

KIT 遺伝子異常が白血病におよぼす 影響とその分子標的治療法の確立

(課題番号 17590992)

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月 30 日

研究代表者 西井一浩

(三重大学医学部附属病院助手)

研究組織

研究代表者： 西井一浩
(三重大学医学部附属病院 助手)

交付決定額 (分配額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2,000	0	2,000
平成 16 年度	1,300	0	1,300
計	3,300	0	3,300

研究の背景と目的

近年の医学進歩により、一部の白血病は完全治癒が期待できうる悪性疾患となりつつあるが、未だ難治性の白血病も多く存在している。細胞学的大約び遺伝子学的検索により白血病細胞の特性は多様性に富んでおり、このことが発癌機序および治療反応性の差異につながっている可能性を示唆する所見が散在している。

長らく白血病の分類は細胞化学的手法によりなされてきた。しかし、最近の分子生物学的検索により染色体異常により白血病細胞の特性が大きく異なっていることが明らかとなり、それに基づいた治療法の選択が推奨されている。しかし、最近の報告では染色体異常以外の遺伝子異常が白血病細胞やその病態に及ぼす影響が明らかとなってきたおり、今後、詳細な遺伝子異常の検索とそれらが癌化機序・臨床病態に及ぼす影響の検討がさらに進み、テーラーメイド医療に応用されていくものと思われる。

細胞の増殖・分化機構は厳密に制御されており、その制御因子として液性因子 (cytokine) からの刺激伝達系は非常に重要である。stem cell factor (SCF)は正常造血幹細胞の分化・増

殖に必修な因子であり、その刺激は受容体である KIT のリン酸化を介しておこなわれる。一方、多くの白血病細胞 [特に急性骨髄性白血病 ; acute myeloid leukemia (AML)] はその細胞表面に KIT を発現しており、KIT を介した刺激伝達系が白血病細胞においても重要な意義があると推測されうる。例えば造血器腫瘍のひとつである mastcytoma では KIT 遺伝子の異常による恒常的な KIT kinase の活性化が見られ、このことが細胞の増殖さらに発癌に関与している可能性が示唆されている。

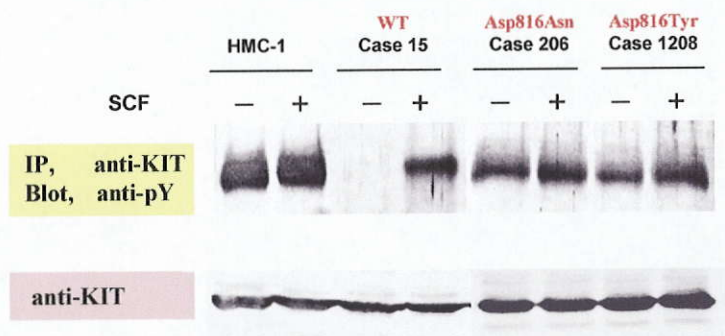
これらのことを踏まえて、急性白血病細胞における KIT 遺伝子異常を検索することは発癌機構についての新たな知見を得る可能性があるのみならず、遺伝子異常部位を直接抑制する分子標的療法の研究に寄与できるものと思われる。

研究成果

1. 急性骨髄性白血病 (AML) 患者 (225 例; M0 6, M1 37, M2 95, M3 21, M4 40, M5 22, M6 3, M7 1 例) より骨髄中の白血病細胞を分離後、RNA を抽出し KIT 遺伝子発現とその塩基配列を検索した。KIT 遺伝子は kinase domain である exon 11 (juxtamembrane domain: JM)、exon 17 (intracellular kinase domain: TK) および ligand binding domain (extracellular membrane domain: EM) である exon 8 に関して検討した。すべての症例において JM 部位の遺伝子異常はみられなかったが、1 例で EM domain の insertion and deletion を *inv(16)*AML でみられた。また 10 例で TK 部位に異常を認めた。この異常は全例が Asp816 の point mutation であるとともに、異常の見られた白血病細胞 9 例中 8 例は染色体異常である *t(8;21)(q22;q22)* をもつものであり、のこりの 1 例は *inv(16)* であった。このことは骨髄性白血病における KIT 遺伝子異常は染色体異常である *t(8;21)* および *inv(16)* であり core binding factor leukemia と深い関連があることが推測された。

2. 免疫沈降法を用いた Western Blot 法での検討では KIT 遺伝子異常をもつ細胞では SCF 非存在下において KIT の tyrosine kinase が恒常的にリン酸化されていた。このことは Asp816 mutation は active mutation であると考えられた。

Phosphorylation status of KIT mutants



HMC-1: human mast cell line with *KIT*^{V560D} mutation

SCF: stem cell factor (KIT-ligand)

IP: immunoprecipitation

pY: phosphotyrosine

3. ほとんどの KIT 遺伝子異常は t(8;21)AML にのみ見られたことから、この異常を持つ t(8;21)AML (9例) の細胞学的特性につき異常を持たない t(8;21)AML (37例) と比較検討した。

① 両群間の発症時年齢、性別に差異は見られなかったが、遺伝子異常を持つ AML では著明に白血球数の増加がみられた。初回の寛解導入療法後の寛解率は遺伝子異常を持つ例において低い傾向があったが有意差はなかった。

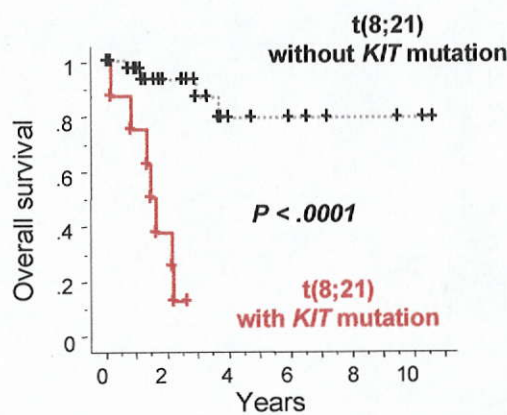
**Clinical features of t(8;21)AML cases with
KIT mutation at Asp816**

	+ mutation	- mutation
Cases	9	37
WBC (median)	26.5 x 10 ⁹ /L *	7.5 x 10 ⁹ /L *
(range)	6.3 - 58.9 x 10 ⁹ /L	2.9 - 59.0 x 10 ⁹ /L
Age (median)	53	45
(range)	42 - 62	16 - 66
Sex (M/F)	5:4	21:16
CR rate (%)	87.5	97.2

*, P = 0.002

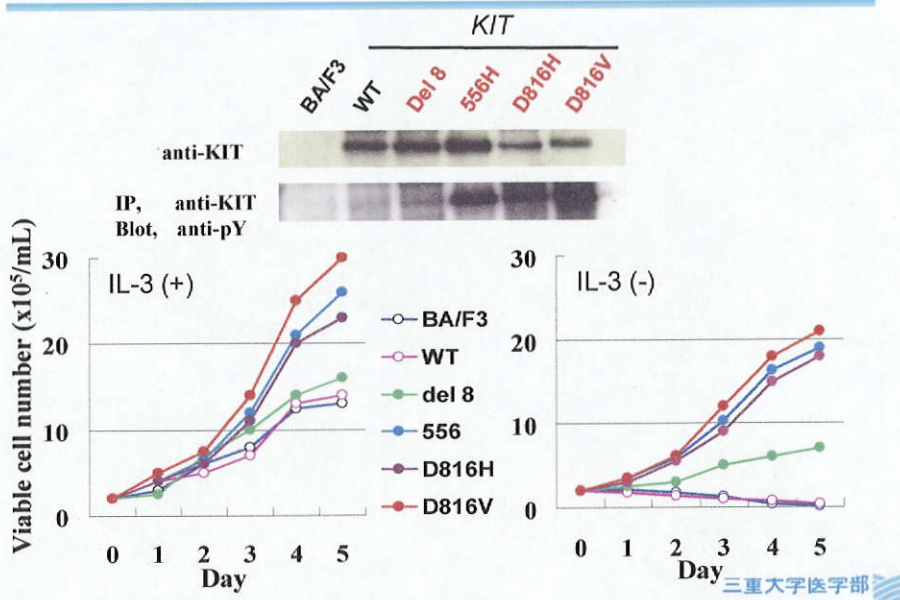
- ② 治療関連における検討において t(8;21)AML は t(8;21)を持たない AML に比べ生存率は良好であったが、さらに KIT 遺伝子異常をもつ t(8;21)AML 例では著明に不良であった($P < .0001$)。

Overall survival of t(8;21)AML with KIT mutation at Asp816



4. KIT 遺伝子の wild type および KIT 遺伝子異常である deletion insertion (del 8), 556 mutation, D816H, D816V を IL-3 依存性白血病細胞 (Ba/F3) にレトロウイルスを用いて遺伝子導入したところ、異常をもつ細胞は IL-3 非依存性に増殖するのみならず、著明な増殖能を獲得した。

**IL-3-dependent cell line, BA/F3,
with *KIT* mutant**



以上より、急性白血病における KIT 遺伝子異常は CBF leukemia 特に t(8;21)AML に特異的な異常であり、この種の白血病発症と深い関連がある可能性が示唆された。また、遺伝子異常を持つ t(8;21)AML は持たない t(8;21)AML と比べ明らかに細胞学的特性が異なっており、独立した疾患である可能性が推測された。また、この細胞遺伝子学的差異を基に予後、治療法を検討することが個々の治療成績を向上させるために重要であると考えられた。

研究発表：

I. 発表論文

1. Nishii K, Nanbu R, Lorenzo F 5th, Monma F, Kato K, Ryuu H, Katayama N: Expression of the JAK2 V617F mutation is not found in *de novo* AML and MDS but is detected in MDS-derived leukemia of megakaryoblastic nature. **Leukemia** 21; 1337-1338, 2007
2. Nishii K, Sakakura M, tsukada T, Hyuu R, Katayama N: Successful treatment of imatinib combined with less intensive chemotherapy (vincristine and dexamethasone) as induction therapy in a very elderly patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematol** 85; 273-274, 2007
3. Monma F, Nishii K, Shiga J, Sugahara H, Watanabe Y, Kawakami K, Hosokai N, Yamamori S, Shiku H, Katayama N: Detection of CBFβ/MYH11 fusion gene in acute myeloid leukemia (AML) without inv(16); incidence in 218 Japanese AML cases. **Leuk Res** 31; 471-476, 2007
4. Nakase K, Kita K, Miwa H, Nishii K, Shikami M, Tanaka I, Tsumi H, Ueda T, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Shiku H, Katayama N: Clinical and prognostic significance of cytokine receptor expression in adult acute lymphoblastic leukemia: interleukin-2 receptor α-chain predicts a poor prognosis. **Leukemia** 21; 326-332, 2007
5. Hoshino N, Nakase K, Tawara I, Kageyama S, Ohishi K, Nishii K, Sugiura Y, Shiku H, Katayama N: Early tumor regression following severe lung injury after allogeneic stem cell transplantation in a patient with renal cell carcinoma. **Int Med** 46; 291-293, 2007
6. Sugimoto Y, Katayama N, Masuya M, Miyata E, Ueno M, Ohishi K, Nishii K, Takakura N, Shiku H: Differential cell division history between neutrophils and macrophages in their development from granulocyte-macrophage progenitors. **Br J Haematol** 135; 725-731, 2006
7. Lorenzo F 5th, Nishii K, Monma F, Kuwagata S, Usui E, Shiku H: Mutational analysis of the *KIT* gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and

- MDS-derived leukemia. **Leuk Res** 30; 1235-1239, **2006**.
8. Sakakura M, Nishii K, Usui E, Monma F, Tsukada T, Shiku H: Bilateral osteonecrosis of the head of the femur in a young patient with acute promyelocytic leukemia during treatment with retinoic acid. **Int J Hematol** 206: 252-253, **2006**.
 9. Fujieda A, Nishii K, Tamaru T, Otsuki S, Kobayasi K, Monma F, Ohishi K, Nakase K, Katayama N, Shiku H: Granulocytic sarcoma of mesentery in acute myeloid leukemia with *CBFB/MYH11* fusion gene but not inv(16) chromosome: case report and review of literature. **Leuk Res** 30; 1053-1057, **2006**.
 10. Monma F, Nishii K, Ezuki S, Miyazaki T, Yamamori S, Usui E, Sugimoto Y, Lorenzo F 5th, Katayama N, Shiku H: Molecular and phenotypic analysis of Philadelphia chromosome-positive bilineage leukemia: possibility of a lineage switch from T-lymphoid leukemic progenitor to myeloid cells. **Cancer Genet Cytogen** 164: 118-121, **2006**
 11. Monma F, Nishii K, Lorenzo F 5th, Usui E, Ueda Y, Katayama N, Watanabe Y, Kawakami k, Oka K, Mitani H, Sekine T, Tamaki S, Mizutani M, Yagasaki F, Doki N, Miyawaki S, Shiku H: Molecular analysis of *PDGFR α/β* genes in core binding factor leukemia with eosinophilia. **Eur J Haematol** 76: 18-22, **2006**.
 12. Shikami M, Miwa H, Nishii K, Kyo T, Tanaka I, Shiku H, Kita K, Nitta M: Low p53 expression of acute myelocytic leukemia cells with t(8;21) chromosome abnormality: Association with low p14(ARF) expression. **Leuk Res** 30: 379-383, **2006**.
 13. Nakase K, Yamamoto Y, Morita K, Yamaguchi T, Nishii K, Shiku H: Haunting appearance of bcr/abl gene products in a patient with therapy related leukemia. **Leuk Res** 30: 106-108, **2006**.
 14. Hoshino N, Katayama N, Shibasaki T, Ohishi K, Nishioka J, Masuya M, Miyahara Y, Hayashida M, Shimomura D, Kato T, Nakatani K, Nishii K, Kuribayashi K, Nobori T, Shiku H: A novel role for Notch ligand {delta}-1 as

a regulator of human langerhans cell development from blood monocytes.
J Leukoc Biol 78: 921-929, 2005.

15. Ikai T, Miwa H, Shikami M, Hiramatsu A, Tajima E, Yamamoto H, Imai N, Hattori K, Nishii K, Miura K, Satoh A, Itoh M, Imamura A, Mihara H, Katoh Y, Nitta M: Placenta growth factor stimulate the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways. **Eur J Haematol** 75; 273-279, 2005.
16. Fujieda A, Katayama N, Ohishi K, Yamamura K, Shibasaki T, Sugimoto Y, Miyata E, Nishi K, Masuya M, Ueda H, Nakajima H, Shiku H: A putative role for histone deacetylase in the differentiation of human erythroid cells. **Int J Oncol** 27; 743-8, 2005
17. Miyashita H, Katayama N, Fujieda A, Shibasaki T, Yamamura K, Sugimoto Y, Miyata E, Ohishi K, Nishii K, Masuya M, Shiku H: IL-4 and IL-10 synergistically inhibit survival of human blood monocytes supported by GM-CSF. **Int J Oncol** 26; 731-735, 2005.

II. 学会発表

1. 西井一浩：造血器腫瘍における KIT 遺伝子変異とその意義。第 3 回 日本プロテインフォスファターゼ研究会 2007.3 (三重) (口演)
2. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized clinical trial of induction therapy comparing intensified daunorubicin with idarubicine in patients with previously untreated de novo acute myeloid leukemia (JALSG AML201 study) ASH 48 annual meeting, Orland (Florida) (poster) 2006, 12, 9-12.
3. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R: Postremission therapy in adult acute myeloid leukemia (AML): A randomized comparison between high dose Ara-C therapy and conventional consolidation therapy (JALSG AML 201 Study) ASH 48 annual meeting, Orland (Florida) (poster) 2006, 12, 9-12.
4. 門間文彦、西井一浩、臼井英治、片山直之：多発性骨髄腫における cancer testis 抗原 NY-ESO-1 発現とその意義。第 31 回日本骨髄腫研究会総会 2006.11 (群馬) (ワークショップ：口演)
5. 杉本由香、西井一浩、藤枝敦史、他：CBF leukemia に合併した髄外腫瘍の特徴 —t(8;21)AML と inv(16)AML との比較検討—。第 68 回日本血液学会総会 2006. 10 (福岡) (ワークショップ：口演)
6. 門間文彦、西井一浩、Lorenzo Felipe、他：造血器腫瘍における KIT 遺伝子異常とその意義。第 68 回日本血液学会総会 2006. 10 (福岡) (ワークショップ：口演)
7. 西井一浩、菅原 悠、門間文彦、他：顆粒球系細胞における異常分化抗原発現様式による MDS および MDS/AML の診断とその意義。第 68 回日本血液学会総会 2006. 10 (福岡) (ポスター)

8. 坂倉美穂、西井一浩、門間文彦、他：CD45、CD16、CD13 発現検索が有用であった MDS の一例。第 68 回日本血液学会総会 2006. 10 (福岡) (ポスター)
9. Lorenzo F, Nishii K, Monma F, et al.: Distinct characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia with active KIT mutation. 47th ASH meeting 2005.12. (Atlanta, USA) (poster)
10. 西井一浩、他：inv(16)を持たない CBFβ/MYH11 キメラ遺伝子発現を認める急性骨髄性白血病の特性。第 67 回日本血液学会 2005.9. (横浜) (ワークショップ：口演)
11. フィッリップ ロレンゾ、西井一浩、他：MDS および AML における KIT 遺伝子異常とその意義。第 67 回日本血液学会 2005.9. (横浜) (口演)
12. 門間文彦 西井一浩 他：Ph 陽性 bilineage leukemia (T/M) における lineage switch 機構に関する分子学的検討。第 67 回日本血液学会 2005.9. (横浜) (口演)
13. 白井英治、西井一浩、他：多発性骨髄腫における Cancer Testis 抗原 NY-ESO-1 発現とその意義。第 67 回日本血液学会 2005.9. (横浜) (ポスター)
14. 西井一浩：c-kit 遺伝子異常をもつ t(8;21)AML の特性。第 6 回白血病シンポジウム 2005.2.21 (東京) 口演 (シンポジウム)

III. 出版物

1. 小林 透、西井一浩：造血器腫瘍—急性骨髄性白血病治療の新展開—。日本臨床 65; 607-610, 2007
2. 門間文彦、西井一浩：白血病における受容型チロシンキナーゼ異常の意義。血液・腫瘍科 53; 234-238, 2006