

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590709

研究課題名(和文)難治性白血病の分子機構の解明：FLT3-ITDによる薬剤耐性と関連分子の診断応用

研究課題名(英文)Elucidation of Molecular Mechanisms of Refractory Leukemia: Diagnostic Implications of FLT3-ITD Associated Biomarkers for Drug Resistance.

研究代表者

宮地 勇人(MIYACHI, Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、治療抵抗性白血病の分子病態と診断マーカーを明らかとするため、予後不良因子FLT3-ITDを有する白血病細胞において、抗がん剤ara-C耐性の機序を解析した。FLT3-ITD導入株化白血病K562細胞において、遺伝子発現プロファイリングの結果に基づき、FLT3下流シグナルのRUNX3に着目し、その発現の制御と意義を検討した。レポーターアッセイによるRUNX3プロモータ活性上昇、shRNAノックダウンによる耐性低下、RUNX3過剰発現による耐性増強から、RUNX3はFLT3-ITD陽性白血病細胞のara-C耐性に不可欠な分子であり、診断さらに治療標的の分子マーカー候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular pathogenesis and diagnostic marker of refractory leukemia, molecular mechanisms of cytosine arabinoside resistant leukemia cell K562 cells which possess prognostically poor biomarkers, an internal tandem duplication (ITD) of the receptor tyrosine kinase FLT3. Microarray analysis of the FLT3-ITD-transduced K562 leukemia cell line revealed 311 up-regulated genes. Among them we found transcriptional induction by FLT3-ITD of the runt-domain-containing transcriptional factor RUNX3. FLT3-ITD increased RUNX3 promoter activity in a reporter assay, which was hampered by the inhibitors. shRNA knockdown of RUNX3 in the cells resulted in an increased sensitivity to Ara-C. Exogenous overexpression of RUNX3 per se in K562 cells resulted in enhanced Ara-C resistance. These results suggest that RUNX3 could be a prerequisite for Ara-C resistance via FLT3-ITD signaling, and thus an important candidate of biomarker of the refractory AML.

研究分野：病態検査学

キーワード：Refractory Leukemia Drug Resistance Biomarker FLT3-ITD

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (acute myeloblastic leukemia: AML) では、シトシンアラビノシド (ara-C) やアントラサイクリンなど抗がん剤化学療法における治療抵抗性が患者診療上の大きな課題である。多くの臨床研究から、AML の病型は治療予後を含めた臨床像が白血病細胞に同定される染色体・遺伝子異常によって規定されることが明らかとなった。遺伝子異常の中でも、特に、fms-like tyrosine kinase-3 receptor の internal tandem duplication: FLT3-ITD は正常核型 AML の 25-35% に見られ、治療後の再発が有意に高く、予後不良マーカーとして今日広く利用されている。野性型 FLT3 は正常な前駆細胞または白血病細胞に発現するサイトカイン受容体で、FLT3-ITD は STAT3 や STAT5 などシグナル伝達を活性化する。しかしながら、これら予後不良を示す因子と抗がん剤治療抵抗性の関連について詳細は知られていない。

本研究者は、各種の抗がん剤に耐性の株化培養白血病細胞を樹立し、分子薬理学的手法を用いて耐性の分子機構を解析し、白血病細胞で耐性遺伝子の変異成立に抗がん剤の化学構造の関与を明らかにしてきた。さらに本研究者は、耐性の機構が薬剤と細胞との相互関係にて成立することから、細胞側因子に焦点をあて、耐性遺伝子変異の成立の分子機構としてマイクロサテライト反復配列解析にて遺伝子不安定性の関与を明らかにした。遺伝子不安定性の背景として、DNA 修復酵素、細胞周期関連の遺伝子の異常が示唆され、耐性の機構には多数の遺伝子発現異常が複雑に関与している。我々は、FLT3-ITD を過剰発現させた株化培養白血病細胞が、低酸素下で誘導される転写因子 HIF1 を介して AML に対する重要な抗がん剤である核酸アナログ ara-C に対して耐性を獲得することを明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 2009;390:1001)。FLT3-ITD は、マウス白血病細胞株にサイトカイン非依存性増殖を誘導するが、増殖速度はむしろ低下する。また糖代謝に関与する遺伝子は、多くは発現変化を認めない。これらの結果は、低酸素状態にある骨髄において、細胞増殖を標的とする抗がん剤に耐性となる可能性を示唆している。白血病幹細胞は現在注目されている領域であるが、*in vivo* モデルにおいて白血病幹細胞の有する遺伝子異常と組織学的な分布や機能分子の発現について免疫組織学的検索は我々の研究成果を始め報告数が少ない。FLT3-ITD は、FLT3 遺伝子産物の恒常的な活性化により、主に STAT5 経路を持続的に活性化し、Runx1、PU.1、C/EBP などを経た細胞分化の抑制、および cyclin D1、p21、c-myc、Pim-1、Pim-2 などを介した腫瘍細胞の増殖に関与する。しかし、preliminary な検討からは、

FLT3-ITD の導入により細胞増殖はむしろ抑制されており、それが細胞死からの回避や抗がん剤抵抗性をもたらしている可能性がある。実際、FLT3-ITD の下流分子として抗 apoptosis 効果を有する survivin が同定されている。また多くの白血病細胞を供給する白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と同様に低酸素状態の骨髄腔内の niche にあってその細胞増殖は抑えられているが、FLT3-ITD が増殖を下支えしている可能性がある。白血病の悪性度や治療抵抗性において、治療前から存在する自然耐性と治療後に獲得する獲得耐性がある。白血病の初回治療の適切な選択は、その長期予後を改善することから、白血病細胞の発症に関わる遺伝子異常がもたらす自然耐性の分子機構の解明とそれに基づく、耐性状態の評価と克服が治療上の大きな課題である。FLT3-ITD 陽性細胞における耐性遺伝子とその制御における低酸素状態での意義および耐性化または治療抵抗性白血病の検査診断、治療選択への応用について早急に明らかにすべき課題である。

2. 研究の目的

FLT3-ITD は細胞の分化抑制や増殖促進を介し白血病発症に関与する一方、抗がん剤耐性に関する機序は不明である。近年、一部の抗がん剤耐性の機序として、治療後の微小残存細胞が、骨髄微小環境内において増殖能を獲得し、細胞死を逃れて再び増殖することが報告されている。我々は、FLT3-ITD を過剰発現させた白血病細胞が、低酸素下で誘導される転写因子 HIF1 を介して AML 治療に重要な核酸アナログ Ara-C に対し耐性を獲得することを明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 2009;390:1001)。そこで本研究は、予後不良な遺伝子異常 FLT3-ITD を有する白血病細胞における抗がん剤耐性 (自然耐性) の機序を明らかにするため、抗がん剤耐性をもたらす遺伝子発現異常について、新たなバイオマーカーとしての意義を明らかとし、それらを指標とした抗がん剤耐性の評価法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) FLT3-ITD 陽性細胞樹立と低酸素環境での細胞増殖

治療抵抗性白血病の抗がん剤耐性をもたらす分子機構異常を知るモデル細胞として FLT3-ITD 陽性細胞の作製を行った。まず、TOPO TA クローニングキットにて 2 種類の FLT3-ITD を作製し、培養株化骨髄性白血病 K562 細胞に Neon Transfection system にてトランスフェクションし、2 種類の FLT3-ITD 陽性細胞を得た。puromycin にて細胞選択した後、FLT3 の野生型と FLT3-ITD の状態、さらに FLT3 リン酸化の状態を、それぞれ RT-PCR とウェスタン

プロットにて調べた。

骨髓微小環境、特に低酸素状態に着目し、FLT3-ITD 導入した骨髓性白血病細胞株 K562 において、低酸素条件下での細胞増殖の安定性の確認を行った。

2) 遺伝子発現プロファイリング

骨髓微小環境における FLT3-ITD 陽性白血病細胞の増殖優位性に寄与しうる遺伝子発現を知るため、DNA マイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips, Affymetrix 社) を用いた遺伝子発現プロファイリングを行った。発現亢進していた遺伝子のうち、発現レベルが高く、かつ白血病増殖や抗がん剤治療に関連した分子の有無を調べた。

3) RUNX3 発現の制御

遺伝子発現プロファイリングで発現亢進していた遺伝子のうち、RUNX3 の発現の制御について検討した。FLT3-ITD 陽性の株化白血病 K562 細胞における RUNX3 発現上昇は、遺伝子発現、蛋白発現それぞれリアルタイム PCR とウェスタンブロットにて調べた。

発現の制御は、トランスポートアッセイによるプロモータ活性にて調べた。RUNX3 発現制御と ara-C 耐性の関係を知るため、shRNA による RUNX3 ノックダウン細胞やトランスフェクションによる過剰発現における ara-C 耐性度の変化は、MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにて調べた。

4. 研究成果

1) 低酸素環境での細胞増殖

FLT3-ITD 導入した白血病細胞 K562 において、FLT3 の野生型と FLT3-ITD の状態、さらに FLT3 リン酸化の状態を、それぞれ RT-PCR とウェスタンブロットにて確認できた。

低酸素環境で、その細胞増殖率は、選択後 3-4 週に低下し、それとともない FLT3 リン酸化の状態も低下した。低酸素条件下での細胞増殖は不安定であることが判明した。また、K562 細胞以外で骨髓系白血病細胞として、HL-60 細胞にて、FLT3-ITD 導入を試みるも成功しなかった。以上、低酸素下での細胞培養による性状について詳細を知ることは困難であった。

2) 遺伝子発現プロファイリング

2 つの FLT3-ITD 導入 K562 において、41,000 遺伝子の内、311 遺伝子が発現亢進し、18 遺伝子が発現低下していた。これらから、細胞増殖、増殖因子受容体、細胞外マトリックス受容体に関連する遺伝子として、細胞増殖関連の FGFR1, IGFBP2, NNMT, RUNX3 をコードする遺伝子、キナーゼ型 activin 受容体、細胞外マトリックス fibronectin 受容体、very late antigen (VLA)4 受容体などの遺伝子発現の亢進が

明らかとなった。白血病細胞の抗がん剤耐性または予後不良と関連する BAALC, BCL2, IGFBP2, MECOM の発現上昇も認められた。

3) RUNX3 発現の制御

遺伝子発現プロファイリングで発現亢進していた 18 遺伝子のうち、白血病増殖や抗がん剤治療に関連した分子として、最も発現レベルの高い RUNX3 に着目し、その発現の制御について検討した。FLT3-ITD 陽性の株化白血病 K562 細胞における RUNX3 発現上昇は、遺伝子発現、蛋白発現それぞれリアルタイム PCR とウェスタンブロットにて確認された。トランスポートアッセイにて、RUNX3 のプロモータ活性は FLT3-ITD 発現依存性に上昇し、これは FLT3-ITD 阻害剤 PKC412 および Crenolanib にて抑制された。shRNA による RUNX3 ノックダウン細胞では、ara-C 耐性度も低下した。RUNX3 トランスフェクションにて、外来性の過剰発現は ara-C 耐性度を上昇させた。

以上より、FLT3-ITD 陽性白血病細胞の ara-C 耐性化において、RUNX3 は不可欠な分子であり、治療抵抗性白血病の診断さらに治療標的のマーカーとなりうると思われる。治療後に骨髓微小環境における FLT3-ITD 陽性白血病細胞の増殖優位性をもたらす機構の詳細についてはさらなる検討が必要である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. Damdinsuren A, Matsushita H, Itoh M, Tsukamoto H, Tanaka M, Hayashi H, Matsuzawa H, Asai S, Ando K, Miyachi H. Downstream targets of FLT3-ITD in Ara-C resistance of leukemic cells, 第 54 回日本血液学会学術集、2013 年 10 月 11 日、さっぽろ芸術館 (北海道札幌市)
2. Damdinsuren A, Matsushita H, Asai S, Miyachi H. Analysis of chemotherapy-resistance of AML cells with FLT3-ITD. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 12 月 1 日、国立京都国際会館 (京都市)

[図書](計 0 件)

[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 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮地 勇人 (MIYACHI ,Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196