

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19573

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群における分化誘導因子KLF4の機能解明と新規抗癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Deciphering the function of KLF4 in myeloid dysplastic syndrome (MDS).

研究代表者

森田 剣 (Morita, Ken)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50757557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)は、骨髄中の造血幹細胞や未熟な骨髄系細胞に何らかの遺伝子変異が入ることで発症する代表的な悪性造血器腫瘍である。その中でも特に現行の治療では根治が難しい患者さんを対象に、新規治療薬の開発を目的として本研究を行った。我々はKLF4という遺伝子の発現を増強することで、骨髄中の未熟な悪性細胞を分化誘導し自己増殖能を失わせるという事実に基づき、このような作用を持つ薬剤の同定とそのメカニズムに分子生物学的手法で迫った。本研究により、我々はKLF4を増強する薬剤候補の同定に至り、現在その薬剤を用いた国内治験に向けて準備している段階である。

研究成果の概要(英文)：Myeloid dysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) are two major malignancies originate from the hematopoietic stem cells and immature myeloid cells. In these cells, a transcript factor called KLF4 has a known capacity to differentiate these cells into monocyte lineage and thus considered to work as a tumor suppressor in MDS and AML cells. In this study, we tried to find out drugs that can up-regulate the expression of KLF4 in these cancer cells and we found several candidate drugs that can potentially differentiate these malignant cells into terminal monocytes through enhancing KLF4 function. We will set up clinical trials in MDS and AML patients with these drugs.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 分化誘導療法 KLF4

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (Myeloid dysplastic syndrome; MDS) は造血器疾患の約 10% を占める極めて予後不良な疾患である。造血幹細胞レベルでの遺伝子変異に起因する 3 系統の血球異常 (貧血、好中球異常、血小板異常) を特徴とし、経過中に骨髄芽球の異常増殖を来して高確率に急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia; AML) を発症する。単一の強力な遺伝子変異 (Driver mutation) や融合遺伝子から発症する de novo AML とは異なり、MDS は複数の遺伝子変異が蓄積した多クローン性の疾患であることから、従来の特定の遺伝子変異や融合遺伝子を標的とした分子標的治療薬の開発が難しく、また現行の強化化学療法でも根治は困難である。MDS や AML の腫瘍細胞では細胞質シグナル伝達の重要な構成経路である Ras-Raf-MEK-ERK 経路の恒常的活性化が広く認められ、異常な細胞増殖が惹起されていることがこれまで繰り返し報告されている。一方で非腫瘍細胞における Ras-Raf-MEK-ERK 経路の恒常的活性化は一過性の細胞増殖の後、最終的には細胞分化を誘導し死滅することが明らかとなっている。これらの事実から、腫瘍細胞では Ras-Raf-MEK-ERK 経路の活性化が細胞分化を惹起することなく細胞増殖のみ誘導し続ける何らかの機構の存在が示唆されていたが、その詳細はこれまで不明であった。研究代表者らは 2015 年に Ras-Raf-MEK-ERK 経路の恒常的活性化は転写因子 KLF4 (Krüppel-like factor 4) の発現亢進をもたらし、細胞の分化誘導を促進していること、また、白血病幹細胞においては BAALC (Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic) という adaptor タンパク質が高発現しており、BAALC は Ras-Raf-MEK-ERK の活性化をもたらすと同時に、産生されてくる KLF4 に細胞質内で結合することでその機能を直接阻害し、白血病幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにし報告した (K. Morita, et al. *Leukemia*. 29(11):2248-56, 2015)。AML 細胞株において KLF4 の過剰発現は単球系への分化が誘導されることが知られており、健康者の血球においても幹細胞 骨髄球 単球への分化段階に伴い KLF4 の発現が飛躍的に上昇していることが報告されている。さらに、ハイリスク MDS 症例では KLF4 の silencing が起きていることが明らかになっている。以上の事実から、AML・MDS などの骨髄球系の造血器疾患では KLF4 の発現やその機能の抑制が腫瘍細胞の未分化性維持に広く重要であることが示唆される。上述の通り研究代表者らは AML 症例の過半数で認められる Ras-Raf-MEK-ERK 経路の恒常的活性化によってもたらされる KLF4 の発現亢進・分化誘導を Adaptor タンパク質 BAALC が阻害することで腫瘍幹細胞の未分化性を維持する機構を発見したが、細胞質シグナル

経路の恒常的活性化がどのように KLF4 の発現亢進をもたらすのか、また KLF4 の発現亢進がなぜ骨髄球系細胞の分化を誘導するのかが未解明のままである。以上の事実を踏まえ、特に難治性骨髄疾患 MDS を研究対象として、KLF4 の発現調節の仕組みの解明し、低分子化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングにより KLF4 の発現を亢進させ、MDS 細胞を分化誘導して腫瘍細胞の根絶を目指す新規分化誘導治療薬の開発に結びつけるという着想を得た。

2. 研究の目的

難治性造血器腫瘍である骨髄異形成症候群 (MDS) および急性骨髄性白血病 (AML) において腫瘍幹細胞の分化・増殖抑制効果を誘導する転写因子 KLF4 の詳細な分子機構を解明することを目的とする。また低分子化合物ライブラリースクリーニングにより、KLF4 の発現を誘導し MDS 腫瘍幹細胞の根絶をもたらす新規薬剤を単離同定し、MDS に対する新たな治療戦略を提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

【概要】

単球系細胞への分化誘導における KLF4 の役割を明らかにするため、MDS, AML の特徴をもつヒト細胞株においてレンチウイルスを用いた KLF4 の強制発現、short hairpin RNA (shRNA) を用いたノックダウンを行い、前後での遺伝子発現の変化、分化誘導の程度、細胞の生存率などを観察した。実験では特に MDS 由来細胞株として MOLM-13, AML 由来細胞として THP-1 を主に用いた。遺伝子発現の評価には、RT-qPCR や、Western Blot 法を用いた。タンパク-タンパク結合の評価には、Mass spectrometry と免疫沈降法を用いた。新規分化誘導治療薬の開発を目指した候補薬剤の選定にあたっては、KLF4 の promoter 領域を用いた luciferase reporter assay による化合物スクリーニングを実施した。

【方法の詳細】

RAS-RAF-MEK-ERK 経路の恒常的活性化が KLF4 を誘導するメカニズムを明らかにするため、RAS-RAF-MEK-ERK 経路の恒常的活性化を惹起する RAS 変異 (KRAS G12V) をノックインしたマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子解析の結果で発現が上昇する遺伝子群を Gen Set Enrichment Analysis (GSEA) ソフトウェアにより抽出した (RAS-RAF-MEK-ERK 経路の標的遺伝子)。同様に KLF4 を過剰発現させたマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子解析、KLF4 を相対的に過剰発現している AML 患者骨髄細胞での網羅的遺伝子解析の結果から、候補遺伝子を絞り込んだ。次に白血病細胞株において KLF4 を過剰発現させた前後で mRNA を回収し、網羅的遺伝子解析で得られた候補遺伝子のリ

ストに含まれる遺伝子の発現変化をリアルタイム qPCR 法によって調べた。最も発現変化の大きかった遺伝子について、レンチウイルス cDNA 発現ベクター、shRNA ノックダウンベクターをそれぞれ設計し、AML, MDS 由来細胞株にポリプレックスを用いてトランスダクションした。実際の KLF4 の発現変化をリアルタイム qPCR 法で確認し、MDS 細胞株の分化・増殖に与える影響をそれぞれ単球系の表面マーカーである CD11b, CD14 の発現をフローサイトメーターおよび光学顕微鏡を用いた検鏡にて、細胞増殖を Alamar blue を用いた生細胞アッセイにて評価した。以上の実験から AML, MDS 細胞において KLF4 の発現を上昇させることで細胞の分化誘導、腫瘍抑制を惹起し得る候補遺伝子を選択した。この遺伝子が KLF4 の発現をどのように調整しているかさらに詳細に解析するため、KLF4 のプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼリポーターベクターを作成し、AML, MDS 細胞株に強制発現させ、候補遺伝子が KLF4 の転写レベルを直接制御しているかどうかを確認した。さらに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) により候補遺伝子が KLF4 の転写制御領域に直接結合してその転写を制御しているかどうかを調べた。これらの実験により、RAS-RAF-MEK-ERK 経路にあり、かつ KLF4 の転写レベルを直接上昇させることで AML, MDS 細胞の分化誘導・増殖抑制をもたらす key 分子の同定を試みた。

次に、AML, MDS 細胞において KLF4 を誘導することで細胞分化誘導をもたらす薬剤の開発のため、薬剤標的が既知の化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを実施した。KLF4 の遺伝子誘導の評価には KLF4 のプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼリポーターベクターを使用した。プラスミド導入の簡便性から細胞は HEK293T 細胞を使用した。使用にあたっては、既知の KLF4 誘導剤である PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を、レポータープラスミドを導入した HEK293T 細胞に投与すると、実際に KLF4 の発現誘導が促進されることを確認した。このレポーターベクターを導入した HEK293T を 96 穴マルチウェルプレートへ播種し、細胞接着を確認後に各薬剤を 10 μ M の濃度で投与、24 時間後に細胞溶解剤を添加した上で、KLF4 の転写活性をプレートリーダーにて測定した。得られた候補薬剤につき、AML, MDS 細胞株へ 10 μ M の濃度で投与投与して 24 時間後に mRNA を回収し、リアルタイム qPCR 法によって KLF4 の発現変化を確認した。さらに、候補薬剤を AML, MDS 細胞株へ様々な濃度、暴露時間で投与し、分化・増殖に与える影響をそれぞれ単球系の表面マーカーである CD11b, CD14 の発現をフローサイトメーターおよび光学顕微鏡を用いた検鏡にて、細胞増殖を Alamar blue を用いた生細胞アッセイにて評価した。

最後に、もっとも期待される候補薬剤についてマウスモデルを使って効果を検証した。マウスは NOD/Shi-scid-IL2R null マウス (NOG マウス) に AML 細胞株を経静脈的に移植した白血病モデルマウスを使用した。候補薬剤は経口的に週 2 回、それぞれ 50 mg/kg 体重で胃ゾンデを用いて投与し、生存期間、治療経過中の肝脾腫、骨髄中の腫瘍細胞の割合などを観察した。全ての動物実験は施設の動物実験規定を遵守し実施した。

4. 研究成果

まず、KLF4 がどのように MDS や AML 細胞を分化するかを調べるため、I. マウス骨髄由来 Tot2 細胞に KLF4 を過剰発現させた際に上昇する遺伝子群、II. Nras 変異マウス由来の骨髄細胞で上昇する遺伝子群、III. ヒト AML において KLF4 高発現症例で特異的に上昇している遺伝子群をそれぞれ 1000 個ずつ既報のマイクロアレイデータから同定し、その共通項である 26 個の遺伝子を選出した。次に、THP-1 および MOLM-13 細胞に KLF4 を強制発現させ、この 26 個の遺伝子発現の変化をそれぞれ RT-qPCR で観察したところ、神経細胞でのシナプス分化に関連している遺伝子 (遺伝子 A) が最も大きく上昇していることが明らかになった。遺伝子 A は、遺伝子 A ファミリーを形成し、複数のアイソタイプが存在することが知られている。そこで、KLF4 を強制発現させた際にどのサブタイプが上昇しているのか同様に RT-qPCR で調べたところ、遺伝子 Aa が特異的に上昇していることが明らかになった。我々のレンチウイルスを用いた実験系では、KLF4 の強制発現は、THP-1 細胞や MOLM-13 細胞において 48 時間~72 時間で単球系への分化を誘導したが、同じ細胞で、KLF4 によって誘導された遺伝子 Aa の発現を shRNA で特異的に抑制したところ、KLF4 による分化誘導が認められなくなった。これらの事実は、MDS や AML などの骨髄系腫瘍細胞においては、遺伝子 Aa が KLF4 による単球系への分化に必須の下流標的分子である可能性を示唆している。

遺伝子 Aa はこれまでにニューロンの分化などに重要であるという報告があるが、血液細胞におけるその機能はこれまでに報告がなく、不明であった。そのため、我々は、遺伝子 Aa がどのように骨髄系細胞を分化させるのか、その詳細な分子機構を明らかにするため、遺伝子 Aa と特異的に結合するタンパク質を Mass spectrometry により同定することを試みた。まず、THP-1 細胞に MYC-tag を付加した Aa および Ab (Aa のファミリー遺伝子で、かつ、過剰発現した際に単球分化誘導能を持たない) をそれぞれ過剰発現した細胞を用意し、抗 MYC-tag 抗体およびコントロール IgG を用いて共免疫沈降法を実施し、Aa に結合が認められるが、Ab には結合が認められないタンパク質の抽出を試みた。

結果として9個のタンパク質が遺伝子Aaに特異的に結合している可能性があることが判明した。その中で、我々は細胞骨格タンパク質であるアクチンやチューブリンなどのタンパク質の折りたたみ(フォールディング)に関与する遺伝子Bから翻訳されるシャペロンタンパク質に注目した。単球系への細胞分化では、形態学的に細胞が樹状型の突起を伸ばし、細胞質容積も急速に大きくなる(核/細胞質比の減少)。そのため、急速な細胞骨格タンパク質の合成と配置が必要になる。従って遺伝子Aaが遺伝子Bに結合し、そのシャペロンとしての働きを調節することで、細胞の分化に寄与していると考えられることは合理的である。実際、免疫沈降実験では遺伝子Aaは遺伝子Bに特異的に結合し、さらに蛍光免疫染色では遺伝子Aaと遺伝子Bの共存が確認された。現在、アクチンの折りたたみを観察するための実験系につき準備しており、1. KLF4を過剰発現させた際に折りたたみが促進されるか、2. Aaを過剰発現させた時に折りたたみが観察されるか、3. KLF4を過剰発現させた状態でAaをロックダウンした際にはどうか、4. 3.の表現型は遺伝子Bを過剰発現させた際には戻せるのか、などの条件で実験を行う予定である。これらの結果は、現時点で、遺伝子Aaが遺伝子Bを介して細胞の単球系への分化を促進している可能性を示している。

次に、KLF4の発現を誘導する薬剤開発のため、保有している薬剤ライブラリー(FDA認可有、特許期限切れなどの薬剤から構成)約2,500種を用い、HEK293TにAML細胞株THP-1よりクローニングしたKLF4のプロモーター領域を持つルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、KLF4のプロモーター活性を上昇させる薬剤の抽出を試みた。最終的に活性の上昇率を指標にして約30種の薬剤へ絞り込んだ。その後、それらの薬剤をそれぞれAML由来のTHP-1細胞株へ暴露し、実際のKLF4のmRNA発現量により薬剤の順位づけを行った。結果として今回使用したライブラリーの中で最もKLF4の発現を強く誘導した薬剤Cを有望な分化誘導剤として得た。実際、薬剤Cは当研究室で有しているAML、MDSの多くの細胞株で強い細胞増殖抑制効果とともに分化を誘導することが明らかになった。この薬剤Cはすでにヒトでは臨床的に優れた抗寄生虫薬として広く使用されているもので、高い安全性が担保されている。寄生虫を駆除できる薬剤血中濃度と、抗白血病効果をえられる濃度には乖離は予想され、より高濃度でヒトに投与した際に、どのような副作用が現れるかは現時点では不明だが、免疫不全マウス(NOG)ベースの白血病モデルでは、薬剤Cの投与により有意な全生存期間延長効果、および組織へのAML細胞の浸潤抑制が確認できた。以上から、今回得られた薬剤CはAMLやMDSなどの患者さんで、現行治療で効果が得られな

い方々の新しい治療薬として期待される。今後は病院・製薬企業等と協調し、将来の臨床応用を目指した治験について計画する。

これらの研究成果の一部は2016年12月に開かれた米国血液学会で発表し、Abstract Achievement Awardを受賞した。なお本研究結果は、近日中に英文雑誌に投稿を予定しており、本報告書では遺伝子A、Aa、B、化合物Cについての具体的な名称は現時点で伏字としている。

臨床的にMDSには5q-症候群など一部の病型を除き有効な治療法が乏しく、貧血、血小板減少、好中球減少に対する輸血療法・G-CSF製剤などの補助療法が中心であり、経過中にAMLへ進行した症例の予後は極めて悪い致死性疾患である。次世代シーケンサーを利用したMDS患者検体の網羅的遺伝子変異解析では幹細胞レベルに複数の遺伝子変異が蓄積した状態であることが明らかになり、従来の単一の遺伝子変異を標的とした治療法開発のアプローチではその克服は困難と考えられる。本研究では特定の遺伝子変異を標的とするのではなく、骨髄球系細胞の単球への分化を誘導するkey遺伝子KLF4に着目し、MDSの腫瘍幹細胞を自己複製能の無いレベルにまで分化誘導する治療を考案している点に特色がある。また、KLF4の骨髄球系細胞の分化誘導能に着目し臨床応用に至った薬剤はこれまで報告がなく、本研究で実施した化合物スクリーニングにより同定された薬剤は、白血病マウスモデルにて腫瘍抑制効果を認めため、将来の臨床応用を見据えた初のKLF4誘導薬開発という画期的成果が得られた。さらにKLF4は多発性骨髄腫や小児T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)などの他の予後不良な造血器腫瘍においてもその腫瘍形成に重要な役割を担っていると報告されている他、大腸癌などの非造血器腫瘍においても癌抑制因子としての機能が報告されていることから、本研究で同定された薬剤は、造血器腫瘍のみならず広く固形腫瘍にも効果のある可能性があり、化学療法がほとんど奏功することのない進行期固形腫瘍患者に新たな選択肢を提示できる可能性がある点に今回の研究の意義があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

1. RUNX transcription factors potentially control E-selectin expressions in the vascular niche of mice bone marrow.

Ken Morita, Chieko Tokushige, Shintaro Maeda, Hiroki Kiyose, Mina Noura, Atsushi Iwai, Maya Yamada, Gengo Kashiwazaki, Junichi Taniguchi,

Toshikazu Bando, Masahiro Hirata, Tatsuki R Kataoka, Tatsutoshi Nakahata, Souichi Adachi, Hiroshi Sugiyama and Yasuhiko Kamikubo

Blood Adv. 2(5):509-515, 2018.

2. Autonomous feedback loop of RUNX1-p53-CBFB in acute myeloid leukemia cells.

Ken Morita, Mina Noura, Chieko Tokushige, Shintaro Maeda, Hiroki Kiyose, Gengo Kashiwazaki, Junichi Taniguchi, Toshikazu Bando, Kenichi Yoshida, Toshifumi Ozaki, Hidemasa Matsuo, Seishi Ogawa, Paul P. Liu, Tatsutoshi Nakahata, Hiroshi Sugiyama, Souichi Adachi, Yasuhiko Kamikubo.

Sci Rep. 7(1):16604, 2017.

3. Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects.

Ken Morita, Kensho Suzuki, Shintaro Maeda, Gengo Kashiwazaki, Yasushi Okuno, Manabu Muto, Kazuhito Naka, Kosei Ito, Toshio Kitamura, Yasufumi Kaneda, Paul P. Liu, Toshikazu Bando, Souichi Adachi, Hiroshi Sugiyama, Yasuhiko Kamikubo.

J Clin Invest. 127(7):2815-2828, 2017.

4. Paradoxical enhancement of leukemogenesis in acute myeloid leukemia with moderately-attenuated RUNX1 expressions.

Ken Morita, Shintaro Maeda, Kensho Suzuki, Hiroki Kiyose, Junichi Taniguchi, Paul P. Liu, Hiroshi Sugiyama, Souichi Adachi and Yasuhiko Kamikubo.

Blood Adv. 1(18):1440-1451, 2017

5. RUNX1 positively regulates the ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells.

Yoshihide Mitsuda, Ken Morita, Gengo Kashiwazaki, Junichi Taniguchi, Toshikazu Bando, Masahiro Hirata, Tatsuki Kataoka, Manabu Muto, Yasufumi Kaneda, Tatsutoshi Nakahata, Paul P. Liu, Souichi Adachi, Hiroshi Sugiyama and Yasuhiko Kamikubo.

Scientific Reports. 8(1):6423, 2018.

〔学会発表〕(計 1 件)

Deciphering the Function of KLF4 as a Differentiation Inducer in Hematologic Malignancies

Hiroki Kiyose, Ken Morita, Shintaro Maed

a, Kensho Suzuki, Souichi Adachi and Yasuhiko Kamikubo
58th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition.

San Diego, CA, USA. December 4, 2016

*Abstract Achievement Award 受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

発明の名称: アルベンダゾール含有単球分化誘導剤

発明者: 森田 剣

権利者: 京都大学

種類: 基本発明

出願番号: 特願 2018-018622

出願日: 2018/02/05

国内外の別: 国内

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 剣 (MORITA, Ken)

京都大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号: 50757557

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

足立 壮一 (ADACHI, Souichi)

京都大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10273450