけでなく、白血病の様々な病態に関与していると考えられた。

KIT は造血幹細胞や肥満細胞にとっての主要な増殖・生存因子である造血幹細胞因子 (stem cell factor, SCF) の受容体である。KIT の活性化変異は、全身性肥満細胞症 (Systemic Mastocytosis, SM) の約 90%程度に認められ、SM の発症原因と考えられている。実際、申請者は、マウス正常造血細胞及び造血前駆細胞に活性化型 KITV814 を導入することにより、肥満細胞の前駆細胞である KIT 陽性、高親和性 Fc \cdot 受容体 I (Fc \cdot RI) 陽性、Mac1 陰性細胞への分化が誘導されることを *in vitro* の培養系において確認している (未発表データ)。

一方、クラス II に属する AML-MTG8、CBF β -MYH11 などの遺伝子異常を有するいわゆる Core binding factor (CBF) 白血病においても KIT の変異が高頻度に認められることが報告されている。

CBF 白血病は完全寛解率が高く、長期予後が良好であることが知られているが、注目すべきことに KIT 変異を有する AML1-MTG8 型 AML の予後は不良であり、KIT 変異陰性 AML1-MTG8 型 AML と比較して、初回の完全寛解達成率には差を認めないものの、5年以内の再発率が KIT 変異陰性例では 9%ときわめて低いのに対し、陽性例では 56%と高く、特に KIT exon17

D816 変異陽性例では 90%と著明な差が認められる (Blood 107:1791, 2006)。

2. 研究の目的

一般に予後良好とされる CBF 白血病において KIT 変異が加わることにより予後不良となることが明らかにされているが、本研究は、KIT 変異による予後増悪の分子機構を明らかにすることを目的とする。CBF 変異白血病因子と KIT の恒常的活性化型遺伝子をマウス正常造血幹細胞あるいは前駆細胞に導入し、増殖、分化、生存に及ぼす影響を検討する。また遺伝子導入した細胞をマウスに移植することにより、観察される白血病の病態を解析する。さらに CBF 白血病の患者検体を用い、KIT 変異の有無による遺伝子発現の差を解析することにより、KIT 変異による予後増悪の機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞分化への影響

KIT の活性化変異は全身性肥満細胞症の原因となるが、CBF 白血病における KIT 変異の合併例においては肥満細胞の増加は明らかではない。これらの知見をふまえ、正常造血細胞あるいは CBF 変異を有する造血細胞における活性化型 KIT 変異の分化への影響を検討する。AML1-MTG8、CBF β -MYH11 をレトロウイルスにより導入したマウス造血幹細胞/前駆細胞に変異型 KIT 遺伝子をさらに加えて導入し、形態観察、コロニーアッセイやフローサイトメトリーにより系統分化への影響を解析する。CBF 変異が KIT の作用に及ぼす影響のメカニズムを明らかにするために、GATA-1、FOG1、PU.1 などの肥満細胞分化を制御する因子の発現について PCR で解析する。

(2) 自己複製・増殖・生存への影響

AML1-MTG8、CBF β -MYH11 導入マウス造血幹細胞/前駆細胞のサイトカイン存在、あるいは非存在下での培養過程において増殖能、生存能の解析、抗癌剤刺激等によるアポトーシスの感受性の解析、replating assay により自己複製能の解析を行う。

KIT による CBF 白血病の悪性化のメカニズムを明らかにするため、正常造血細胞及び CBF 変異導入造血細胞に KIT の活性化型を導入し、増殖因子、アポトーシス関連因子の発現について PCR で解析する。FLT3 の活性化変異は KIT と同様に CBF 白血病の予後を優位に悪くするが、活性化型 Ras は予後に影響しないことが報告されている。Ras においても同様に CBF 変異導入造血細胞に及ぼす影響の検討を行う。

(3)KIT による薬剤耐性のメカニズムに関する解析

薬剤排出因子 Pgp/MDR1 や MRP の発現が AML の予後不良因子として報告されている。CBF 変異と KIT, FLT3, Rad 同時導入造血幹/前駆細胞におけるこれらの遺伝子発現を PCR で解析する。また、in vitro での培養において Ara-C を添加し、薬剤に対するアポトーシスの感受性について調べる。また、蛍光色素でラベルした抗癌剤を添加し、薬剤の取り込みについて蛍光顕微鏡で観察する。イマチニブは KITD816 には有効でないとしているが、その他の PKC412 とダサチニブは有効であることが報告されており、これらの TK インヒビターが薬剤感受性や薬剤排出因子の発現に及ぼす影響を検討する。

(4)KIT による接着因子の発現に及ぼす影響の検討

接着因子 CD56 (VCAM) の発現は KIT の変異と同様に CBF 白血病の寛解率には影響しないが、無再発期間を優位に短縮することが報告されており、Niche への接着が治療後の白血病幹細胞の残存に関与することが示唆されている。CBF 変異導入細胞における活性型 KIT, FLT3, Ras の導入が CD56 などの接着因子の発現に及ぼす影響を FACS や免疫染色により検討する。

(5)白血病モデルマウスにおける薬剤感受性変化についての検討

①抗癌剤 (Ara-C) を腹腔内投与後のマウス骨髄の標本を蛍光顕微鏡で観察し、GFP 陽性細胞の残存の状況と骨髄 Niche における分布を検討する。

②抗癌剤投与前のマウスの骨髄標本を蛍光染色することにより接着因子の発現と骨髄での細胞の分布について検討する。

4. 研究成果

(1)細胞分化への影響

マウス造血幹/前駆細胞分画にある KSL (Lin-Kit^{High}Scal⁺) 細胞にレトロウイルスを用いて CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 を導入したところ、細胞の増殖や生存に明らかな変化はなかった。

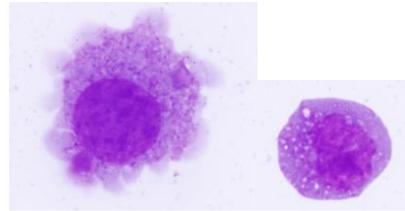
次に、KITV814 と CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 をレトロウイルスで同時に導入した。KITV814 の単独導入 KSL 細胞では、増殖が更新し、生存が延長していた

また、KITV814 導入 KSL 細胞は、9 日間培養すると大型で顆粒を有する肥満細胞に分化するが、CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 導入細胞では細胞質の比較的狭い幼弱な状態を維持していた (図 1)。さらに、肥満細胞に発現する GATA-1、GATA-2、PU.1 の発現が低

下していた。すなわち、CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 の導入により、肥満細胞への分化が抑制されていることが示された。

(2)自己複製・増殖・分化への影響

図 1



KITV814 単独導入 KITV814+ANL
-MTG8 導入細胞

CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 とともに KITV814 を導入した KSL 細胞では、CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 単独導入細胞に比べて、初期の増殖に大きな差は認められなかった。しかし、replating assay においては、長期に自己複製能を維持していた。また、抗がん剤 (Ara-C) の刺激によるアポトーシスが CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 とともに KITV814 を導入した KSL 細胞で単独導入細胞より低下し、抗がん剤抵抗性を認めた。一方、CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 とともに活性型 H-Ras (H-RasG12V) を導入した KSL 細胞では、自己複製能の維持を認めたが、抗がん剤の感受性に変化はなかった。

(3)KIT による薬剤耐性のメカニズムに関する解析

CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 とともに KITV814 を導入した KSL 細胞では、RT-PCR において Pgp/MDR1 および MRP の発現が上昇していた。また、Pgp の阻害剤であるベラパミル添加により KITV814 による Ara-C への抵抗性が一部解除された。以上のことから KITV814 は Pgp/MDR1 や MRP などの薬剤輩出蛋白の発現を誘導することが示された。

(4)KIT による遺伝子修復能に及ぼす影響についての解析

CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 とともに KITV814 を導入した KSL 細胞では、放射線照射後、double strand DNA 断裂を示す γ H2AX の集積が CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 単独導入細胞に比べて有意に増加しており、遺伝子修復能が損なわれていることが示された。さらに、real-time-PCR 法で、遺伝子修復に関わる Gadd45a の発現が導入細胞で抑制されていることが示された。

CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 を同時に導入した KSL 細胞では、いずれも KITV814 導入細胞と刺激の無い状態では増殖や生存に変化がなかった。照射線照射の刺激を与えた状態では、CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8

の単独導入時と同様に γ H2AX の集積と Gadd45a の発現が導入細胞の抑制を認めた。これらのことから CBF β -MYH11 または、AML1-MTG8 は、KIT 変異 KSL 細胞の遺伝子修復を抑制させることが示された。

(5) 白血病モデルマウスにおける薬剤感受性変化についての検討

AML1-MTG8 または CBF β -MYH11 と、MOCK または KITV814 または H-RasE12V と同時に導入したマウス KSL 細胞を放射線致死量照射したマウスに移植し、白血病モデルマウスを作成した。AML1-MTG8 または CBF β -MYH11 と MOCK 導入細胞移植マウスでは白血病を起こさなかったが、KITV814 または H-RasE12V とともに導入した細胞移植マウスでは、一部に白血病を生じた。これらの白血病マウスの腹腔内に Ara-C を投与したところ、KITV814 導入マウスで有意に生存期間が短かった。また、骨髄での白血病細胞の残存が上昇していた。

(6) 結論

以上のことより KIT の活性化変異は、薬剤耐性遺伝子の発現と遺伝子修復に関連する遺伝子発現抑制を介して CBF 白血病の予後を悪くしてい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 3 件)

- ① Hashimoto T, Fukushima K, Kanakura Y, et al. Pulmonary arterial hypertension associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. Intern Med. 50:119-124, 2011 (査読: 有)
- ② Fujita J, Fukushima K, Kanakura Y, et al. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. Immunol Lett. 136:61-73, 2011 (査読: 有)
- ③ Tokunaga M, Ezoe S, Fukushima K, et al. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. J Biol Chem. 285:31774-31782, 2010 (査読: 有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 佐多 弘 ほか、5.0mg/kg のサイモグロブリン®(rATG, Genzyme) を前処置に用いた同種造血幹細胞移植における感染症についての検討、第 34 回日本造血細胞移植学会総会、2012. 2. 25、大阪
- ② 福島健太郎 ほか、同種造血細胞移植に

おける ATG(サイモグロブリン)投与後の EB ウイルス再活性化・LPD の発症の検討、第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 14-16、愛知

- ③ 大塚正恭 ほか、当科における悪性リンパ腫に対する DeVIC 療法施行例の後方視的検討、第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011. 7. 21-23、神奈川
- ④ 佐多 弘 ほか、再生不良性貧血に対し rATG (サイモグロブリン) を用いた前処置にて施行した同種骨髄移植の検討、第 33 回日本造血細胞移植学会総会、2011. 3. 9-10、愛媛
- ⑤ 福島健太郎 ほか、骨髄性悪性疾患に対する FLU/BU/MEL を前処置とした造血幹細胞移植、第 33 回日本造血細胞移植学会総会、2011. 3. 9-10、愛媛
- ⑥ 前田哲生 ほか、血液悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植の前処置における減量 rATG (rabbit antithymocyte globulin) の影響、第 33 回日本造血細胞移植学会総会、2011. 3. 9-10、愛媛
- ⑦ Fujita J, et al. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect FLT3-ligand mediated dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting 2010.12. 4-7, Orlando, USA
- ⑧ 藤田二郎 ほか、Leukemia-related gene abnormalities affect FLT3-ligand-mediated dendritic cell differentiation. 第 72 回日本血液学会学術集会、2010. 9. 24-26、神奈川
- ⑨ 藤田二郎 ほか、Leukemia-related gene abnormalities affect steady-state dendritic cell differentiation(非炎症状態の樹状細胞分化における白血病関連遺伝子異常の役割)、第 69 回日本癌学会学術総会、2010. 9. 22-24、大阪

[その他]

受賞

第 17 回ヨーロッパ血液学会(EHA)年次総会 EHA-JSH fellowship exchange program award 2012. 6. 15

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/bldon/www/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 健太郎 (FUKUSHIMA KENTARO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70546879

(2) 研究分担者、連携研究者
なし