

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461439

研究課題名(和文) 変異型レセプター型チロシンキナーゼの細胞内輸送を標的とした新規白血病治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approaches targeting intracellular trafficking of RTK mutants in acute myeloid leukemia cells.

研究代表者

田中 宏和 (TANAKA, Hirokazu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40360846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：FLT3-ITDやKIT D816V変異はAMLに高頻度に認められ、予後不良因子として知られる。本研究では、膜輸送を阻害するchlorpromazine (CPZ)の抗白血病効果を検討した。

変異RTKは、細胞内で異所性に、異常なシグナルを伝達しているが、CPZは変異RTKの細胞内輸送を障害し、その活性や下流分子の活性を阻害することで、AML細胞の増殖、生存を容量依存的に阻害した。異種移植の系において、CPZの投与はAMLの生着を阻害し、AML幹細胞にも毒性を示した。一方、正常造血細胞への毒性は軽微であった。以上より、CPZはAML根絶における有望な薬剤であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：FLT3-ITD and KIT D816V mutation are frequently found in AML and associated with poor prognosis. In this study, we evaluated the anti-leukemic effects of an inhibitor of membrane trafficking, chlorpromazine (CPZ).

Recent studies demonstrated that these oncogenic RTKs are mislocalized in the cytoplasm, where they transmit aberrant signals to downstream. CPZ disrupted the intracellular trafficking of RTK mutants, and significantly suppressed activities of RTK mutants and their downstream molecules. Consequently, CPZ inhibited the growth and survival of AML cells with mutant RTK in a dose-dependent manner. In xenotransplantation models, administration of CPZ significantly reduced engraftment of AML cells, and also showed the cytotoxic effect to AML stem cells, while displaying minimal toxicity to normal hematopoietic cells. These results suggest that CPZ would be a promising therapeutic drug to eradicate AML cells with an established safety profile.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病 受容体 細胞内輸送 分子標的

1. 研究開始当初の背景

近年、造血器腫瘍をはじめ多くの領域で、分子病態に基づいた薬剤(分子標的薬)が数多く検討されている。しかしながら急性骨髄性白血病(AML)においては、未だ画期的な薬剤は見出されていない。

2. 研究の目的

申請者らは、クラスリン被覆小胞を介した物質輸送に関与する分子 CALM の造血細胞における機能解析を行ってきた。その中で、変異型サイトカイン受容体を導入した白血病細胞株において CALM の発現や機能を抑制した場合、腫瘍形成能が強く阻害される結果を得た。本研究では、この機序について詳細に解析し、サイトカイン受容体の細胞内輸送を操作することによる抗腫瘍効果について検討を行うことで、難治性の白血病に対する新たな治療法の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 変異型 c-kit, Flt3 の細胞内局在、及びシグナル伝達における CALM の機能

CALM KO マウス胎仔肝由来の造血幹細胞(LSK)を FACS にて分離し、*c-kit V814*, *Flt3 ITD* (変異受容体型チロシンキナーゼ, RTK) を遺伝子導入した。変異 RTK の局在を蛍光免疫染色により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、RTK、下流分子のリン酸化変化を western blot 法にて解析した。

2) クラスリン被覆小胞形成阻害剤による抗腫瘍効果

chlorpromazine(CPZ)存在下で変異型 RTK 導入 LSK 細胞、白血病細胞株を培養し、細胞増殖、細胞周期に及ぼす影響について検討した。また、AML 患者骨髄より単離した変異 RTK(+)の白血病細胞を放射線照射した NOG マウスに移植し、白血病発症を確認後、CPZ を有効血中濃度範囲内で 8-10 週間腹腔内投与した。

4. 研究成果

これまでの報告から、恒常的活性化型 c-kit, Flt3 (c-kit V814 変異, Flt3 ITD 変異) はそれぞれゴルジ体、小胞体に局在し、異所性のシグナルを細胞内に伝えることが報告されている。CALM KO マウスの LSK に、*c-kit V814*, *Flt3 ITD* を導入した結果、KO マウス LSK における変異 RTK は、細胞質に散在し、エンドソーム、ゴルジ体、リソソーム、小胞体いずれとの共有も示さなかった。c-kit V814 変異, Flt3 ITD 変異の下流に位置するシグナル伝達分子 Akt, STAT5 の活性を解析した結果、KO マウス LSK では各々の活性が、野生型(WT) マウス LSK 細胞に変異型 RTK を導入した場合と比較して、著明に抑制されていた。

次に、CPZ 存在下で変異 RTK 導入 LSK 細胞、白血病細胞株を培養した結果、変異 RTK を有する細胞特異的に、CPZ 処理により細胞増殖が著明に抑制され、G1 期での細胞周期停止、細胞死が誘導された。これらの細胞では、CALM KO 細胞と同様に、変異 RTK からの異所性シグナルが強く抑制されていた。一方、変異 RTK 導入 CALM KO LSK 細胞に、全長ならびに分子内の機能ドメインを欠いた CALM を導入し、変異 RTK の局在変化を解析した結果、クラスリン結合ドメインを欠いている場合には、変異 RTK の局在、および下流へのシグナル伝達の回復は認められなかった。

in vivo での解析の結果、変異 RTK(+)白血病細胞を移植したマウスでは CPZ 投与により、白血病細胞の著明な減少を認め、生存期間の有意な延長を認めた。また、CPZ 投与により、骨に接着する CD34+38- の AML 幹細胞の著明な減少を認めた。一方、臍帯血由来の正常 CD34+細胞を移植したマウスに CPZ を投与した場合、造血抑制は認められず、骨髄キメリズムは維持されていた。以上の結果より、CPZ は変異 RTK の細胞内局在を操作することで、既存の TKI と異なる新たな機

序で変異 RTK の活性を制御できること、一方正常造血に影響しないことから、AML 根絶のための有用な治療薬となる可能性が示唆された。

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 19 件)

森田泰慶、田中宏和、松村到、5q-症候群の新たな責任遺伝子、血液内科、査読有、70 巻、2015、612-616

Sumiyoshi M、Tanaka H、Matsumura I(18 人中 14 番目)FEBS Letters、査読有、589 巻、2015、2754-62、DOI : 10.1016/j.febskeft.2015.07.050.

Morita Y、Tanaka H、Matsumura I(18 人中 14 番目)、HIV-negative Primary Bone Marrow Hodgkin Lymphoma Manifesting with a High Fever Associated with Hemophagocytosis as the Initial Symptom: A Case Report and Review of the Previous Literature、Internal Medicine、査読有、54 巻、2015、1393-6、DOI : 10.2169/internalmedicine.54.3770.

Yanagihara M、Tanaka H、Matsumura I(9 人中 3 番目)Aleukemic Solitary Cutaneous myeloid sarcoma、The Journal of Dermatology、査読有、42 巻 8 号、2015、844-845、DOI:10.1111/1346-8138.12924

田中 宏和、平瀬 主税、松村 到、CML 幹細胞のチロシンキナーゼ阻害剤耐性機序と治癒を目指した新たな治療標的、臨床血液、査読有、56 巻 2 号、2015、139-149、DOI : 10.11406/rinketsu.56.139.

Kobayashi T、Tanaka H、Matsumura I、(23 人中 7 番目) KMF Investigators. Impact of early use of lenalidomide and low-dose dexamethasone on clinical outcomes in patients with relapsed/refractory multiple myeloma、International Journal of Hematology、査読有、Vol.101、issue1、2015、37-45 DOI : 10.1007/s12185-014-1696-6.

Tanimura A、Tanaka H、Matsumura I(12 人中 9 番目)The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both

autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis、Experimental Hematology、査読有、Volume42、Issue 5、2014、410-422

DOI:10.1016/j.exphem.2014.01.002

Kurodam J、Tanaka H、Matsumura I(19 人中 4 番目)Limited value of the international staging system for predicting long-term outcome of transplant-ineligible, newly diagnosed, symptomatic multiple myeloma in the era of novel agents、International Journal of Hematology、Vol.99、Issue 4、2014、441-449、DOI:10.1007/s12185-014-1539-5.

Rai S、Tanaka H、Matsumura I(14 人中 2 番目)Clathrin assembly protein CALM plays a critical role in KIT signaling by regulating its cellular transport from early to late endosomes in hematopoietic cells、PLoS One.Vol.9、Issue10、2014、e109441

DOI:10.1371/journal.pone.0109441.

金井良高、田中宏和、松村到(11 人中 8 番目)Trib1 and Trib2 inhibit granulocytic differentiation by suppressing Akt pathway、Acta Med Kinki Univ、査読有、Vol39No.1、2014、29-37、<http://kurepo.clib.kindai.ac.jp>

田中宏和、松村到、骨髄不全症における鉄過剰の病的意義、血液内科、査読有、第 68 巻 5 号、2014、572-578 <http://www.kahyo.com>

田中宏和、松村到、骨髄系の白血病幹細胞、医学のあゆみ、査読有、第 250 巻 1 号、2014、5-9 <http://www.pieronline.jp>

平瀬主税、田中宏和、松村到、慢性骨髄性白血病における ELN2013、血液内科、査読有、第 68 巻 3 号、2014、399-404 <http://www.kahyo.com>

Morita Y、Tanaka H、Matsumura I(9 人中 4 番目)Successful anticoagulant therapy for two pregnant PNH patients, and prospects for the eculizumab era. International Journal of Hematology、査読有、Vol.97、Issue4、2013、491-7、DOI : 10.1007/s12185-013-132-3.

芦田隆司、田中宏和、松村到(19 人中 15 番目)血液疾患における血球輸血量と輸血後

鉄過剰症の現状、臨床血液、査読有、54 巻 4 号、2013、365-369

Satoh Y, Tanaka H, Matsumura I (17 人中 13 番目) The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages, Immunity. 査読有、Vol138、Issue6、2013、1105-15、DOI:10.1016/j.immuni.2013.05.014.

平瀬主税、田中宏和、松村到、慢性骨髄性白血病、日本臨床、査読有、23 巻、2013、67-72

田中宏和、平瀬主税、松村到、慢性好酸球性白血病、非特定型、日本臨床、査読有、23 巻、2013、80-82

田中宏和、松村到、白血病、医療情報誌 animus、査読有、No.75、2013、11-15、<http://www.medicine.co.jp>

[学会発表](計 42 件)

Satoru Kosugi、Hirohiko Shibayama、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(23 人中 8 番目)、Second primary malignancies among patients with myeloma-related diseases in KMF database、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 18 日、「ホテル日航金沢(金沢市)」

金子仁臣、八木秀男、小原尚恵、柴山浩、田中宏和、松村到(30 人中 5 番目) 症候性骨髄腫 969 症例における腎障害の後方視的解析、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 17 日、「ANA クラウンプラザホテル金沢(金沢市)」

Takae Kohara、Hirohiko Shibayama、Hirokazu Tanaka(25 人中 13 番目)、Retrospective analysis of MM patients with dual refractory to bortezomib and IMiDs in KMF registry、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 17 日、「ホテル日航金沢(金沢市)」

Aya Nakaya、Hideo Yagi、Hitomi Kaneko、Satoru Kosugi、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(29 人中 21 番目) Dose early tretment improve the outcome of patients

with transplant-ineligible symptomaic myeloma?、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 17 日、「ホテル日航金沢(金沢市)」

Kentaro Serizawa、Hirokazu Tanaka、Yoichi Tatsumi、Takashi Ashida、Itaru Matsumura(14 人中 11 番目) Analysis of MECP regimen with relapsed or refractory malignant lymphoma in our institution、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日、「石川県立音楽堂(金沢市)」

田中宏和(5 人中 1 番目) CALM plays a critical role for oncogenic activity of RTK mutants and would be a promising therapeutic target、第 44 回国際実験血液学会、2015 年 9 月 17 日 19 日、「京都国際会議場(京都市)」

口分田貴裕、田中宏和、松村到(18 人中 14 番目) 若年劇症型再生不良性貧血に対する臍帯血移植に成功した一例、第 37 回日本造血細胞移植学会学術総会、2015 年 3 月 7 日、「神戸ポートピアホテル(神戸市)」

芹澤憲太郎、田中宏和、松村到(15 人中 11 番目) 同種造血幹細胞移植前処置におけるフルダラビン併用下での静注ブスルファン使用量の後方視的解析、第 37 回日本造血細胞移植学会学術総会、2015 年 3 月 7 日、「神戸ポートピアホテル(神戸市)」

宮武淳一、田中宏和、辰巳陽一、芦田隆司、松村到(19 人中 15 番目) 同種造血幹細胞移植患者に対するフルコナゾールとイトラコナゾールによる侵襲性アスペルギローシス予防効果の比較:D-index score を用いた後方視的解析、第 37 回日本造血細胞移植学会学術総会、2015 年 2015 年 3 月 6 日、「神戸ポートピアホテル(神戸市)」

Kentaro Serizaw、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(13 人中 9 番目)、Analysis of

conditioning regimen for ASCT with relapsed or refractory malignant lymphoma、第76回日本血液学会学術集会、2014年11月1日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Takahide Taniguchi、Kentaro Serizawa、Hirokazu Tanaka、Youichi Tatsumi、Itaru Matsumura(13人中9番目)、A case of Mogamulizunab treatment for refractory ATLL to DLI following allo-SCT、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Hitomi Kaneko、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(30人中9番目)、ISS is a predictive factor of SCT effect for symptomatic myeloma patients under age 65、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Hirohiko Shibayama、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(29人中12番目)、The effects of consolidation and maintenance therapies for symptomatic MM patients after auto HSCT、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Hideo Yagi、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura、Yuzuru Kanakura(30人中11番目)、Novel Agents for the elderly patients with multiple myeloma: Analysis in Kansai Myeloma Forum、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Shin-Ichi Fuchida、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura、Yuzuru Kanakura(30人中5番目)、Retrospective comparison of 3 BTZ-based therapies(BD,CBD and MPB)and MP in elderly MM patients、第

76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、「大阪国際会議場(大阪市)」

Shinya Rai、Hirokazu Tanaka、Matsumura Itaru(10人中2番目)、Leukemogenic FLT3-ITD and KIT D814V depend more in CALM function than their wild types to transmit growth/survival signals: Identification of CALM as a new therapeutic target、第19回欧州血液学会、2014年6月12日、「ミラノ(イタリア)」
田中宏和、松村到、生体内に残存する CML 幹細胞の特性解析、新学術領域「癌幹細胞を標的とする主要根絶技術の新構築」第8回総括班会議、2014年5月29日、「九州大学(福岡市)」

芹澤 憲太郎、田中 宏和、松村 到(15人中10番目)、当院における同種造血幹細胞移植時のダブトマイシンの有用性と安全性、第36回日本造血細胞移植学会総会、2014年2014年3月7日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura and Yuzuru Kanakura(32人中1番目)、Retrospective Analysis of The Recent Treatment Strategies For The Patients With Myeloma-Related Diseases Registered In Kansai Myeloma Forum、The American Society of Hematology 55th Annual Meeting、2013年12月7-10日、「ニューオーリンズ(アメリカ)」

田中宏和、松村到、生体内に残存する CML 幹細胞の特性解析、新学術領域研究「癌幹細胞を標的とする腫瘍根絶技術の新構築」第7回総括班会議、2013年11月14日、「九州大学(福岡)」

②Satoru Kosugi、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(29人中3番目)、HDT with auto-PBSCT for myeloma un the new-agent

era:A retrospective analysis of KMF registry、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

②Yuji Shimura、Hirokazu Tanaka (25 人中 4 番目)、MP therapy for multiple myeloma in the era of new agents:Analisis in Kansai Myeloma Forum、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

③Tsutomu Kobayashi、Hirokazu Tanaka (25 人中 4 番目)、Lenaridomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma in Kansai Myeloma Forum、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

④Kentaro Serizawa、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura (14 人中 10 番目)、Results of gemcitabine therapy for relapsed of refractory Non-Hodgkin's Lymphoma in one institute、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

⑤Yoshitaka Kanai、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(11 人中 8 番目)、Trib1 and Trib2 block myeloid differentiation by suppressing AKT phosphorylation、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

⑥Shinya Rai、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura (7 人中 2 番目)、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

⑦Yoichi Tatumi、Shinya Rai、Hirokazu Tanaka(10 人中 7 番目)、Clinical outcome

of radioimmunotherapy with ASCT(Z-LEED) for B-cell lymphoma、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

⑧Takashi Ashida、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura (19 人中 15 番目)、Efficacy of early intervention of deferasirox in patients with transfusional iron overload、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 - 13 日、「ロイトン札幌(札幌市)」

⑨Yoshitaka Kanai、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(4 人中 2 番目)、Trib1 and Trib2 block myeloid differentiation by suppressing AKT phosphorylation、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3 日 5 日、パシフィコ横浜

⑩Shinya Rai、Hirokazu Tanaka、Itaru Matsumura(5 人中 2 番目)、CALM links cytokine signals to hematopoietic cell growth and survival by regulating intracellular trafficking of receptor tyrosine kinases、第 18 回 欧州血液学会、2013 年 6 月 13-16 日、「ストックホルム(スウェーデン)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏和 (TANAKA,hirokazu)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：40360846

(2) 研究分担者

松村 到 (MATSUMURA, Itaru)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：00294083

平瀬 主税 (HIRASE,Chikara)
近畿大学・医学部・医学部講師
研究者番号：30548590