



世界初・蛍光タンパク質を用いた 白血病の分子標的治療薬感受性試験の開発に成功

研究成果のポイント

- ・世界で初めて蛍光タンパク質（下村脩博士がノーベル化学賞受賞）を白血病の臨床検査技術に応用
- ・生きた細胞を解析するという他の検査にはない特徴【特許出願済み】
- ・慢性骨髄性白血病の分子標的治療薬の薬効評価や治療効果の予測が可能
- ・慢性骨髄性白血病患者の至適治療の選択によるテーラーメイド医療の実現に期待

研究成果の概要

北海道大学大学院医学研究科の大場雄介准教授（病態医科学分野）の研究チームは、近藤健講師（北海道大学病院第三内科）の研究チームと共同で、蛍光タンパク質を応用した薬剤感受性試験の開発に成功しました。

慢性骨髄性白血病は、分子標的治療薬の劇的な効果により内服薬でコントロールできるがんですが、一部の患者さんでは薬が効かない「耐性」という問題が生じています。大場准教授らは、2008年に下村脩博士がノーベル化学賞を受賞した蛍光タンパク質を臨床応用し、分子標的治療薬が慢性骨髄性白血病細胞に有効かどうかを判定する技術を開発しました。

本技術は、耐性細胞の検出のみならず、治療開始前に治療薬の効果を予測できる可能性もあり、個々の患者さんに有効な治療薬を選択する至適な治療（テーラーメイド医療）を行う一助になることが期待されます。

論文発表の概要

研究論文名：A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells

（生きた細胞内で BCR-ABL の活性と薬剤反応性を測定する新規 FRET バイオセンサー）

著者：氏名（所属）水谷龍明，Stephanie Darmanin，津田真寿美，大場雄介（北海道大学大学院医学研究科病態医科学分野）近藤健，浅香正博（北海道大学病院第三内科），田中伸哉（北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野），飛梅実（国立感染症研究所）

公表雑誌：Clinical Cancer Research (American Association for Cancer Research)

<http://clincancerres.aacrjournals.org/>

公表日：日本時間（現地時間）2010 年 7 月 29 日午後 1 時 5 分（米国東部時間 同午前 0 時 5 分）

研究成果の概要

（背景）

慢性骨髄性白血病（CML）は、骨髄の造血幹細胞に異常染色体（フィラデルフィア染色体）が形成され、白血病の原因タンパク質 BCR-ABL が細胞内に出現し発症する血液のがんです。以前は骨髄移植以外に治癒が期待できる術はありませんでしたが、10 年ほど前に分子標的治療薬イマチニブが認可され、過去のどの治療よりも成績が良かったことからその有用性が確立しました。しかし、イマチニブが効かない患者さんや、治療途中から効かなくなるケースも少なからず存在することがわかってきました。イマチニブが効かない耐性の原因は、BCR-ABL の変異によるものとよらないものがそれぞれ半々の割合と言われていますが、最近では BCR-ABL の変異に対応した次世代分子標的治療薬であるニロチニブ、ダサチニブも臨床に導入されており、変異の種類によっては薬剤の有効性が推定できます。しかし後者のケースでは、使用する薬剤の有効性は、実際の治療開始後数カ月から 1 年以上に亘る経過中の血液検査や骨髄検査の結果によって判断されています。無効であった場合には、他の薬に切り替える必要がありますし、治療中に病状が更に悪化する懸念もあります。この課題の解決には患者さんの白血病細胞にどの薬が有効かを治療前に判定したり、治療中に耐性細胞の有無を検出したる技術が必要で、そうすれば、患者さん一人一人に有効な治療を個別に選択できるようになります。

（研究手法）

この課題を克服するために、蛍光タンパク質とフェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）の原理を利用したセンサー・Pickles を開発し、イマチニブ等の薬の有効性を判定する技術の開発を試みました。また、そのセンサーを患者さんのがん細胞に効率良く送り込めるように工夫し、実際に患者さんから採取したがん細胞を培養し、それが生きたまま、一つ一つの細胞が薬に対してどのような反応性を示すかを解析しました。これまでも蛍光タンパク質は生物学研究に文字通り多くの光を照らしてきました。とりわけ蛍光タンパク質を用いた FRET は、生きた細胞内で起こるイベントを色の変化として捉えられる画期的なイメージング技術で、世界的にも頻用されている技術です。しかし、それら画期的技術革新が使われるのは、純粋な基礎研究分野のみに限られていました。

（研究成果）

今回開発したセンサー分子 Pickles は、これまで使われていた他の薬効判定手法に比べて高感度で、1 細胞レベルの解析により、極少数（1%以下）の薬剤耐性細胞を、その他の薬剤感受性細胞の中から見出すこともできました。実際の患者さんのがん細胞を用いた場合、イマチニブの効果を判定することができるだけでなく、将来の薬剤耐性の出現を予測することが可能でした。また Pickles は、それら薬剤耐性細胞に対して、他のどの薬が有効かを調べることも可能です。

（今後への期待）

今回開発した診断技術进行治疗前の CML 患者さんに用いることで、有効な分子標的治療薬を予測できる可能性があり、個々の患者さんに至適な治療薬を選択できると考えられます。Clinical Cancer Research 誌の論説においても、本成果がテーラーメイド医療に向けた「pioneer study（先駆的研究）」として紹介されて、出版元である米国癌学会（AACR）も全米に向けプレスリリースを行っています。また本技術は、治療効果の向上のみならず、最大治療効果が得られる時間も短縮出来ます。分子標的治療薬は大変高価で、医療資源的にも経済的で効率的医療の実践につながる期待もあります。

また本手法には、生きた細胞を解析するという他の検査にはない特徴があり、特許出願しています（特許公開資料；特開 2009-278942）。したがって、薬剤耐性細胞のみを集めてそれらの性質を調べることも可能であり、単なる臨床的効果だけでなく薬剤耐性機構解明への発展も期待できます。

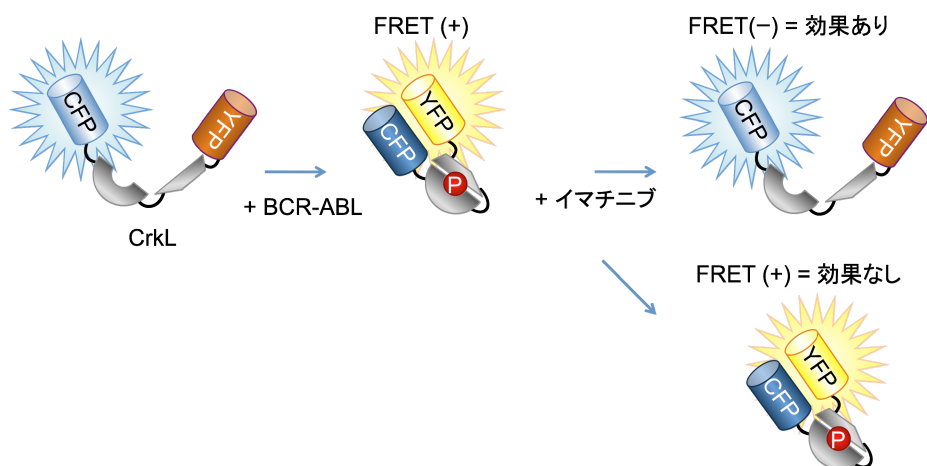


図1 FRETを用いたセンサー分子 Pickles BCR-ABLによってリン酸化されるCrkLの両端に2種類の蛋白質CFPとYFPを融合させたセンサー分子をPicklesと命名した。CrkLがリン酸化されていない時は、CFPとYFPが離れているためFRETが起こらずCFPが光るが、BCR-ABLによるCrkLのリン酸化に伴いPicklesが構造変化し、FRETによるYFPの光が観察できる。イマチニブ等薬剤が有効の場合は脱リン酸化によりFRETが解消(CFPの光)されるが、薬剤が無効の場合にはFRETが生じたままで、黄色の蛍光が残る。

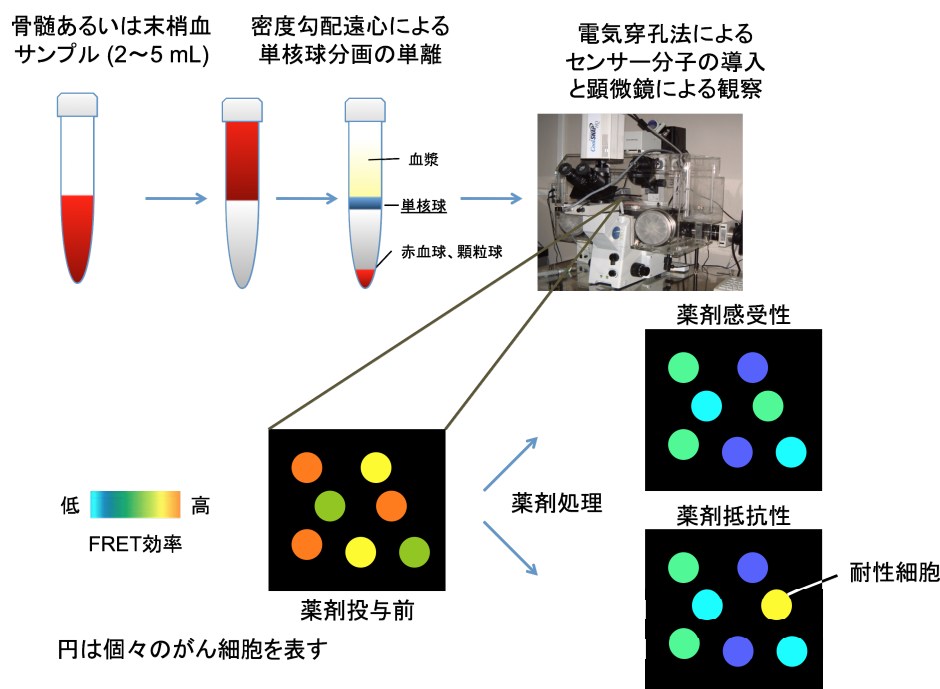


図2 Picklesによる薬効評価プロセス 採血あるいは骨髄穿刺により得た血球から、密度勾配遠心法により単核球分画を単離する。得られた単核球分画に電気穿孔法によりPicklesを導入する。24時間後にはセンサー分子の蛍光が観察可能であり、顕微鏡で一つ一つのFRET効率を測定できるが、CMLではBCR-ABLの発現によりFRETの高い細胞が多い。薬剤処理後にすべての細胞でBCR-ABLの活性が抑制(FRET低)されていれば薬剤が有効、抵抗性の場合に症例により数はマチマチだが、FRETの高い細胞が残存する。顕微鏡を用いた1細胞レベルの観測なので、図のように細胞が1つでも同定可能である。

用語の解説

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) : 骨髄における造血幹細胞の無秩序な分裂によって特徴づけられる慢性白血病の一つで、フィラデルフィア染色体と呼ばれる特徴的な染色体転座と関連した造血幹細胞の無制限な増殖を伴う病気。歴史的にインターフェロンなどを使用した化学療法や骨髄移植などが行われてきたが、2001年に第1世代のチロシンキナーゼ阻害薬（分子標的治療薬）イマチニブが登場してからはその予後は大きく改善された。現在は第2世代の薬剤が登場し、治療成績の改善も著しいが、それらの薬剤に対する耐性症例をいかに治療するかが現在の課題である。

フィラデルフィア染色体と BCR-ABL : 慢性骨髄性白血病および一部の急性リンパ性白血病 (ALL) に見られる染色体の異常。22番染色体と9番染色体間での転座によって、*c-abl* と *bcr* という遺伝子の融合で新たに *bcr-abl* 遺伝子が形成される。この遺伝子がコードする異常なタンパク質 BCR-ABL の発現が、造血幹細胞を無制限に増殖させる原因である。

分子標的治療薬 : 体内の特定の分子を狙い撃ちし、その機能を抑えることで病気を治療する治療法。がん細胞と正常細胞の違いをゲノムレベル・分子レベルで解明し、癌の増殖や転移に必要な分子を特異的に抑えたり、関節リウマチなどの炎症性疾患では炎症に関わる分子を特異的に抑えたりすることで治療する。従来の多くの薬剤もその作用機序を探ると何らかの標的分子を持つが、分子標的治療薬は創薬や治療法設計の段階から分子レベルの標的を定めている点で異なる。分子標的治療という言葉は、主に癌に対する治療を指して用いられることが多い。この言葉はモノクローナル抗体の開発が始まった1980年代初頭より使用され始め、イマチニブやゲフィチニブなどの小分子化合物が臨床使用され始めた1990年代末から一般的に使われるようになった。

緑色蛍光タンパク質 : オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) がもつ蛍光タンパク質で、1960年代に下村脩によって発見・分離精製された。下村博士はこの発見で2008年にノーベル化学賞を受賞した。

フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET) : 接した2個の色素分子の間で、励起エネルギーが電磁波にならず電子の共鳴により直接移動する現象。蛍光分子を用いる場合が多く、一方の分子（供与体）で吸収された光のエネルギーによって他方の分子（受容体）から蛍光が放射されるため、蛍光共鳴エネルギー移動とも呼ばれる。FRETの強度は両分子間の距離の6乗の関数として、距離とともに急速に減少する。これを応用して、両分子が互いに近接していることがFRETで示される。蛍光タンパク質の場合はCFP（シアン）とYFP（黄）が汎用されている。

テーラーメイド医療 : 個々人の個性に合った医療を行うこと。個別化医療 (personalized medicine)、カスタムメイド医療 (custom-made medicine) ともいう。これまで医療は疾患中心であり、疾患原因の探索やその治療法開発が主目的であった。しかし、疾患の状態は個々人で千差万別であり、同じ病気であっても同じ治療法を適用することが必ずしも正しくないことは以前より知られてきた。治療薬がその患者に有効であるかどうか、あるいは投薬量や副作用について見積もることによってどの治療薬を用いるのが正しいか、どの程度の投与を行うかを行ったことが分かるようになると期待されている。

お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究科・准教授 大場 雄介（おおば ゆうすけ）
TEL: 011-706-5158 FAX: 011-706-7877 E-mail: yohba@med.hokudai.ac.jp
ホームページ : <http://www.med.hokudai.ac.jp/~clilab-w/>

北海道大学総務部広報課 TEL: 011-706-2610 FAX: 011-706-4870
E-mail: kouhou@jimuhokudai.ac.jp