

慢性骨髄性白血病 (CML) は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座によって生じるフィラデルフィア染色体を成因とする造血器腫瘍であり、本染色体上に形成された融合遺伝子の転写産物である BCR-ABL が恒常的に活性化することで発症する。CML 治療の第一選択薬である imatinib mesylate (以下 imatinib) は BCR-ABL のリン酸化酵素活性を阻害する分子標的薬であり、高い有効性が知られている。一方、一部の患者において初期抵抗や抵抗性獲得が認められることが明らかにされている。これまでに BCR-ABL 依存性、非依存性の imatinib 抵抗性獲得機構が提唱されているが、現在既知の抵抗性機序では説明が出来ない症例の存在が示唆されており、抵抗性機序の全容解明が緊要課題となっている。そこで本研究では、薬物動態学及び分子薬理学に基づいた imatinib 抵抗性獲得機序の究明を行った。以下に、本研究で得られた知見について要約する。

1. 薬物トランスポータ発現・機能変動による標的細胞内 imatinib 濃度への影響

慢性期 CML 患者における白血球中 imatinib 濃度と治療効果、血中濃度、薬物トランスポータの mRNA 発現量と遺伝多型との関連を精査した。慢性期の患者において imatinib の血中濃度と白血球中濃度に相関関係が認められず、SLCO1B3 の 334TT 群では輸送活性が低下すると考えられる TG/GG 群と比較し細胞内 imatinib 濃度が有意に高かった。本結果から、白血球細胞への取り込み過程に薬物トランスポータが制御因子として関与することが判明した。次に imatinib 抵抗性患者における細胞内 imatinib 濃度と薬物トランスポータの関連について精査した。imatinib 抵抗性患者では白血球における ABCB1 の過剰発現及び機能亢進、SLC22A1 の発現減少が認められ、それに伴う白血球細胞内 imatinib 濃度の低下が観察された。imatinib 抵抗性獲得機序における薬物トランスポータの寄与を詳細に明らかにするため、培養細胞である K562 細胞を用いた検討を行った。Imatinib 長期暴露によって樹立した抵抗性細胞において P-gp の発現上昇及び機能亢進が認められ、細胞内濃度 imatinib 濃度が低下していた。P-gp 阻害剤である CyA の併用により imatinib の細胞内蓄積は感受性細胞と同程度まで上昇し、imatinib に対する感受性の回復が一部確認された。一方、抵抗性細胞における SLC22A1 の発現減少は認められなかったものの、SLC22A1 阻害剤の併用により細胞内 imatinib 濃度及び imatinib に対する感受性が低下したことから、SLC22A1 発現に変動が生じた場合は imatinib 感受性に影響し得ると推察された。以上の結果より、SLCO1B3 334T>G の遺伝多型により白血球 imatinib 濃度が変動することを突き止めた。また、P-gp の機能亢進、SLC22A1 の発現減少による細胞内 imatinib 濃度の低下が抵抗性獲得の一端を担っている可能性を提示した。

2. BCR-ABL 非依存的な ERK1/2 の異常活性化による imatinib 抵抗性獲得

第 3 章において、P-gp 阻害剤により preK562/R 細胞の imatinib 抵抗性は一部回復することが観察されたが、K562/W 細胞と比較して感受性の完全な回復には至らなかったため、他の要因・機序が imatinib 抵抗性獲得に関与していると考えられた。この抵抗性機序を明らかにするため、preK562/R 細胞からクローン細胞を単離し (K562/R)、詳細な検討を行った。K562/R 細胞において既知の imatinib 抵抗性獲得機構である BCR-ABL の遺伝子点変異及び遺伝子増幅、KRAS の遺伝

子点変異、LYN の過剰発現、細胞内 imatinib 濃度の低下はいずれも認められなかった。K562/R 細胞において imatinib 及び siRNA による BCR-ABL のノックダウンによって BCR-ABL は抑制されたものの、K562/W 細胞と異なり ERK1/2 のリン酸化は抑制されなかった。K562/R 細胞に ERK1/2 阻害剤 U0126 を併用すると ERK1/2 のリン酸化抑制に伴い imatinib 感受性が回復した。以上の結果から、K562/R 細胞において BCR-ABL 非依存的な ERK1/2 の異常活性化が imatinib 抵抗性獲得に関与することを初めて見出した。

3. imatinib 抵抗性機序解明のための transcriptome、proteome 及び phosphoproteome 解析

Imatinib 抵抗性獲得に重要な分子群を同定することを目的に遺伝子及びタンパク質発現量及びタンパク質リン酸化の比較解析を行った。その結果、heterotrimeric G protein family や CD44 シグナリングに属する遺伝子が抵抗性細胞における BCR-ABL 非依存的な ERK1/2 の活性化に関与することが示唆された。さらに抵抗性細胞ではさらにストレス応答因子の上昇、アポトーシス関連遺伝子の減少が観察された。また、抵抗性細胞において、imatinib 処理による HSP90 β のリン酸化が行われず、apoptosome が形成されないことが抵抗性獲得に一部関与する可能性を見出した。transcriptome、proteome 及び phosphoproteome 解析の結果を融合することで抵抗性細胞に特異的なシグナル経路として SET protein、PP2A、hnRNPK を介したシグナルを同定した。以上のことから、CD44、PP2A 及び HSP90 β のリン酸化等が imatinib 抵抗性克服治療の新たな標的因子として有用である可能性が示唆された。

以上、CML 患者における白血球中 imatinib 濃度と薬物トランスポータとの関連について比較解析した結果、SLCO1B3 334T>G の遺伝多型が細胞内濃度に影響することを明らかにするとともに、imatinib 抵抗性獲得患者において P-gp、SLC22A1 の発現変動による細胞内 imatinib 濃度の低下が imatinib 抵抗性獲得に一部関与することを示した。また BCR-ABL に依存しない抵抗性機序の一つとして ERK1/2 の異常な活性化が関与することを見出した。さらに transcriptome、proteome 及び phosphoproteome 解析の結果、抵抗性細胞において、heterotrimeric G protein family や CD44 の過剰発現による ERK1/2 の異常活性化誘導、HSP90 β や SET protein-PP2A-hnRNPK を介したアポトーシス誘導の抑制等の細胞内イベントが行われることで imatinib 抵抗性を獲得していることが判明した。

がんの治療薬として分子標的薬の有用性が認識され、現在様々ながん種において分子標的薬が探索・開発されている。今後、それぞれの分子標的薬に対する抵抗性獲得が生じ、治療の妨げになることが想定されることから、分子標的薬に対する抵抗性機序を早期に解明することが重要となる。本研究で用いた薬物動態学的検討及びオミクスの手法に基づく分子薬理的な検討は imatinib 抵抗性機序の解明だけでなく他の分子標的薬にも応用可能な汎用性に優れた手法であることを確認した。更に、この手法を応用し患者個々の抵抗性獲得関連因子を簡便に同定するシステムを構築することが出来れば、実地医療において、抵抗性獲得の機序が不明の患者に対し、個々の患者にあった抵抗性克服治療方針の決定が可能となると考えられる。本研究で得られた知見は、imatinib 抵抗性獲得機序究明のための有用な基礎的情報になるとともに、分子標的薬抵抗性獲得患者における抵抗性機序の解明並びに個別化医療実現の一助になるものと考えられる。