

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15273

研究課題名(和文) 中鎖脂肪酸誘導体による慢性骨髄性白血病の耐性克服機構の解明

研究課題名(英文) Breakthrough for overcoming drug resistance in chronic myeloid leukemia by medium-chain fatty-acid derivatives

研究代表者

篠原 悠 (Haruka, Shinohara)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：10787047

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)：本研究では、慢性骨髄性白血病の薬剤耐性克服に有用な創薬シーズとして中鎖脂肪酸誘導体の標的分子の同定とヒトに適用可能な投与溶媒の検討を行った。中鎖脂肪酸誘導体に結合するタンパク質の解析を行い、2つの分子が特に中鎖脂肪酸誘導体の抗白血病効果に関わることを明らかにした。また、中鎖脂肪酸誘導体を包接化合物とすることで溶解性を改善することができた。さらに、薬剤耐性細胞においても中鎖脂肪酸誘導体が有効であることを確認した。薬剤耐性細胞における抗白血病効果の作用機序を検証する中で、薬剤耐性細胞では原因遺伝子BCR-ABLの翻訳産物(タンパク質)がオートファジーによる分解を受けにくくなっている現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BCR-ABLに対する分子標的治療薬は慢性骨髄性白血病の治療成績を飛躍的に向上させたが、BCR-ABL遺伝子変異などによる耐性獲得細胞に対しては治療効果が十分ではなく、がんの根治には至っていない。また、薬価が高額であり、長期服用による医療経済の圧迫も問題となってきた。中鎖脂肪酸誘導体は、既存薬とは全く異なる作用機序で耐性獲得細胞に対しても有効で、かつ安価に合成可能な新規治療薬候補化合物である。本研究では標的分子の同定と溶解性の改善を行い、創薬開発に必須となるデータが得られた。また、薬剤耐性細胞におけるBCR-ABLタンパク質の安定性増加はこれまでに報告がなく、本研究で新たに得られた知見である。

研究成果の概要(英文)：I previously synthesized and found medium-chain fatty-acid derivatives as novel anti-cancer agents. In this study, I identified the target molecules of medium-chain fatty-acid derivatives and investigated method for improving solubility. The binding proteins of medium-chain fatty-acid derivatives were analyzed and 2 molecules could bind to medium-chain fatty-acid derivatives. I also found that inclusion compound formation is one of the methods for improving the solubility of the medium-chain fatty-acid derivatives with solvent which is applicable to human beings.

Medium-chain fatty-acid derivatives were effective for drug resistant chronic myeloid leukemia (CML) cells. I found that autophagy contributes to the level of BCR-ABL protein expression, and the autophagic degradation is impaired in drug resistant CML cells. These findings suggest that AIC-47 might be a promising agent for overcoming the resistance of CML.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：慢性骨髄性白血病 中鎖脂肪酸 薬剤耐性 エネルギー代謝 ドラッグデリバリーシステム 標的分子 同定 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

がんのドライバー遺伝子産物を標的とした分子標的治療薬の奏効例が数多く報告され、ドライバー分子はがん治療の有用な標的候補とされてきた。特に慢性骨髄性白血病 (CML) においては、BCR-ABL を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が著しい治療成績の向上をもたらした。しかしながら、ドライバー遺伝子の変異による耐性獲得細胞に対しては治療効果が低く、がんの根治には至っていない。また、分子標的治療薬は薬価が高額であり、長期服用による医療経済の圧迫も問題となっている。

これまでの研究で、より有効かつ安価な新規治療薬候補として中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 を得た。AIC-47 は、がん細胞特異的な殺細胞効果を示し、BCR-ABL の発現を抑制する作用やエネルギー代謝機構を破綻させる作用を有する。これらの作用は既存薬の TKI とは全く異なっており、TKI 耐性細胞に対しても有効性を確認できたことから、耐性克服に有用な創薬シーズであると考えられた。しかしながら、中鎖脂肪酸誘導体の標的分子が同定できていないこと、脂溶性が高くヒトに適用可能な投与溶媒を見出せていないことが創薬に向けた障壁となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤耐性を獲得した CML に対して中鎖脂肪酸誘導体の詳細な抗がん作用機構を明らかにし、ドライバー分子 BCR-ABL を標的としない新たな治療薬の創出を目指した基礎研究を行うことを目的として実施した。以下の2点を目的達成のための研究課題とした。

(1) 高い抗がん活性を有する中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 の標的分子を同定し、既知の AIC-47 の作用機序との関連性を解明する。

(2) ヒトに応用可能な最適化された薬物送達システム (Drug Delivery System; DDS) に搭載した AIC-47 を用い、抗がん作用を検証する。

3. 研究の方法

(1) 中鎖脂肪酸誘導体の標的分子同定

低分子化合物の標的分子同定には、表面修飾を施したビーズに化合物を固定化し、プルダウンアッセイを行う方法が過去に報告されている。本研究では AIC-47 を固定化した磁気ビーズを用いて解析を行った。ヒト CML 細胞株 K562 の細胞抽出液とビーズ上の AIC-47 との結合反応を行い、結合したタンパク質を溶出した。溶出後のタンパク質について電気泳動を行い、質量分析にて標的タンパク質の解析を行った。

質量分析で同定された分子から真の標的分子を得るために、溶出後のタンパク質について特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、標的分子の絞り込みを試みた。さらに候補分子について shRNA を設計し、ノックダウンによるバリデーション実験を行った。

(2) AIC-47 含有 DDS 製剤の検討

白血病患者を対象にすでに臨床試験が行われているドキソルビシン含有リポソーム製剤の処方参考に、最適化されたリポソームを DDS として用いることができるかどうかを検証した。

調製した DDS 製剤を K562 細胞に添加し、抗がん活性を評価した。また、内包していない状態の AIC-47 の殺細胞効果との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 中鎖脂肪酸誘導体の標的分子同定

質量分析による結合タンパク質の解析結果として、284 個のタンパク質が AIC-47 に結合していることを明らかにした。AIC-47 と類似の構造を有しながらまったく殺細胞効果を示さない AIC-55 をネガティブコントロールとして同じ実験を行うことで、AIC-47 特異的に結合しているタンパク質 20 個を得ることができた。20 個のタンパク質について特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、5 個のタンパク質が特に AIC-47 選択的に結合していることを見出した。5 個の分子について shRNA を設計し、各分子をノックダウンした結果、2 つの分子が特に抗白血病効果に関与していることを明らかにした。

本研究で明らかになった 2 つの分子はいずれも細胞内のエネルギー代謝に関わる酵素であり、AIC-47 の作用機序の一部と類似の機能を有していた。また、これらのノックダウンにより CML 細胞の増殖が著しく抑制されることはこれまでに報告がなく、本研究で初めて得られた知見である。今後はこれらの分子の機能をより詳細に解析し、中鎖脂肪酸誘導体の根本的な作用機序を解明することで臨床応用に向けた開発を進める予定である。

(2) AIC-47 含有 DDS 製剤の検討

ドキシソルピシンやパクリタキセルなどの既存の製剤処方参考に、ヒトに投与可能な DDS 製剤の作製を行った。リポソーム製剤では AIC-47 が脂質膜を通過してしまい、内包が難しいことがわかった。そこで、包接化合物としたところ水に可溶となり、ヒトに投与可能な緩衝液に対しても溶解性が著しく改善した。また、溶解後の分解時間が延長し、安定性も増大することを確認した。

(3) TKI 耐性細胞における AIC-47 の薬効評価

TKI 耐性細胞における AIC-47 の殺細胞効果を評価した。AIC-47 は BCR-ABL の変異の有無や導入部位に関わらず薬効を示すことを明らかにした。患者由来細胞においても有効であり、TKI と同等の増殖抑制効果が認められた。その作用機序として、PKM 遺伝子により制御されるエネルギー代謝機構の破綻が関与していることを解明した。CML 細胞は正常細胞とは異なり、PKM 遺伝子の働きにより TCA サイクルを介した酸化的リン酸化よりも解糖系が優位な状態になっており、このエネルギー代謝機構は BCR-ABL の変異に関係なく成立していることを初めて明らかにした。また、AIC-47 はこの糖代謝機構に作用し、白血病細胞内のエネルギーを枯渇状態にすることでがん細胞特異的な殺細胞効果を示していると考えられた。

さらに TKI 耐性細胞を移植したマウスモデルを用いて AIC-47 の薬効を評価した。In vivo における中鎖脂肪酸誘導体の効果を検証した実験は本研究が初めてである。AIC-47 投与群では BCR-ABL の mRNA 発現レベルが有意に低下し、CML 患者でみられる特徴的な臨床所見の 1 つである脾腫もほぼ正常レベルまで改善することを明らかにした (図 1; 文献)。また、AIC-47 投与群において体重減少や骨髄抑制などの副作用は観察されなかった。

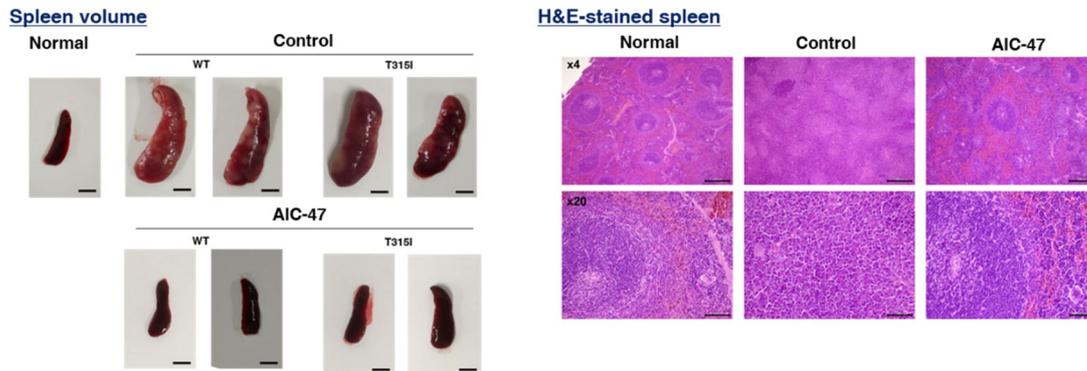


図 1: AIC-47 投与後の CML モデルマウスにおける脾腫の改善

(4) TKI 耐性細胞における BCR-ABL の発現制御メカニズムの解明

(3) で TKI 耐性細胞における AIC-47 の作用機序を検証する中で、CML において最も強い TKI 耐性を示す T315I 変異を持つ BCR-ABL タンパク質は、野生型 (wild-type; WT) や他の変異を有する BCR-ABL とは発現制御メカニズムが異なっていることを見出した。BCR-ABL タンパク質はオートファジーによって分解を受けることで細胞内での発現量が制御されているが、T315I 変異細胞においてはオートファジーによる分解が起きにくくなっていることを解明した。オートファジーは Bcl-2 ファミリータンパク質と Beclin-1 タンパク質との結合が解離することでシグナルが誘導されるが、T315I 変異細胞においては Bcl-2 と Beclin-1 が WT や他の変異細胞と比較してより強く結合しており、BCR-ABL の発現が安定化されていることを明らかにした (図 2; 文献)。これまでに T315I 変異は TKI の結合が阻害されるゲートキーパー変異としての機能しか知られていなかったが、本研究の成果から BCR-ABL タンパク質の安定化によっても耐性に寄与している可能性が示唆された。

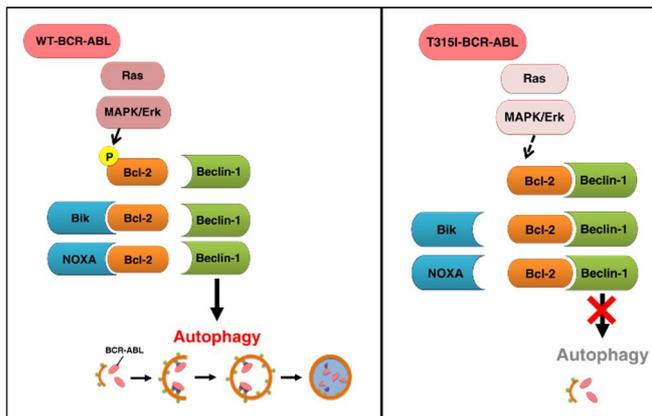


図 2: 変異による BCR-ABL の発現制御機構の違い

ことを明らかにした (図 2; 文献)。これまでに T315I 変異は TKI の結合が阻害されるゲートキーパー変異としての機能しか知られていなかったが、本研究の成果から BCR-ABL タンパク質の安定化によっても耐性に寄与している可能性が示唆された。

(5) AIC-47 による BCR-ABL の発現抑制メカニズムの解明

(4)で BCR-ABL タンパク質がオートファジーによる発現制御を受けることを明らかにし、過去の研究で AIC-47 がオートファジーを誘導する作用を見出していたことから、AIC-47 による BCR-ABL の発現抑制メカニズムにオートファジーも関与していることが示唆された。AIC-47 を添加した細胞では BCR-ABL タンパク質の発現が減少するが、オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) やクロロキン (CQ) を併用することでその発現抑制が一部レスキューされることを確認した (図 3; 文献)。これまでの研究では中鎖脂肪酸誘導体が BCR-ABL の転写を制御することでその発現を抑制していると考えていたが、本研究でオートファジーによるタンパク質の分解も作用機序の 1 つであることを明らかにした。

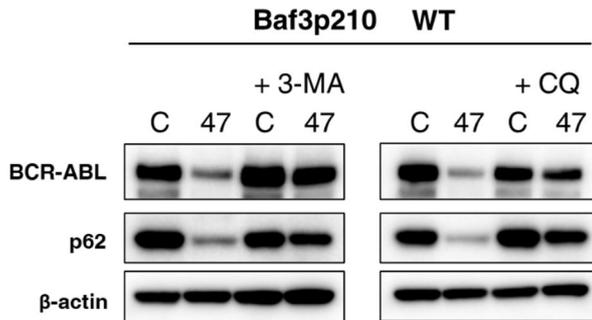


図 3: オートファジー阻害剤と AIC-47 の併用による BCR-ABL の発現変化 (C: Control, 47: AIC-47)

<参考文献>

Shinohara H, Sugito N, Kuranaga Y, Heishima K, Minami Y, Naoe T, Akao Y: Potent antiproliferative effect of fatty-acid derivative AIC-47 on leukemic mice harboring BCR-ABL mutation. *Cancer Sci.* 110 (2), 751-760 (2019).

Shinohara H, Minami Y, Naoe T, Akao Y: Autophagic degradation determines the fate of T315I-mutated BCR-ABL protein. *Haematologica.* 104 (5), e191-e194 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shinohara H, Sugito N, Kuranaga Y, Heishima K, Minami Y, Naoe T, Akao Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 Potent antiproliferative effect of fatty acid derivative AIC 47 on leukemic mice harboring BCR ABL mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 751-760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13913.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara Haruka, Minami Yosuke, Naoe Tomoki, Akao Yukihiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Autophagic degradation determines the fate of T315I-mutated BCR-ABL protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e191-e194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2018.194431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tokumaru Yoshihisa, Tajirika Toshihiro, Sugito Nobuhiko, Kuranaga Yuki, Shinohara Haruka, Tsujino Takuya, Matsuhashi Nobuhisa, Futamura Manabu, Akao Yukihiro, Yoshida Kazuhiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Synthetic miR-143 Inhibits Growth of HER2-Positive Gastric Cancer Cells by Suppressing KRAS Networks Including DDX6 RNA Helicase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1697-1697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20071697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsujino Takuya, Sugito Nobuhiko, Taniguchi Kohei, Honda Ryo, Komura Kazumasa, Yoshikawa Yuki, Takai Tomoaki, Minami Koichiro, Kuranaga Yuki, Shinohara Haruka, Tokumaru Yoshihisa, Heishima Kazuki, Inamoto Teruo, Azuma Haruhito, Akao Yukihiro	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA 143/Musashi 2/KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2189-2199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue A, Kobayashi CI, Shinohara H, Miyamoto K, Yamauchi N, Yuda J, Akao Y, Minami Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Chronic myeloid leukemia stem cells and molecular target therapies for overcoming resistance and disease persistence.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 365-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2519-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuranaga Y, Sugito N, Shinohara H, Tsujino T, Taniguchi K, Komura K, Ito Y, Soga T, Akao Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 SRSF3, a Splicer of the PKM Gene, Regulates Cell Growth and Maintenance of Cancer-Specific Energy Metabolism in Colon Cancer Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19103012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi K, Sugito N, Shinohara H, Kuranaga Y, Inomata Y, Komura K, Uchiyama K, Akao Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Organ-Specific MicroRNAs (MIR122, 137, and 206) Contribute to Tissue Characteristics and Carcinogenesis by Regulating Pyruvate Kinase M1/2 (PKM) Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051276.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akao Y, Kumazaki M, Shinohara H, Sugito N, Kuranaga Y, Tsujino T, Yoshikawa Y, Kitade Y.	4. 巻 109
2. 論文標題 Impairment of K-Ras signaling networks and increased efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors by a novel synthetic miR-143.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1455-1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13559.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruka Shinohara, Yosuke Minami, Tomoki Naoe, Issay Kitabayashi, Yukihiro Akao
2. 発表標題 Potent antiproliferative effect of fatty-acid derivative on BCR-ABL-mutated leukemia.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原悠、杉戸信彦、倉永祐希、南陽介、直江知樹、赤尾幸博
2. 発表標題 イマチニブ耐性慢性骨髄性白血病に対する中鎖脂肪酸誘導体AIC-47の抗がん作用
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原悠、南陽介、直江知樹、赤尾幸博
2. 発表標題 Potent Anti-proliferative Effect of Fatty-acid Derivative AIC-47 on Ph-positive Leukemia
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------