

学位論文題名

Effect of imatinib mesylate combined with  
granulocyte colony-stimulating factor on  
leukaemic blast cells derived from advanced-stage  
chronic myelogenous leukaemia patients

(慢性骨髄性白血病進行期における imatinib と  
G-CSF 併用効果に関する基礎的研究)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

選択的 Abl チロシンキナーゼ阻害剤である imatinib mesylate は、慢性骨髄性白血病 (CML) の分子標的療法としての優れた治療成績が報告されている。しかし、その血液毒性としての好中球減少症は、治療中断や重篤な感染症をきたし、寛解率の低下や imatinib 耐性の発現などの治療上の隘路となっている。このため、好中球減少症に有効な顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の併用が考慮されるが、一方で、G-CSF が白血病細胞の増殖を刺激する可能性も懸念される。そこで、本研究では imatinib と G-CSF の併用処理が Bcr/Abl 発現細胞の増殖とアポトーシスへ及ぼす影響を *in vitro* で評価し、CML の進行期 (accelerated phase/blast crisis; AP/BC) 例において、両者の同時投与が安全に行えるか否かを基礎的に検討した。

【材料と方法】

CML-BC 由来細胞株 KU812 および K562 と、進行期 CML 患者 (AP 2 例、BC 3 例) の末梢血または骨髄血から Blastretriever により部分的に純化した芽球を用いた。これらの細胞を imatinib または G-CSF、あるいは両者と共に液体培養し、トリパンブルー色素排泄法で生存率を算定し、形態学的変化はメイギムザ染色にて観察した。アポトーシスは、Annexin V (AV) / propidium iodide (PI) 二重染色による FACS 解析とアガロースゲル電気泳動による DNA ラダー形成法にて評価した。細胞内カスパーゼ活性化は蛍光標識カスパーゼ基質を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察し、色素標識カスパーゼ基質の切断による発色をマイクロプレートリーダーで測定することにより定量解析を行った。G-CSF 受容体 (G-CSFR) 発現は抗ヒト G-CSFR モノクローナル抗体を用いて FACScan にて測定した。DNA 合成刺激については、24~72 時間の液体培養後の <sup>3</sup>H-thymidine uptake を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【結果】

1. KU812 および K562 の imatinib 処理後の生存率は imatinib 処理時間および濃度依存性に

減少し、imatinib (10  $\mu$ M) 24時間培養後の生存率はKU812で41.5 $\pm$ 6.2%、K562で61.1 $\pm$ 2.5% (mean  $\pm$  SD)であった。G-CSFRの発現率はKU812で98.1%、K562で90.9%であったが、G-CSF単独処理はKU812とK562の増殖を刺激せず、imatinib単独とG-CSF併用との間の増殖抑制に有意差を認めなかった。また、KU812およびK562のimatinib処理により、細胞内カスパーゼの活性化、DNAラダー形成や細胞核の凝縮および断片化の形態学的変化を認めた。AV/PI二重染色を用いたFACScanによる解析で、KU812のimatinib処理24~72時間後にAV陽性細胞率は約70~97%に達し、汎カスパーゼ阻害剤(Z-VAD-fmk)により、この早期アポトーシスは効果的に抑制された。以上よりimatinibによるBcr/Abl発現細胞の増殖抑制はアポトーシスによるものと考えられた。また、これら白血病細胞へのアポトーシス誘導はimatinib単独およびG-CSF併用との間に有意差を認めなかった。

2. 進行期CML5症例の芽球においてimatinibは全症例で増殖をlog-1からlog-2に抑制した。患者芽球のG-CSFR発現率は36~59%であったが、全症例においてG-CSF単独添加は24時間培養後の芽球増殖に影響を与えなかった(stimulation index; SI < 2)。しかし、G-CSFとの72時間培養では5例中2例においてSIが2.25および5.27と上昇した。この2例ではG-CSF併用により、imatinibの増殖抑制効果が部分的に解除されたが、imatinib無添加のコントロールに比べるとなお増殖抑制効果を認めた。G-CSFR発現率とG-CSFによる細胞増殖刺激との間に関連性はみられなかった。以上より、培養株細胞ではG-CSFの併用はimatinibによるアポトーシス誘導に影響しないが、患者芽球では症例により細胞増殖を刺激し、imatinibによるアポトーシス誘導を抑制する可能性が否定できないことが示唆された。

#### 【考察】

進行期CML症例のimatinibによる治療では重篤な好中球減少症が高率に観察され、G-CSFなどの増殖因子の併用が有効と報告されている。培養株細胞ではG-CSFが影響しなかったのは、既に増殖因子非依存性増殖能を獲得していたためと考えられる。進行期CMLでは正常造血幹細胞の残存はないとされており、G-CSFの標的細胞は白血病細胞と考えられるが、G-CSFによりSIが上昇した2例では進行期移行後短時間の内に検体が採取されたため、芽球のDNA合成を刺激してimatinibによるアポトーシスを抑制した可能性のみならず、白血病細胞に残存した分化能をG-CSFが誘導・刺激してDNA合成を刺激した可能性も否定できない。この2症例においてDNA合成が分化を伴ったか否かは確認できなかった。一方、正常造血幹細胞が残存する慢性期では、通常使用量のimatinibはBcr/Abl発現細胞に増殖停止やアポトーシスを起こすが、正常造血幹細胞には大きく影響しないとの報告もあり、本併用療法ではimatinibがBcr/Abl発現細胞を抑制し、G-CSFが残存した正常造血幹細胞の増殖と好中球分化を誘導することが期待される。しかし、慢性期においてもG-CSFが芽球増殖を刺激する可能性も否定できず、十分な基礎的検討が必要と思われる。

#### 【結語】

G-CSFはCML-BC由来細胞株の増殖を刺激せず、imatinibによる増殖抑制に影響しなかった。進行期CML症例ではimatinibとG-CSF併用療法は白血病細胞の増殖抑制効果のみな

らず好中球増加も期待できる有効かつ安全な治療法と考えられるが、一部の症例では G-CSF が芽球増殖を刺激する可能性もあり、*in vitro* 増殖試験が imatinib 投与中の G-CSF 併用決定の良い指標となると思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 武 藤 学

## 学位論文題名

### Effect of imatinib mesylate combined with granulocyte colony-stimulating factor on leukaemic blast cells derived from advanced-stage chronic myelogenous leukaemia patients

(慢性骨髄性白血病進行期における imatinib と G-C S F 併用効果に関する基礎的研究)

選択的 Abl チロシンキナーゼ阻害剤 imatinib は、慢性骨髄性白血病 (CML) への優れた治療成績が報告されているが、血液毒性としての好中球減少症による治療中断や重篤な感染症をきたし、寛解率の低下や imatinib 耐性の発現などの治療上の隘路となっている。そこで、申請者は imatinib と G-CSF の併用処理が Bcr/Abl 発現細胞の増殖とアポトーシスへ及ぼす影響を *in vitro* で評価し、進行期 CML 症例において両者の同時投与が安全に行えるか否かを基礎的に検討した。

Bcr/Abl 発現細胞株では imatinib により時間および濃度依存性に生存率が減少した。両細胞株の G-CSF 受容体発現率は 90%以上であったが、G-CSF 単独処理は増殖を刺激せず、imatinib 単独と G-CSF 併用との間の増殖抑制に有意差を認めなかった。また、imatinib 処理により細胞内カスパーゼの活性化、DNA ラダー形成や細胞核の凝縮および断片化の形態学的変化を認め、imatinib 処理 24~72 時間培養後の Annexin V 陽性細胞率は約 70~97%に達した。また、この早期アポトーシスは汎カスパーゼ阻害剤によって効果的に抑制された。これら白血病細胞へのアポトーシス誘導は imatinib 単独と G-CSF 併用との間に有意差を認めなかった。一方、進行期 CML 5 症例の芽球の *in vitro* 増殖試験で imatinib は全例で増殖を効果的に抑制した。芽球の G-CSF 受容体発現率は 36~59%であったが、全例において G-CSF 単独は 24 時間培養後の芽球増殖に影響を与えなかった (stimulation index; SI <2)。しかし、G-CSF 72 時間培養では 5 例中 2 例で SI が 2.25 および 5.27 と上昇し、G-CSF 併用により imatinib の増殖抑制効果が部分的に解除されたが、imatinib 無添加のコントロールに比べるとなお増殖抑制効果を認めた。以上より、培養株細胞では G-CSF の併用は imatinib によるアポトーシス誘導

に影響しないが、患者芽球では症例により細胞増殖を刺激し、imatinib によるアポトーシス誘導を抑制する可能性が示唆された。従って、進行期 CML 症例では imatinib と G-CSF 併用療法は白血病細胞の増殖抑制効果のみならず好中球増加も期待できるが、一部では G-CSF が芽球増殖を刺激する可能性もあり、in vitro 増殖試験が G-CSF 併用決定の指標となることが考えられた。

口頭発表に際し、主査の小池教授より白血病細胞株における G-CSF シグナル伝達に関する検討、CML 進行期に対する臨床での G-CSF 使用選択基準、imatinib 耐性 CML 例で in vitro と in vivo で imatinib が異なる効果を示す機序について質問があった。これに対して申請者は、本研究で G-CSF シグナル伝達に関し未検討であること、好中球減少時の感染症併発が G-CSF の臨床における使用選択基準となること、高用量の imatinib 投与が耐性克服となる報告があり高濃度の imatinib で処理したことにより耐性株に対して効果を認めたことを回答した。次いで副査の浅香教授より imatinib と G-CSF を併用する研究の目的、白血病細胞に対する各種 G-CSF 製剤の効果の違いと、白血病細胞の増殖を抑制し分化に作用する新たな G-CSF 開発の有無について質問があった。これに対して申請者は、進行期 CML は造血幹細胞移植以外に治癒は望めないが、移植までの imatinib 治療の際におこる好中球減少時の感染症に G-CSF が有効か、その併用療法が imatinib の抗腫瘍効果を妨げず治療可能かを検討する目的であること、各種 G-CSF 製剤の効果に差はなかったこと、分化特異的作用をもつ新たな G-CSF は未開発であることを回答した。さらに、副査の武蔵教授より CML 慢性期における imatinib 治療への G-CSF 併用の有用性について質問があった。これに対して申請者は、CML 慢性期に対する imatinib 治療で分子細胞学的効果が得られた症例でも Ph 陽性前駆細胞が残存するため、imatinib 単独では治癒を望めない可能性が高く、他の抗白血病薬の併用療法が検討されており、併用療法は imatinib 単独治療以上に好中球減少を惹起する危険性があるため、G-CSF 併用の有効性と安全性を検討中であることを回答した。

本研究は Bcr/Abl 発現細胞株と進行期 CML 患者芽球に対する imatinib と G-CSF の併用効果を in vitro で初めて明らかにしたことで高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。