

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591387

研究課題名(和文) リガンド依存性受容体型チロシンキナーゼ阻害剤耐性機構の解明と克服

研究課題名(英文) Analysis of ligand dependent resistance mechanism of RTK inhibitors

研究代表者

清井 仁 (KIYOI, Hitoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90314004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、FLT3阻害剤のリガンド(FL)依存性耐性機構のメカニズムを、変異FLT3(FLT3-ITD)あるいは細胞外領域欠失変異FLT3(cyFLT3-ITD)単独ならびに、それらと正常FLT3(Wt-FLT3)を共発現する細胞株で検討し、FL刺激によって共発現している正常FLT3とMAPKの活性化が関与していることを明らかにした。このリガンド依存性のFLT3阻害剤の抗腫瘍効果減弱作用は正常FLT3分子の発現量に影響を受けることが、ヒト白血病細胞のマウスへの異種移植系においても証明され、FLT3阻害剤の有効性を予測するバイオマーカーになることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed the FLT3 ligand (FL)-dependent resistance mechanism of FLT3 inhibitors using wild type FLT3 (Wt-FLT3) and FLT3-ITD or extracellular domain-lacked FLT3-ITD (cyFLT3-ITD) co-expressing cells. I demonstrated that FL-stimulation activates co-expressing-Wt-FLT3 and MAPK, resulting in the reduction of anti-leukemia activity of FLT3 inhibitor. This FL-dependent inhibitory effect of FLT3 inhibitors was also confirmed in the human leukemia cell xenotransplant mouse models, in which Wt-FLT3 and FLT3-ITD co-expressing leukemia cells were not sufficiently eradicated by FLT3 inhibitors. These results also indicate that Wt-FLT3 expression level is a molecular marker for predicting the efficacy of FLT3 inhibitors.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液腫瘍学 チロシンキナーゼ 分子標的療法 白血病

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼの活性型変異は白血病をはじめとする多くの造血器腫瘍の発症・進展に関与していることから、多数のチロシンキナーゼを標的とした阻害剤の開発、臨床応用が進められている。なかでも FLT3 や KIT などの受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の活性型変異は急性骨髄性白血病 (AML) において高頻度で認められる予後不良因子であることから、*imatinib* に続く選択的阻害剤の臨床応用が最も早く進むと考えられてきた。しかし、これまでの臨床開発試験の結果は、*in vitro* やマウス白血病モデルでの抗腫瘍効果と大きな乖離を認めている。FLT3 阻害剤を例にとると、10 種類以上の FLT3 阻害剤について臨床試験が実施されているが、その治療効果は一過性の芽球減少に留まっている。ヒト白血病症例における不十分な治療効果の原因探索は精力的に行われ、有効血中濃度の維持、選択性や阻害活性の低さなど阻害剤そのものに起因する問題点が指摘されているが、変異 FLT3 を有する白血病細胞や骨髄環境に起因する治療抵抗性メカニズムについてはほとんど検討されていない。我々は FLT3 阻害剤の臨床開発のなかで、FLT3 リガンド (FL) が細胞表面に発現する変異 FLT3 分子のみならず、正常 FLT3 分子が変異 FLT3 分子と共発現している場合には正常 FLT3 分子を活性化させることにより、増殖阻害効果を減弱させていることを見いだした。これらの知見と変異 FLT3 発現 AML 細胞の大部分は正常 FLT3 分子を共発現していることを考慮すると、変異 FLT3 発現 AML 細胞は恒常的な FL 刺激を受けているために、FLT3 阻害剤投与時に *in vitro* で得られる阻害活性に相応する治療効果が得られていないことが示唆される。また、RTK の多くは造血幹/前駆細胞に発現・機能していることから、耐性克服のために、より高

い阻害活性を追求するのみでは抗腫瘍効果と同時に高度の骨髄抑制を招来し実臨床での使用には困難が生じると考えられる。実際、FLT3 に対する高い選択性と $IC_{50} < 1nM$ の強い阻害活性を有する AC220 は非常に強い抗白血病細胞効果を示すものの、臨床第二相試験で治療効果を認めた全ての症例が正常造血の回復を認めない CRi (CR with incomplete recovery) であったことから薬剤投与量の見直し (減量) が検討されている。リガンド刺激による阻害剤の効果減弱機構は、BCR-ABL のような細胞質内活性化キナーゼを標的とした阻害剤治療では起こりえない RTK に特徴的な耐性機構であるといえる。更に白血病幹/前駆細胞では、複数の RTK が発現していることから、変異 RTK 分子の活性化シグナルを阻害しても他の RTK 分子のリガンド依存性シグナルによって、自己複製・増殖機構が代替的に保持されることも考慮する必要がある。従って、白血病における活性化 RTK 分子を標的とした阻害剤の臨床応用においては、活性化変異 RTK 分子のみならず複数の正常 RTK 分子のリガンド依存性シグナル伝達機構を制御することによって、より高い治療効果を得ることが期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、RTK 阻害剤治療におけるリガンド刺激に基づく耐性化機構の詳細な分子メカニズムを解明するとともに、耐性機構を克服するための併用療法・創薬コンセプトを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での評価系として図 1 に示す正常 FLT3 発現 (Wt-FLT3)、変異 FLT3 発現 (ITD-FLT3)、正常/変異 FLT3 共発現

(Wt/ITD-FLT3)、細胞外領域欠失変異 FLT3 発現 (cyITD-FLT3)、正常/細胞外領域欠失変異 FLT3 共発現 (Wt/cyITD-FLT3) 32D 細胞を用いて検討を進めた。それぞれの発現 FLT3 分子は区別可能なように Myc または FLAG タグを付加したものをを用いた。

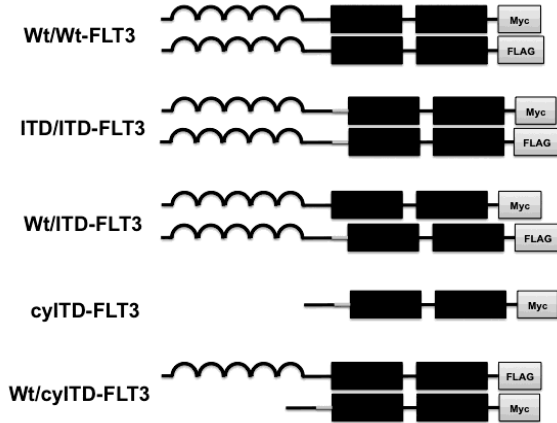


図 1. 本研究で使用した FLT3 発現分子

(2) 上記の各種 FLT3 発現細胞に可溶性 FL 存在下、非存在下で複数の FLT3 阻害剤を添加後、経時的に個々の細胞における発現 FLT3 分子ならびに細胞内での細胞増殖シグナル伝達分子、抗アポトーシス分子の活性化・発現量の変化をウエスタンブロットで比較した。

(3) 正常および変異 FLT3 共発現細胞において、個々の分子を区別するタグ蛋白に対する抗体で免疫沈降後、正常および変異 FLT3 分子の活性化状態あるいは活性化阻害状態、二量体形成、trans-activation の有無を検討した。

(4) *in vitro* で確認されたりガンド依存性耐性機構を *in vivo* で確認するために、AML 細胞移植 NOG マウスにおける FLT3 阻害剤の抗白血病細胞効果を検証した。

4. 研究成果

(1) cyITD-FLT3-32D 細胞以外の変異 FLT3 発現細胞においては、FLT3 に対する選択性の高さに応じて、FL 存在下では阻害活性の減弱が認められた (図 2)。この減弱効果は正常

FLT3 分子の共発現細胞において、より顕著に認められたが、cyITD-FLT3-32D 細胞では FL による増殖抑制効果は認めなかった。

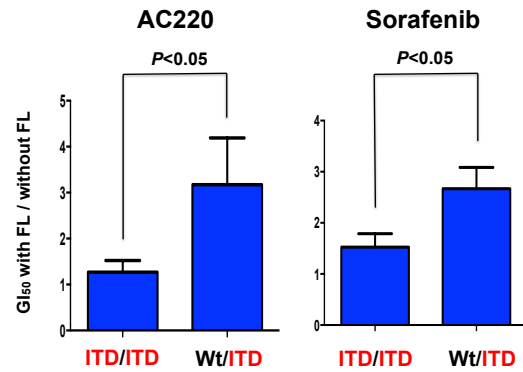


図 2. FL 添加による GI50 の低下

(2) これら細胞株における FL 刺激による細胞増殖、細胞周期に及ぼす影響を検討したところ、正常 FLT3 共発現細胞においては、細胞周期の G2 停止とアポトーシス誘導が認められた。

(3) これら正常/変異発現 32D 細胞を同系の C3H マウスに静注すると、変異 FLT3 発現細胞接種マウスは全例 30 日以内に白血病を発症し、死亡したのに対し、正常 FLT3 共発現細胞は白血病を発症しなかった。また、死亡までの期間は cyITD-FLT3-32D 細胞が最も短期間であった (図 3)。

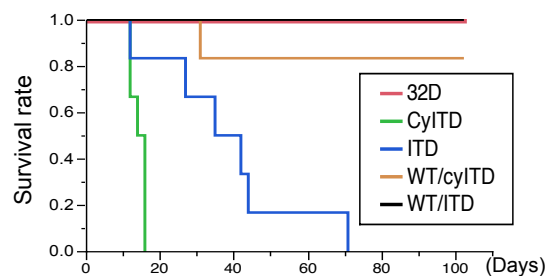


図 3. 同系マウスへの移植時の生存割合

(4) 正常/変異発現 32D 細胞を NOD/SCID マウスに皮下移植し、FLT3 阻害剤 (AC220) を経口投与したところ、正常 FLT3 共発現細胞に対する抗腫瘍効果は有意に減弱していた (図 4)。

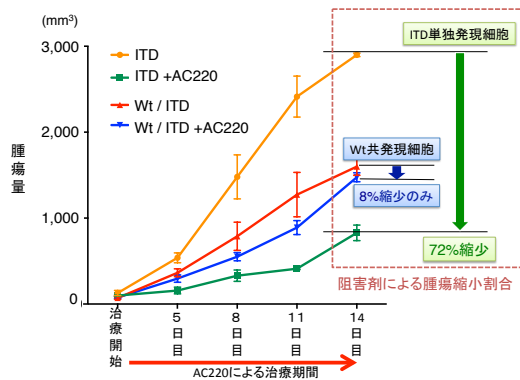


図 4. NOD/SCID マウス移植系での抗腫瘍効果

(5) 半固形培地を用いたヒト AML 細胞の増殖評価系においても、正常 FLT3 分子が変異 FLT3 分子と同等に発現している AML 細胞では FL 存在下での FLT3 阻害剤による増殖抑制効果が減弱されることが確認された。

(6) ヒト AML 細胞を NOG マウスに異種移植することにより樹立したヒト AML マウスモデルにおいても、FLT3 阻害剤による治療効果は、正常 FLT3 分子共発現 AML 細胞モデルにおいて著明に減弱していた。しかし、FLT3 阻害剤に加えて MEK 阻害剤により MAPK 活性を抑制することにより、FL による増殖抑制効果の減弱はキャンセルできることを明らかにした。

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 20 件) (全て査読有り)

- ① Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in

adult acute myeloid leukemia patients. **Leukemia**. 2014; 28: 1586-1595.

doi: 10.1038/leu.2014.55.

- ② Shimada K, Tomita A, Saito S, Kiyoi H. Efficacy of ofatumumab against rituximab-resistant B-CLL/SLL cells with low CD20 protein expression. **Br J Haematol**. 2014; 166: 455-457.

doi: 10.1111/bjh.12857.

- ③ Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T, Mano H. Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia**. 2014; 28: 426-428.

doi: 10.1038/leu.2013.278.

- ④ Niimi K, Kiyoi H, Ishikawa Y, Hayakawa F, Kurahashi S, Kihara R, Tomita A and Naoe T. GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. **Leukemia Research Reports** 2013; 2: 21-25.

doi: 10.1016/j.lrr.2013.02.002.

- ⑤ Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. **Int J Hematol**. 2013; 97:165-74.

doi: 10.1007/s12185-013-1257-4.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Fangli Chen, Yuichi Ishikawa, Akimi Akashi, Tomoki Naoe, Hitoshi Kiyoi. Mechanism of FLT3 Ligand Dependent Resistance to FLT3 Inhibitors. 第 56 回米国血液学会. サンフランシスコ、米国 2014 年 12 月 6 日
- ② 鈴木弘太郎、石川裕一、清井仁. 共発現する正常受容体型チロシンキナーゼ (RTK) のリガンド依存性シグナルを介した阻害剤の効果減弱機構. 第 73 回日本癌学会学

術総会. 神奈川県 横浜市 パシフィコ
横浜. 2014年9月25日

- ③ 陳昉里、石川裕一、木原里香、直江知樹、清井仁. Mechanism of FLT3 ligand dependent resistance to FLT3 inhibitors. 第35回国際血液学会. 北京、中国. 2014年9月4日
- ④ 清井仁. 活性型変異 FLT3 を標的とした白血病治療の現状と課題. 第23回日本 Cell Death 学会学術集会. 東京都 文京区 東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂. 2014年7月19日
- ⑤ 陳昉里、石川裕一、木原里香、清井仁. Inhibitory effects of FL on proliferation and FLT3 inhibitors in Wt- and ITD-FLT3-co-expressing cells. 第5回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム. 静岡県 浜松市 アクトシティ浜松. 2014年5月24日

[図書] (計5件)

- ① 清井仁: 急性骨髄性白血病の治療. 大野竜三編. 新しい診断と治療の ABC 急性白血病 改訂第2版. 276頁 pp83-93. 最新医学社. 大阪. 2012. (分担執筆)
- ② 清井仁: 正常核型 AML の遺伝子異常と予後. 金倉 譲、木崎昌弘、鈴木律朗、神田善伸編. EBM 血液疾患の治療 2013-2014. 594頁 pp50-54. 中外医学社. 東京. 2012. (分担執筆)
- ③ 清井仁: MDS/AML に対するデシタビンの臨床応用. 木崎昌弘編. 造血器腫瘍とエピジェネティックス. 251頁 pp168-176. 医薬ジャーナル社. 大阪. 2012 (分担執筆)
- ④ 清井仁: 白血病. 泉 孝英編. ガイドライン外来診療. 619頁 pp433-435. 日系メディカル開発. 東京. 2012 (分担執筆)
- ⑤ 清井仁: 急性骨髄性白血病. 山口 徹、

北原光夫、福井次矢編. 今日の治療指針 2012. 1955頁 pp577-581. 医学書院. 東京. 2012. (分担執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清井 仁 (KIYOI Hitoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90314004