

論文内容の要旨

【研究の目的】

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph-ALL) は、成人 ALL の約 20% を占める難治性の造血器腫瘍である。現在、慢性骨髄性白血病の第一選択薬であるメシル酸イマチニブ (IM, STI571) は、Ph-ALL に対してもある程度の有効性を示すが、薬剤耐性が早期に出現しその機序として Abl 遺伝子の ATP 結合部位の点突然変異が注目されている。その中でも T315I 変異を有する症例では、IM に非常に強い耐性を持ち、非常に難治性となる特徴を持つ。現在、T315I を有する Ph 陽性白血病の治療として IM と BCR/ABL の下流シグナルを阻害する種々の薬剤とを併用する方法が試みられている。今回、我々は Ph-ALL 患者から樹立した細胞株を用いて mTOR 阻害剤である Rapamycin (Rapa) の効果を検討した。

【方法】

我々は、Ph-ALL 患者から同意を得た後、骨髓単核球を採取し、10%血清を含む液体培地内で Double Ph-ALL 細胞株 SU-Ph2 を樹立することに成功したので、それを用いて IM を少量添加する培養系から IM 耐性細胞株 SU/SR を樹立し、その生物学的特性を解析した。SU/SR 細胞が T315I 変異を有することを確認した後、SU-Ph2 及び SU/SR に対し、Rapa 添加 24-72 時間後に MTS 法にて細胞増殖抑制率を測定し、DNA Laddering, Annexin 陽性細胞の比率の変化を検討した。またウェスタンブロッティング法を用い、mTOR シグナル経路に関与する分子のリン酸化レベルを検討した。さらに培地中アミノ酸含有量を変化させる系にて Jurkat 細胞に対する Rapa の感受性が変化することを MTS 法にて検討した。

【結果】

SU/SR は、IM に対し非常に強い耐性 (IC50 値 = 約 10 μM) を示し、シーケンス法により T315I を有することが判明した。また SU/SR は、SU-Ph2 と比較し他の耐性機構とされる BCR/ABL 蛋白、P 糖蛋白の過剰発現は見られなかった。Ph-ALL 細胞株 SU-Ph2 及び SU/SR の細胞増殖は、臨床応用が十分に可能な比較的低濃度の Rapa により濃度及び時間依存的に抑制され、また Apoptosis が誘導されることを確認した。また SU-Ph2 及び SU/SR においては、mTOR シグナル経路のエフェクター分子である 4E-BP1 分子のリン酸化レベルが他の細胞株に比べ有意に高いことを確認した。さらに Jurkat 細胞では、培地内アミノ酸含有濃度に応じて Rapa の感受性が増加した。

【考察】

本論により Rapa は、IM 感受性及び T315I 変異を有したために IM 耐性となった Ph-ALL 細胞株において、比較的低濃度で Apoptosis を誘導することができると考えられ、今後臨床においても有効な治療選択肢の一つになることを示唆することができた。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2008年9月8日 公表予定	出版物名 Leukemia Research
	公 表 内 容	2008年9月8日 発行予定
	全 文	

氏 名 平 瀬 主 税  
 学位の種類 博 士 (医学)  
 学位記番号 医 第 1 0 0 8 号  
 学位授与の日付 平 成 2 1 年 3 月 2 1 日  
 学位授与の要件 学位規程第4条第1項該当  
 学位論文題目 Hypersensitivity of Ph-positive lymphoid cell lines to rapamycin : Possible clinical application of mTOR inhibitor  
 (フィラデルフィア染色体陽性リンパ性白血病細胞株を用いたラパマイシン高感受性の検討 : mTOR 阻害剤の臨床応用への可能性)

論文審査委員 (主 査) 教 授 金 丸 昭 久  
 (副主査) 教 授 中 川 和 彦  
 (副主査) 教 授 西 尾 和 人

論文審査結果の要旨

【背景】

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph-ALL) は、成人 ALL の約 20% を占める難治性造血器腫瘍である。9 番染色体と 22 番染色体の相互転座によって形成される bcr/abl 融合遺伝子が形成される結果、ABL キナーゼの恒常的活性化により病態が形成される。現在、慢性骨髄性白血病 (CML) に使用される選択的 ABL キナーゼ阻害剤であるメシル酸イマチニブ (以下 IM) は、Ph-ALL に対してもある程度の有効性を示すが、比較的短期間で薬剤耐性が出てしまうため、単剤による治療は難しいと考えられている。イマチニブに対する薬剤耐性機序として Abl 遺伝子の ATP 結合部位の点突然変異が注目されている。その中でも T315I 変異を有する症例では、IM に非常に強い耐性を持ち、非常に難治性となる特徴を持つ。

現在、T315I 変異を有する Ph 陽性白血病の治療として、IM と BCR/ABL 経路の下流シグナルを阻害する種々の薬剤とを併用する方法が試みられている。今回、我々は Ph-ALL 患者から樹立した細胞株を用いて BCR/ABL シグナル経路の下流に位置する分子である mTOR に対する阻害剤であるラパマイシン (以下 Rapa) の効果を検討した。

【方法】

①申請者は、Ph-ALL 患者から同意を取得した後、骨髄単核球を採取し、10% 血清を含む RPMI1640 培地内で培養を開始し、Double Ph-ALL 細胞株「SU-Ph2」を樹立することに成功した。②次に SU-Ph2 を用いて培養系に IM を少量添加

する方法で IM 耐性細胞株「SU/SR」を樹立し、その生物学的特性を解析した。③RT-PCR 法により増幅された ABL キナーゼ領域の解析 (シーケンス法) において SU/SR 細胞が T315I 変異を有することを確認した。

次に BCR-ABL シグナル経路の下流に位置する PI3K/Akt/mTOR シグナル経路に着目し、④ウェスタンブロットティング法を用い、各種造血器腫瘍細胞株における mTOR シグナル経路に関与する分子のリン酸化レベルを検討した。⑤その後の SU-Ph2, SU/SR に対して代表的 mTOR 阻害剤である Rapa の添加 24-72 時間後に増殖抑制効果を MTS アッセイ法にて検討した。⑥また Rapa 投与により SU-Ph2, SU/SR におこる変化を検討するために DNA ラダー法と Annexin V 陽性率にてアポトーシスアッセイを行った。⑦さらに培地中アミノ酸含有量を変化させることで Jurkat 細胞に対する Rapa の感受性が変化することを MTS 法にて検討した。

【結果】

SU/SR は、IM に対し非常に強い耐性 (IC50 値=約 10  $\mu$ M) を示し、シーケンス法により T315I を有することが判明した。また SU/SR は、その他の耐性機序とされる BCR/ABL 腫瘍蛋白、P 糖蛋白の過剰発現は見られなかった。

また種々の造血器腫瘍細胞株において BCR/ABL シグナル経路にも位置する mTOR シグナルのリン酸化レベルを検討したところ、Ph 陽性白血病において mTOR の高いリン酸化を確認し、SU-Ph2, SU/SR はいずれも非常に高いレベルで mTOR がリン酸化されていることを確認した。

また SU-Ph2, SU/SR の細胞増殖は、比較的低濃度 ( $10^{-9}$ M) の Rapa により濃度および時間依存性に抑制され、また同濃度において容易にアポトーシスが誘導されることを確認した。また Rapa 投与により SU-Ph2, SU/SR 各々の細胞株において mTOR シグナル経路のエフェクター分子である p70-S6kinase 分子のリン酸化レベルがダウンレギュレーションしていることを確認した。

さらに Jurkat 細胞を用いた実験では、培地内のロイシン・アルギニン濃度を増加させることで Rapa による細胞増殖抑制効果が増加することを示した。

#### 【考察】

現在、T315I や E255K といった ABL キナーゼ領域における一部の遺伝子変異は、イマチニブに対する非常に強い薬剤耐性を獲得させることが明らかになってきており、それらを克服するための有効な治療選択肢は十分ではないのが現状である。これらの変異は、イマチニブ投与により新たに獲得されたものであるという報告や治療前から存在していたものが Selection されて増殖してきたものであるという報告など様々な考察がなされている。しかし、日本成人白血病研究グループ (JALSG) による Ph+ALL202 の中間解析結果においてもイマチニブの有効性は明らかであり、今後も Ph-ALL の診療において重要な役割を演じることは容易に予想される。今後、Ph-ALL に対するイマチニブの使用頻度が増すほど薬剤耐性、中でも T315I の克服という問題は重大なテーマとなる。本論文では、患者骨髓検体を使用し、それにイマチニブを添加して培養することで従来の遺伝子導入などの技術を用いずに T315I を有する細胞株を樹立する

ことが可能であった。これまでの報告通り、T315I を有するイマチニブ耐性細胞株は親株の 100 倍以上の IC50 値を持つ非常に強いイマチニブ耐性を示した。そこで本論文では、新たな分子標的治療による T315I の克服のために BCR/ABL の下流シグナルに着目し、mTOR シグナル経路が Ph 陽性白血病において非常に活性化していることから、その阻害剤ラパマイシンによる増殖抑制効果が予想され、非常に低濃度のラパマイシンにより容易にアポトーシスすることが示された。またラパマイシンは、イマチニブと交叉耐性を示さなかった。今回は、細胞株を用いた In vitro の系での報告であるが、現在種々の白血病モデルマウスが存在し、今後 In vivo での効果および有害事象が明らかにされてゆくと、ラパマイシンを含む mTOR 阻害剤は、単剤あるいはイマチニブとの併用により臨床応用へと展開する可能性のある薬剤であり、今後の Ph-ALL の診療に非常に有益であると考えられた。