

令和元年6月17日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16193

研究課題名（和文）転写因子Sp1をターゲットとする慢性骨髄性白血病の根治戦略

研究課題名（英文）The strategy for targeting Sp1 to elucidate CML cells

研究代表者

小山 大輔（Koyama, Daisuke）

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50741071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性骨髄性白血病はBCR-ABL融合遺伝子を有し、その恒常的なチロシンキナーゼ活性が腫瘍形成に寄与することで特徴づけられる骨髄増殖性疾患である。BCR-ABLがオートファジーによって分解され、転写因子Sp1がオートファジー関連遺伝子の発現に重要な役割を担っていることが明らかになった。慢性骨髄性白血病の根治治療の開発につなげていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性骨髄性白血病を根治するための新規治療戦略を開発するための理論的基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative neoplasm that driven by BCR-ABL tyrosine kinase. BCR-ABL is degraded by autophagy. It was clarified that Sp1 plays the crucial role for the expression of autophagy-related genes.

研究分野：血液学

キーワード：慢性骨髄性白血病 Sp1 オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CMLはBCR-ABL融合遺伝子を有し、その恒常的なチロシンキナーゼ活性が、腫瘍形成に寄与することで特徴づけられる骨髄増殖性疾患である。BCR-ABLは、9番染色体上のABL遺伝子と22番染色体上のBCR遺伝子が、染色体転座(Philadelphia染色体; Ph)により融合することで生じる。以前はほとんどの症例が急性期に移行し、予後不良の経過をたどる疾患であったが、TKIの登場以降、劇的に予後は改善している。しかし、発売して10年以上経過し、TKI治療の問題点が浮き彫りになっている。一つは、寛解を維持するためには終生TKI内服を継続しなければならないことである。近年、TKIの中止を試みる臨床試験が積極的に行われているが、再発例が多く、未だTKIを中止することのコンセンサスは得られていない。そのため長期内服、通院による患者の身体的、経済的負担や高騰する医療費が社会問題となっている。また、二つ目はTKI長期内服によりTKI耐性クローンが生じ治療抵抗性になる症例や初診時急性期の症例に対しては確立された治療法がないことである。その理由として、CML幹細胞の存在が寄与していると考えられている。白血球幹細胞の中でもCML幹細胞は造血幹細胞を起源とする(Huntly BJ, et al. Cancer cell 2004)。CML患者にTKIを投与するとBCR-ABLに依存する通常のCML細胞は増殖が停止するが、BCR-ABL不活化状態になったCML幹細胞は、正常造血幹細胞のようにサイトカインに反応し、自己複製し、CMLの病態を再現してしまう。また、CML幹細胞は生来、BCR-ABL非依存性のためTKI低感受性であるとも考えられている(Corbin AS, et al. JCI 2011, Michor F, et al. Nature 2005)。CML根治治療の開発には、CML幹細胞を含めたCML分子病態の解明、TKI以外の薬剤の併用が必要不可欠であると考えられる。

われわれの検討により、転写因子Sp1はCMLにおいてオートファジー関連遺伝子の発現調整に重要な役割を担っていることが明らかになっており、CMLにおける新たな治療標的の候補と考えられた。

### 2. 研究の目的

申請者は、CML細胞におけるオートファジーの役割を明らかにするために、BCR-ABL特異的に認識できる抗体の作成に着手した。従来の研究ではBCR-ABLは細胞質に局在するというのが通説になっているが、過去の研究の手法を見ても正常なBCRやc-ABLの影響を排除できない状況下で実験が行われている。申請者が作成した抗体ではBCR-ABLを特異的に検出することが可能である。また、従来の研究で、CMLとオートファジー、あるいはBCR-ABLとオートファジーの関連を示した報告はあるが、オートファジーフラックスを正しく評価できておらず、「オートファジーの促進」という言葉の定義が正確でない論文が多数見受けられる。申請者は、東京大学の水島教授らが開発したベクター(Kaizuka T, et al. Mol Cell 2016)を用いてCML細胞におけるオートファジーフラックスを正確に定性できる実験系を樹立した。その系を用いて、BCR-ABLとオートファジーの関係、CMLにおけるオートファジーの生物学的な意義も明確にしていくことが可能になる。これらの実験系を用いて転写因子Sp1がオートファジーを介して、CML細胞の生存へ寄与するメカニズムを明らかにし、新規根治戦略の開発に繋げていくことである。

### 3. 研究の方法

(1)上記の申請者が作成した実験系を使用して予備実験を行った。その結果、Sp1を薬剤で阻害するとオートファジーが誘導されることが分かっている。そのときのオートファジー関連分子の発現変化等を検討する。

(2)転写因子Sp1をノックダウンさせたBCR-ABL陽性細胞株のsublineを作成し、マイクロアレイを行う。特にオートファジー関連遺伝子の発現変化を調べる。

### 4. 研究成果

(1)CML由来の細胞株に対し、Sp1を阻害することで知られるmithramycinやarsenic trioxide (ATO)を作用させると、オートファジーが誘導された。また、BCR-ABLの分解が促進され、アポトーシスが誘導された。これにクロロキンを加えると、BCR-ABLの分解、アポトーシスの誘導が抑制された(図1)。この結果より、CML細胞においてはオートファジーがBCR-ABLの分解に関与しており、細胞の生存に寄与していることが明らかになった。

(2)マイクロアレイを行った結果、Sp1をノックダウンさせたsublineではオートファジー関連遺伝子の発現変化が見られた。実際にリアルタイムPCR等でも同様の結果が得られた。Sp1はオ

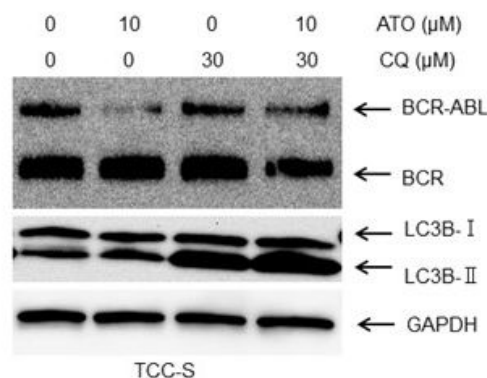


図1.BCR-ABL陽性細胞株TCC-SにATOを作用させるとオートファジーが促進され、BCR-ABLが分解されるがクロロキンをライソソームの融合を阻害するとBCR-ABLが蓄積している。

この結果より、CML細胞においてはオートファジーがBCR-ABLの分解に関与しており、細胞の生存に寄与していることが明らかになった。

オートファジー関連遺伝子の発現を変化させることにより、CML 細胞の生存に寄与していることが示唆された。

(3)さらに CML に対し、ATO のメカニズムを検証していくと、CML 細胞に ATO を作用させるとオートファジーが促進することによって BCR-ABL が分解される。そこにクロロキンを併用し、ライソソームの融合を阻害すると BCR-ABL の分解が阻害される。オートファジーで分解されるタンパク質は細胞質に局在する必要がある。以前から BCR-ABL は細胞質に局在し(Dhut S, et al. Leukemia 1990 など)、シグナル伝達をすると信じられていたが、public database で BCR-ABL の構造を見ると、ABL 側に 3 つの核移行シグナル、1 つの核外輸送シグナルを有している。正常な c-ABL1 は核移行シグナル付近に、キャリアタンパク質 14-3-3 が結合して、核移行シグナルの露出が防がれ、細胞質に留められている。DNA 損傷などで JNK (c-Jun N-terminal kinase) の活性化が起こると 14-3-3 のリン酸化によって c-ABL1 から解離し、核移行シグナルが露出し、c-ABL1 が核に移行する(Yoshida K, et al. Nat cell biol 2005)。

実際、過去の論文を見返してみると BaF3 細胞株に BCR-ABL をベクターで外因性に強発現させた人工的な系を用いて検証したものがほとんどで、内因性に発現する BCR-ABL の細胞内局在を自ら検証する必要があると考えた。そこで BCR-ABL 陽性 CML 急性転化細胞株の核タンパク質と細胞質タンパク質を分離抽出し、immunoblot を行うと、いずれの細胞株でも、核成分により多く BCR-ABL が含まれることが明らかになった(図 2)。従来の報告と異なる結果であるため、別な実験系でも確認する必要があると考え、免疫蛍光染色、共焦点顕微鏡による観察を計画した。これまでの論文を見ると、c-ABL1 や BCR に対する抗体を用いて行っており、この実験系では正常なアリル由来の c-ABL1 や BCR と BCR-ABL を区別することは不可能である。そこでわれわれは、CML 細胞株の BCR-ABL 融合遺伝子の BCR の切断点を調べ、主な変異である e14a2 型の BCR-ABL 融合タンパク質のみに存在する特異的な抗原ペプチドを作成し、rabbit 由来の BCR-ABL 特異的抗体を作成することに成功した。実際にこの抗体を用いて免疫蛍光染色を行うと BCR-ABL 陽性細胞のみを特異的に認識することができる。興味深いことに CML 細胞株では定常状態では BCR-ABL が主に核に局在しており、ATO でオートファジーを誘導し、クロロキンを併用すると細胞質内に BCR-ABL が蓄積することも明らかになった(図 3)。従って、BCR-ABL 細胞内局在を制御するメカニズムを明らかにすることが、われわれが追求してきた CML 根治療法の開発につながるものと考えられた。今後さらに研究を進めていきたい。

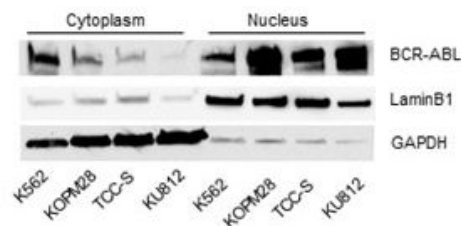


図2. BCR-ABL 陽性細胞株において細胞質成分、核成分に分離し immunoblot を行うと、BCR-ABL が核成分に多く含まれる。

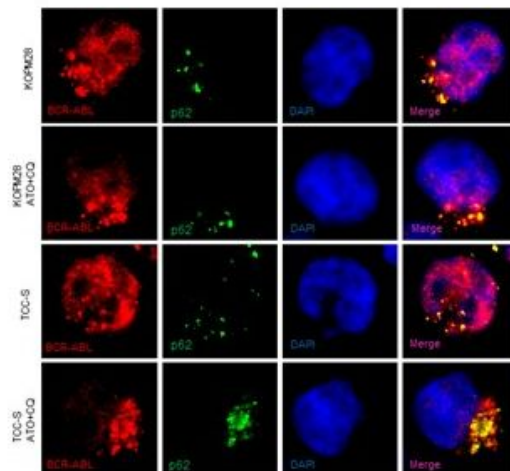


図3. 自作の BCR-ABL e14a2 に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色。ATO とクロロキンを併用すると核から細胞質へ BCR-ABL が移動し、オートファゴソームに蓄積している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1) Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Furukawa Y.: Cell adhesion-induced phosphorylation and inactivation of EZH2 confer drug resistance to acute myeloid leukemia cells.

Int J Hematol. (査読あり)

107: 383-385, 2018.

DOI: 10.1007/s12185-017-2376-0

2) Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Osada N, Izumi T, Yasui H, Kawase T, Ichinohe T, Furukawa Y. Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide.

Cancer Res. (査読あり)  
78 : 1766-1778, 2018.  
DOI; 10.1158/0008-5472.CAN-17-2446

3) Saito S, Kikuchi J, Koyama D, Sato S, Koyama H, Osada N, Kuroda Y, Akahane K, Inukai T, Umehara T, Furukawa Y.: Eradication of Central Nervous System Leukemia of T-Cell Origin with a Brain-Permeable LSD1 Inhibitor.  
Clin Cancer Res. (査読あり)  
25: 1601-1611, 2019.  
DOI; 10.1158/1078-0432.CCR-18-0919

4) Wada T, Kikuchi J, Koyama D, Honda H, and Furukawa Y.: Lysine-specific Demethylase 1 Accelerates Oncogenesis in p53 Heterozygous Mice via Transcriptional Repression of the Residual Trp53 Allele.  
Leukemia Res. 82: 29-32, 2019.  
DOI; 10.1016/j.leukres.2019.05.008

5) Kikuchi J, Hori M, Iha H, Toyama-Sorimachi N, Hagiwara S, Kuroda Y, Koyama D, Izumi T, Yasui H, Suzuki A, and Furukawa Y.: Soluble SLAMF7 Promotes the Growth of Myeloma Cells via Homophilic Interaction with Surface SLAMF7.  
Leukemia, in press.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。