

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09461

研究課題名(和文) クラスリン依存性エンドサイトーシスを標的とした新規白血病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-leukemic therapy targeting clathrin-dependent endocytosis

研究代表者

松村 到 (MATSUMURA, Itaru)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00294083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、クロルプロマジン(CPZ)によってクラスリン依存性細胞内輸送を阻害すると、FLT3-TIDやKITD814Vなどの活性型変異受容体チロシンキナーゼ(mtRTKs)の細胞内小器官への局在、活性が阻害されることを見出した。CPZはmtRTKをもつ急性骨髄性白血病(AML)細胞、AML幹細胞の増殖をin vitroで抑制した。異種移植のマウスモデルでは、抗精神病薬として用いられる用量のCPZは、mtRTKを有するAML細胞の増殖を抑制し、AML幹細胞も死滅させた。これらから、クラスリン依存性細胞内輸送を標的とするCPZはmtRTKを有するAMLに対する新たな治療薬となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We here show that pharmacologic inhibition of clathrin-dependent trafficking of mutated receptor tyrosine kinases (mtRTK such as FLT3-ITS and KIT D814V mutation) with chlorpromazine (CPZ) disrupts their cellular localization and inhibits their activities. CPZ suppressed the growth of primary AML cells with mtRTK, including CD34+38- AML stem cells in vitro. In mice transplanted with primary AML cells, administration of CPZ at a clinically relevant concentration inhibited the growth of AML cells with mtRTK while it showed a marginal effect on the growth of AML cells with wild-type RTK. Also, CPZ treatment eliminated AML stem cells at the periosteal region in the bone marrow of the recipient mice. These results demonstrate that the intracellular trafficking of mtRTKs would be a good therapeutic target and CPZ would be new therapeutic agent against AML with mtRTK.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病 阻害薬 分子標的

## 1. 研究開始当初の背景

分子標的薬の開発により、造血器腫瘍の治療成績は画的に改善した。一方、急性骨髄性白血病(AML)では、未だ安全性の高い有効な薬剤は開発されていない。申請者は、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の細胞内膜輸送に関わる CALM のノックアウトマウスを作成し、造血幹/前駆細胞の SCF/KIT 依存性増殖が強く障害されることを見出した。さらに、膜輸送の阻害薬である chlorpromazine(CPZ)が、FLT3-ITD や KIT D816F などの活性型変異 RTK を有する白血病細胞の増殖・生存を強く抑制することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、AML の患者サンプルを用いて抗精神病薬 CPZ の抗白血病効果を明らかにするとともに、CPZ などの細胞内輸送(ICT)阻害薬による新規白血病治療法の臨床応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

- ICT 阻害薬の抗白血病効果についての *in vivo*, *in vitro* での検討
  - FLT3-ITD, KIT D816F 変異の有無別の抗白血病効果について、分離した AML 細胞をサイトカイン(SCF, FL, TPO)および CPZ 等の ICT 阻害薬添加培地にて培養し、4日、7日における増殖率を ATP アッセイにて測定した。
  - AML 幹細胞に対する抗白血病効果について、AML 患者の骨髄より単離した AML 幹細胞分画(CD34+CD38-細胞)、AML 前駆細胞分画(CD34+CD38+細胞)に対する CPZ 等の ICT 阻害薬の抗腫瘍効果を(1)と同様の方法で検討した。
  - $1.0 \times 10^4$  個/マウスの AML 細胞を致死量 2.4Gy 照射した免疫不全マウス(NOG マウス, 6-8 週齢)に経尾静脈で移植し、4 週後 AML の発症を末梢血で確認した。CPZ を各種濃度 5, 10, 15, 20mg/kg で移植の翌日より腹腔内投与し、生食を投与したコントロールと以下の項目につき比較検討した。

移植後 4 週目の末梢血、骨髄中、脾臓のヒト細胞の比率

移植後 4 週目の骨髄中の CD34+CD38-の AML 幹細胞比率

移植マウスの生存率

(4) ICT 阻害薬の抗白血病効果の分子機構について、MAPK, STAT, PI3K/Akt などのシグナル伝達、アポトーシス制御分子の活性をフローサイトメトリー、及びウェスタンブロットで検討した。

(5) CPZ と抗がん剤(cytarabine)の併用効果について、AML 細胞を移植し、6 週後骨髄へ 20% 以上 AML 細胞の生着を確認できた白血病マウスモデルを用いて検討した。

2) 活性型変異 RTK (Met や EGFR など)を有する固形腫瘍に対する CPZ の抗腫瘍効果の検討

非小細胞肺癌細胞株 HCC827, PC-9, HCC4006(活性化変異 EGFR)、H1437(活性化変異 MET)、H3122(EML4-ALK)などを用いて、*in vitro* での細胞増殖における各々の TKI(Gefitinib, Tivantinib, Alectinib)と CPZ との併用効果について検討した。

3) 倫理面の配慮

本研究は、当大学の倫理委員会において承認され(承認番号 KDMS-24-003)、サンプルの使用ならびに本研究の内容については、採取前に患者およびその家族に説明を行い、口頭、文書の両方で同意を得た後に分離、保存したものをを用いた。また、本研究における動物実験については、近畿大学動物実験委員会の承認を得て、「動物の愛護及び管理に関する法律」と近畿大学動物実験規程等を遵守して、適正に動物実験を行った。

## 4. 研究成果

1) *in vivo* における CPZ の抗白血病効果  
患者骨髄より単離した変異 RTK(+)あるいは変異 RTK(-)の白血病細胞を 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。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、一部変異RTK(-)細胞を移植したマウスでも、白血病細胞の減少を認めた。生食を投与したコントロール群の白血病細胞では、変異RTKは細胞内小器官に局在し、異所性に下流シグナルを伝達していた。一方、CPZ投与群の白血病細胞では、変異RTKは細胞質に散在し、シグナル伝達が著明に抑制されることで、G1期での細胞周期停止、細胞死が誘導されていた。同様の効果は、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害薬であるchloroquine, Pitstopなどを用いたin vitroの系においても確認された。

2) Met や EGFR などの活性型変異 RTK を有する固形腫瘍に対する CPZ の抗腫瘍効果  
非小細胞肺癌細胞株、胃癌細胞株を用いて、各阻害剤 Gefitinib、Tivantinib との併用効果について解析した。CPZ を至適血中濃度の範囲 0-10 $\mu$ M 添加し、5 日間培養を行った結果、いずれの細胞株も RTK の局在変化により濃度依存的な viability の低下を認めた。さらに CPZ と各 TKI との併用効果を検討した結果、相乗的な殺細胞効果をもたらすことを見出した。同様の検討を、Gefitinib 耐性株を用いて検討した結果、EGFR のゲートキーパー変異(T790M)を有する細胞株において、CPZ 併用により TKI 感受性が回復し、耐性を克服できる可能性が示唆された。

3)細胞内膜輸送(ICT)阻害薬の臨床応用に向けた取り組み

活性型変異 RTK を有する AML に対する CPZ の抗腫瘍効果について、他薬剤との併用効果、および CPZ 以外の ICT 阻害薬の抗白血病効果について検討を行った。AML の治療薬である Ara-C に CPZ あるいはコントロールとして生理食塩水を投与した場合の抗白血病効果について解析した(各々n=4)。コントロールでは治療開始後 4 週時点で全例が死亡したのに対して、CPZ 投与により骨髄での AML 細胞の割合が著明に

減少し、全例の生存が確認された。CPZ 投与後 10 週時点のマウス骨髄を用いて二次移植を行った結果、AML の発症を認めず、一次移植個体における AML 細胞の根絶が示唆された。また、chloroquine, dynasore, Pitstop を至適血中濃度の範囲 0-10 $\mu$ M 添加し 7 日間培養を行った結果、いずれの薬剤においても活性型変異 RTK を有する AML 細胞は RTK の局在変化により濃度依存的な viability の低下を認めた。さらに ICT 阻害薬とチロシンキナーゼとの併用効果を検討した結果、相乗的な殺細胞効果をもたらすことを見出した。

## 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 17 件)

Nakayama S, Matsumura I. ( 8 名中 8 番目)  
Adult T cell leukemia/lymphoma with different pathological features in each tumor site. *Ann Hematol.* 査読有 97(6); 2018:1095-1096. doi:10.1007/s00277-018-3272-2.

Matsumura I.  
[Management of cardiovascular complications in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors]. *Rinsho Ketsueki.* 査読有 59(1); 2018: 13-26. doi:10.11406/rinketsu.59.13.

Ishikawa J, Matsumura I. ( 14 名中 2 番目)  
Efficacy and safety of switching to nilotinib in patients with CML-CP in major molecular response to imatinib: results of a multicenter phase II trial (NILSw trial). *Int J Hematol.* 査読有 107(5);2018:535-540. doi:10.1007/s12185-018-2401-y.

Nakamae H, Matsumura I. ( 11 名中 7 番目)  
Nilotinib vs. imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: long-term follow-up of the Japanese subgroup of the randomized ENESTnd trial. *Int J Hematol.* 査読有 107(3);2018:327-336.doi: 10.1007/s12185-017

-2353-7.

Takahashi N, Matsumura I; Japan Adult Leukemia Study Group. ( 32 名中 10 番目) Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: the JALSG-STIM213 study. *Int J Hematol*. 査読有 107(2) ; 2018:185-193. doi:10.1007/s12185-017-2334-x.

Taniguchi Y, Tanaka H, Luis EJ, Sakai K, Kumode T, Sano K, Serizawa K, Rai S, Morita Y, Hanamoto H, Tsubaki K, Nishio K, Matsumura I.

Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 査読有 106(5) ; 2017:691-703. doi:10.1007/s12185-017-2302-5.

Togasaki E, Takeda J, Yoshida K, Shiozawa Y, Takeuchi M, Oshima M, Saraya A, Iwama A, Yokote K, Sakaida E, Hirase C, Takeshita A, Imai K, Okumura H, Morishita Y, Usui N, Takahashi N, Fujisawa S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyoi H, Ohnishi K, Ohtake S, Asou N, Kobayashi Y, Miyazaki Y, Miyano S, Ogawa S, Matsumura I, Nakaseko C, Naoe T.

Frequent somatic mutations in epigenetic regulators in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 査読有 287(4) ; 2017 :e559. doi: 10.1038/bcj.2017.36.

Tojo A, Matsumura I, ( 20 名中 12 番目) Ponatinib in Japanese patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia, a phase 1/2 study. *Int J Hematol*. 査読有 106(3); 2017:385-397. doi: 10.1007/s12185-017-2238-9.

Miyamura K, Matsumura I, ( 23 名中 7 番目) Switching to nilotinib in patients with chronic

myeloid leukemia in chronic phase with molecular suboptimal response to frontline imatinib: SENSOR final results and BIM polymorphism substudy. *Leuk Res*. 査読有 51;2016:11-18.

doi:10.1016/j.leukres.2016.09.009.

Yoshida C, Matsumura I, ( 9 名中 6 番目) Validation of a rapid one-step high sensitivity real-time quantitative PCR system for detecting major BCR-ABL1 mRNA on an International Scale. *Springerplus*. 査読有 5;2016:569. doi: 10.1186/s40064-016-2258-6.eCollection 2016.

Suzuki K, Matsumura I, ( 21 名中 14 番目) Lenalidomide and low-dose dexamethasone in Japanese patients with newly diagnosed multiple myeloma: A phase II study. *Cancer Sci*. 査読有 107(5);2016:653-8. doi:10.1111/cas.12916.

Sumiyoshi M, Masuda N, Tanuma N, Ogoh H, Imai E, Otsuka M, Hayakawa N, Ohno K, Matsui Y, Hara K, Gotoh R, Suzuki M, Rai S, Tanaka H, Matsumura I, Shima H, Watanabe T. Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality. *FEBS Lett*. 査読有 589(19 Pt B) ;2015: 2754-62. doi:10.1016/j.febslet.2015.07.050.

Sasano T, Matsumura I, ( 6 名中 4 番目) Two consecutive pregnancies in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria treated with anticoagulant therapy at different doses. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 査読有 27(1) ;2016:109-12.

doi: 10.1097/MBC.0000000000000386.

Nakamae H, Matsumura I, ( 10 名中 8 番目) A new diagnostic kit, ODK-1201, for the quantitation of low major BCR-ABL mRNA level in chronic myeloid leukemia: correlation of quantitation with major BCR-ABL mRNA kits. *Int J Hematol*. 査読有 102(3) ;

2015:304-11.doi: 10.1007/s12185-015-1826-9.  
Morita Y, Emoto M, Serizawa K, Rai S, Hirase C, Kanai Y, Ohyama Y, Shiga T, Tanaka H, Miyatake J, Tatsumi Y, Ashida T, Kimura M, Ito M, Matsumura I.

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. *Intern Med*. 査読有 54(11) ;2015:1393-6.doi:10.2169/internalmedicine.54.3770..

Hirata O, Matsumura I, ( 11 名中 5 番目 ) Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *J Clin Immunol*. 査読有 35(5) ; 2015: 512-6. doi: 10.1007/s10875-015-0165-1.

Kobayashi T, Kuroda J, Fuchida S, Kaneko H, Yagi H, Shibayama H, Tanaka H, Kosugi S, Uoshima N, Kobayashi M, Adachi Y, Ohta K, Ishii K, Uchiyama H, Matsuda M, Nakatani E, Tsudo M, Shimazaki C, Takaori-Kondo A, Nomura S, Matsumura I, Taniwaki M, Kanakura Y; KMF investigators.

Impact of early use of lenalidomide and low-dose dexamethasone on clinical outcomes in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol*. 査読有 101(1) ; 2015 :37-45. doi: 10.1007/s12185-014-1696-6.

[学会発表] (計 6 件)

Serizawa K, Tanaka H, Fukui A, Fujiwara R, Sano K, Inoue H, Kumode T, Taniguchi Y, Morita Y, Espinoza L, Matsumura I  
Identification of a Patients-Derived CD34+ Myeloma Cell Population with Tumor-Propagating Capacity and Resistance to Anticancer Drugs

59th ASH Annual Meeting and Exposition 2017

Kumode T, Tanaka H, Fujiwara R, Sano K, Serizawa K, Taniguchi Y, Rai S, Matsumura I  
C-Type Lectin-Like Peceptor 2 Specifies A Functionally Distinct Subpopulation Of Megakaryocyte-Biased Long-Term Hematopoietic Stem Cells.

22nd Congress of EHA 2017

Taniguchi Y, Tanaka H, Kumode T, Rai S, Matsumura I

Procoagulant microparticle is a new surrogate biomarker for thrombotic events in patients with myeloproliferative neoplasms.

21st Congress of EHA 2016

Kumode T, Tanaka H, Rai S, Taniguchi Y, Matsumura I

Clec-2 Expression Is A New Marker For A Subset Of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells That Contributes To Inflammation-Induced Emergent Megakaryopoiesis

21st Congress of EHA 2016

Tanaka H, Rai S, Watanabe T, Kanakura Y, and Matsumura I

CALM plays a critical role for oncogenic activity of RTK mutants and would be a promising therapeutic target

The ISEH 44th Annual Scientific Meeting 2015

Rai S, Tanaka H, Watanabe T, Kanakura Y, Matsumura I

Target intracellular trafficking of FLT3-ITD and KIT D816V by Chlorpromazine shows promising preclinical activity against acute myeloid leukemia cells.

The ISEH 44th Annual Scientific Meeting 2015

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

松村 到 (MATSUMURA, Itaru)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号:00294083

(2)研究分担者

田中 宏和 (TANAKA, Hirokazu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 40360846

森田 泰慶 (MORITA, Yasuyoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 80411594

平瀬 主税 (HIRASE, Chikara)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 30548590

(平成 28 年 3 月 23 日削除)