

課題番号	LS125
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	急性骨髄性白血病の再発解明と幹細胞を標的とした治療確立へのトランスレーション
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター ヒト疾患モデル研究グループ グループディレクター・主任研究員
氏名	石川 文彦

1. 当該年度の研究目的

あたらしいヒト化マウスの開発として、c-Kit リガンド SCF を発現する免疫不全マウスとして、昨年度に解析を終えた膜型に引き続き、遊離型 SCF を発現するマウスを作製し、造血幹細胞移植後、ヒトミエロイド系細胞分化を評価する。HCK を標的とした低分子化合物開発について、正常造血に対する抑制を正常な免疫系ヒト化マウスで解析するとともに、FLT3-ITD 変異を持つ白血病幹細胞に注力して、RK-20449 の治療効果を in vitro, in vivo で進める。WT1 に注目した免疫細胞治療の評価として、WT1 特異的とされる T 細胞受容体をヒト造血幹細胞レベルで遺伝子導入し、ヒト化マウスの体内での特異的 T 細胞分化・成熟を評価するとともに、その白血病細胞への殺細胞効果を検証する。

2. 研究の実施状況

ヒト c-Kit ligand (SCF) の variant のうち、exon6 が欠損しない variant(SCF248)は、膜表面に発現した後、cleave され、遊離型となって骨髄中に分泌される。この遊離型ヒト SCF を発現させたマウス(hSCF248 KI NSG)を作製し、臍帯血由来造血幹細胞を新生仔期に移植した。従来の NSG マウスと比較して、ヒト造血細胞の生着率が、特に骨髄で有意に高いことが確認された。また、膜型 SCF を発現させた hSCF220 TG NSG マウスでは、マスト細胞の分化が著明に亢進したものの、hSCF 248 KI NSG マウスでは、ヒトマスト細胞の分化・成熟は増加しなかった。本マウスにおいても、NSG マウスより改善されたヒトミエロイド系細胞の分化は、好中球の分化・成熟によるものと考えられた。

HCK 阻害活性を持つ RK-20449 については、今年度前半で論文発表に至った(Science Translational Medicine, 2013)。特に、予後不良な FLT3-ITD 変異を持つ白血病幹細胞に対する効果について、症例数を増して、検討した。In vitro では、再現性をもって、FLT3-ITD 変異を持つ白血病幹細胞に対して、全体の細胞数ならびに細胞の viability を減少させ、cytostatic だけでなく、cytotoxic な作用があることを見いだした。RK-20449 の誘導体8種についても、in vitro の評価を中心に実施し、どの症例でどの化合物が最も有効であるかについて決定することができた。白血病ヒト化マウスを用いた in vivo では、短期間・長期間、それぞれの治療実験で、再現性をもって、RK-20449 によるヒト白血病細胞の減少を確認できた。正常造血においては、成熟したミエロイド系細胞の一部、proB 細胞が減少するものの、重篤な骨髄抑制は来さないことが確認された。

WT1 特異的 T 細胞受容体遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて、正常造血幹細胞に導入し、4ヶ月

様式19 別紙1

以上の観察期間をもって、ヒト T 細胞の分化・成熟を評価した。絶対数は極めて多いと言えないものの、WT1 特異性を tetramer アッセイにて確認し、さらに、特異的と考えられる CD8+ T 細胞は、in vitro で WT1 の抗原刺激によって効果的な増幅を認めた。最終的に、ヒト白血病細胞を in vitro で認識し、IFN γ などサイトカイン産生を行うこと、また、細胞傷害活性を有すること、これらの機能が HLA の発現を阻害する抗体の使用によって、顕著に抑制されることが確認できた。このことから、造血幹細胞レベルでの、白血病特異的 T 細胞遺伝子の導入、生体内での特異的 T 細胞の誘導が検証できたと言える。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <p>1. Saito Y, Yuki H, Kuratani M, Hashizume Y, Takagi S, Honma T, Tanaka A, Shirouzu M, Mikuni J, Handa N, Ogahara I, Sone A, Najima Y, Tomabechei Y, Wakiyama M, Uchida N, Tomizawa-Murasawa M, Kaneko A, Tanaka S, Suzuki N, Kajita H, Aoki Y, Ohara O, Shultz LD, Fukami T, Goto T, Taniguchi S, Yokoyama S, <u>Ishikawa F.</u> A Pyrrolo-Pyrimidine Derivative Targets Human Primary AML Stem Cells in Vivo. Science Translational Medicine. 5:181ra52 1-15 (2013)</p> <p>2. <u>Ishikawa F.</u> Modeling normal and malignant human hematopoiesis in vivo through newborn NSG xenotransplantation. Int J Hematol. 98(6):634-40. 2013 Dec</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表</p> <p>計 5 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件</p> <p>1. 第 42 回日本免疫学会 <ul style="list-style-type: none"> ・演題: Humanized mouse ・発表者: 石川文彦 ・会期: 平成 25 年 12 月 11 日～13 日 ・会場: 幕張メッセ ・主催機関: 日本免疫学会 </p> <p>2. The 4th International Workshop for Humanized Mouse <ul style="list-style-type: none"> ・演題: Developing Therapeutic Strategies Targeting AML Stem Cells ・発表者: 石川文彦 ・会期: 平成 25 年 10 月 30 日～11 月 2 日 ・会場: Seoul ・主催機関: IWHM </p> <p>3. BMT Ground Rounds <ul style="list-style-type: none"> ・演題: Creating Therapeutic Strategies Targeting AML stem cells ・発表者: 石川文彦 ・会期: 平成 25 年 6 月 27 日 ・会場: Harvard, Dana Farber Cancer Institute ・主催機関: DFCI, Dr. Anthony Letai </p> <p>4. International Workshop on Stem Cells in Cancer</p>

様式19 別紙1

	<ul style="list-style-type: none"> ・演題: Targeting Chemotherapy-resistant AML stem cells ・発表者: 石川文彦 ・会期: 平成 25 年 4 月 19 日 ・会場: Shanghai Jiao-Tong University ・主催機関: Shanghai Jiao-Tong University, Dr. Dengli Hong <p>一般向け 計 1 件</p> <p>IMS センターシンポジウム</p> <ul style="list-style-type: none"> ・演題: ヒト化マウスを用いた白血病の理解と克服 ・発表者: 石川文彦 ・実施日: 平成 26 年 2 月 28 日 ・会場: ステーションカンファレンス東京 ・主催機関: 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター
<p>図書</p> <p>計 1 件</p>	<p>1. 石川文彦、最新医学「あたらしい研究手法: ヒト化マウス」、最新医学社、2013 年、15 ページ</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>独立行政法人理化学研究所プレスリリース「白血病再発の主要原因「白血病幹細胞」を標的とした低分子化合物を同定」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・60 秒でわかるプレスリリース : http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130418_1/digest/ ・報道発表資料: http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130418_1/ ・YouTube: https://www.youtube.com/watch?v=wJn3vSppPUI&list=UUIGmhpdVev1Wc0YK7FHlig&index=1&feature=plcp
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・標題: ヒト化マウスを用いた白血病の理解と克服 ・実施日: 平成 26 年 2 月 28 日 ・場所: ステーションカンファレンス東京 ・対象者: 一般市民、大学研究者、製薬企業研究者など ・参加人数: 181 名 <p>約 3 分の 1 の出席者が一般の方と考えられた 181 名の聴衆に対して、マウスからヒトの生物学を進める必要性、白血病の中でも急性骨髄性白血病がヘテロな疾患群であることから、その一部からでも再発を理解し、根治療法を開発する取り組みを実施していることを説明した。今後、ヒト化マウス研究から得られた知見に基づいて、あたらしい医療を開発することを本格的に目指したいとめくった。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>計 0 件</p>	
<p>その他</p>	<p>第 10 回 日本学術振興会賞 受賞「ヒト化マウスを用いた白血病の病態解明と治療薬の新規生体内検証法の確立」</p>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	130,000,000	105,000,000	25,000,000	0	0
間接経費	39,000,000	31,500,000	7,500,000	0	0
合計	169,000,000	136,500,000	32,500,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	0	25,000,000	0	25,000,000	25,000,000	0	0
間接経費	0	7,500,000	0	7,500,000	7,500,000	0	0
合計	0	32,500,000	0	32,500,000	32,500,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	25,000,000	実験試薬、細胞培養消耗品等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	25,000,000	
間接経費計	7,500,000	
合計	32,500,000	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
				0		
				0		
				0		