

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16110

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病におけるプロテアソームの機能解明

研究課題名(英文)The role of proteasome in acute myeloid leukemia

研究代表者

正本 庸介(Masamoto, Yosuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30706974

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)：急性骨髄性白血病(AML)は難治性造血器腫瘍で、治療標的の発見が期待されている。マウスモデルを用いてAMLにおけるプロテアソーム活性の制御と、治療標的としての意義を検討した。AML細胞では正常細胞と比較して、特に高い増殖活性を有する細胞分画でプロテアソーム活性が高まっていた。AMLの治療に用いる化学療法剤に暴露すると、プロテアソーム活性が抑制され、オートファジーが活性化された。プロテアソーム活性を抑制したAML細胞は化学療法剤に対して抵抗性を獲得し、逆に活性を高めたAML細胞は感受性が高くなった。オートファジーを阻害することで、さらに感受性が高まり、治療標的となりうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病(AML)細胞では選択的なタンパク分解系であるプロテアソーム活性が亢進しているものの、抗がん剤などのストレスに暴露されるとプロテアソーム活性を抑制してオートファジーを活性化することでそれに対して抵抗性を獲得することが明らかになった。またオートファジーとプロテアソームの活性を同時に阻害してこの機序を阻害することでAML細胞の化学療法感受性が著しく亢進し、AMLの新たな治療標的になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia (AML) is a refractory hematopoietic tumor, of which novel therapeutic target are expected to be discovered. Using a mouse model, we investigated the regulation of proteasome activity in AML and its significance as a therapeutic target. Proteasome activity was increased in AML cells, especially in the cell fraction with high proliferative activity, as compared to normal cells. Exposure to chemotherapeutic agents used for AML treatment suppressed proteasome activity and activated autophagy. AML cells with reduced proteasome activity acquired resistance to chemotherapeutic agents, whereas AML cells with increased proteasome activity became more sensitive to these drugs. It was suggested that inhibition of autophagy would further increase sensitivity and could be a therapeutic target.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 プロテアソーム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室では、白血病幹細胞(LSC)の維持機構を明らかにするために、MLL 融合遺伝子 AML モデルの LSC を用いて解析を行い、LSC が産生する TNF が NF- $\kappa$ B シグナルを活性化し、NF- $\kappa$ B シグナルが TNF の産生を促すポジティブ・フィードバックが、LSC の維持に重要であることを明らかにした。ここで AML の LSC ではプロテアソーム活性が亢進し、NF- $\kappa$ B シグナルの抑制制御因子である I $\kappa$ B が分解されることが重要であることを示したが、AML を含め、悪性腫瘍におけるプロテアソームの活性制御機構は不明で、プロテアソーム活性の変化が AML の性質に与える影響も、ほとんど未知であった。更に膀胱癌を初めとする固形腫瘍では、がん幹細胞はむしろプロテアソーム活性が低下しており、AML 細胞、特に LSC 分画においてプロテアソームの活性が亢進している機序と、幹細胞性との関わりを明らかにすることができれば、AML とその LSC の特徴を明らかにできるのではないかと考えた。AML 細胞においては、LSC 分画の細胞はもとよりプロテアソーム活性が亢進しており、その活性は細胞にストレスを与えることで変化し、AML の性質にプロテアソーム活性が関与していることが示唆された。そこでプロテアソームの AML の病態形成における作用機序を解明するために、本研究を開始することにした。

### 2. 研究の目的

ユビキチン・プロテアソーム系は酵母から哺乳類までよく保存され、特定のタンパク質を選択的に標識して分解することで、細胞周期制御・シグナル伝達・免疫応答・細胞増殖・DNA 修復など細胞の様々なはたらきを制御している。プロテアソームの作動機序については次第に明らかにされつつあるが、プロテアソームの量や機能がどのように制御されているかについてはほとんど知られていない。またその他のタンパク質分解メカニズムとして、非選択的な分解系であるオートファジーも知られているが、細胞がどのようにこの両者を使い分けているかについても不明な点が多い。プロテアソームは腫瘍に対する治療標的候補として古くから注目され、プロテアソーム阻害薬である bortezomib は、多発性骨髄腫、マンツル細胞リンパ腫に対して広く用いられているが、その他の腫瘍では臨床的に明らかな効果は見られず、これまでのところプロテアソームの治療標的としての意義も確立していない。

急性骨髄性白血病(AML)は難治性疾患であり、近年のゲノム解析技術の進歩で様々な遺伝子異常が明らかにされたものの、これまでのところ治療成績の向上にはほとんどつながっていない。AML の病態解析研究の多くは、遺伝子変異・染色体転座に代表されるゲノム異常、遺伝子発現パターンの異常などを切り口として行われてきた。しかし AML ではさらに、プロテアソーム系を初めとする様々な細胞機能、代謝、腫瘍周囲環境などの様々な異常が互いに影響して複合的にその病態を形成しており、多彩なタンパク質の発現制御に関わるプロテアソームは、重要な役割を果たしている可能性が高い。たとえば申請者の所属する研究室で明らかにしてきたように、難治性 AML の代表格である MLL 融合 AML モデルマウスの白血病幹細胞において、プロテアソームの活性が高く維持されることによって NF- $\kappa$ B シグナル抑制因子 I $\kappa$ B の分解が促進され、NF- $\kappa$ B シグナルの活性が維持される。その結果、腫瘍周囲環境に対して多彩な作用を有し、白血病の病態形成に関わる TNF の産生が亢進する。TNF は周囲に対する影響のみならず白血病幹細胞自身のプロテアソーム活性の維持に寄与し、ポジティブ・フィードバック・ループを形成する。

これまで AML でもプロテアソームが治療標的になりうるかどうかを明らかにするための研究が行われてきたが、ほとんどでプロテアソームに比較的特異性が高い阻害剤であると考えられている bortezomib が用いられてきた。AML 細胞は多くの場合 *in vitro* では bortezomib に対して感受性を示すが、臨床試験においては必ずしもその有効性は再現されない。理由として、bortezomib は速やかに代謝されるために *in vivo* での動態が *in vitro* での実験環境と乖離しやすいことなどが指摘されていたが、最近 bortezomib はプロテアソーム阻害作用ではなく、がん遺伝子 FLT3-ITD のオートファジー依存的な分解の促進によって抗 AML 効果を発揮することが報告され、AML におけるプロテアソームの意義を明らかにするために、bortezomib だけを用いた研究には特異性・効果も含め、改めて限界があることが示された。

本研究においては、AML の病態形成、および化学療法抵抗性獲得におけるプロテアソームの役割に注目し、分子遺伝学的な解析を駆使してその分子機序を明らかにするとともに、プロテアソーム活性を制御することによって AML の治療標的の可能性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### a) AML の様々な状況におけるプロテアソーム活性変化の機序の解明

正常の造血幹・前駆細胞と、様々な種類の AML 細胞、正常細胞に AML の原因となる融合遺伝子を導入して腫瘍化する過程の細胞を用いて、プロテアソーム活性の差異・変化を検討した。

AML におけるプロテアソーム活性がどのように制御されているかを明らかにし、治療標的になりうるかどうかを検討するために、プロテアソーム活性のレポーターコンストラクト(GFP-C-terminus of ornithine decarboxylase (cODC)、あるいは dsRed-cODC)を導入した複数のマウス AML 細胞を用いて、プロテアソーム活性をモニターできるマウス AML モデルを作製し、プロテアソーム活性の違いによる LSC 活性の違い、また細胞障害性薬剤を投与した後のプロテアソーム活性の変化を調べた。またプロテアソーム  $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 5 の各サブユニットの活性の変化、および各構成因子の発現量、サブユニットの結合性の変化、SDS 添加による 19S サブユニットによるプロテアソーム活性の抑制の解除などの方法を用いて、AML におけるプロテアソーム活性亢進の機序を調べた。

#### b) プロテアソーム活性変化が AML の病態に及ぼす効果の解明

Bortezomib を用いず遺伝学的にプロテアソーム活性制御可能な系として、Psmc1 (proteasome activator complex subunit 1), Psmb5 (Proteasome 20S Subunit Beta 5)を導入してプロテアソーム活性を高めた、あるいは Psmb5 peptidase dead mutant (T60A)を導入してプロテアソーム活性を抑制した AML 細胞を作製し、細胞増殖や細胞障害性薬剤に対する感受性の違いを調べた。

c) プロテアソーム活性制御の、AML における治療標的化の可能性の検証

腫瘍細胞は生存をオートファジーに依存しており、抗がん剤に暴露されるとオートファジーが活性化されることが報告されている。われわれは抗がん剤抵抗性を示す AML の幹細胞は、オートファジーを抑制すると減少するデータを得ている。オートファジーの抑制は腫瘍の治療標的として有望視されているが、プロテアソームの活性を同時に制御することによって、さらに強い治療効果を得られる可能性があり、このコンセプトを *in vitro* でのオートファジーの抑制とプロテアソーム活性化によって検証した。

#### 4. 研究成果

正常造血細胞に MLL-AF9 あるいは MLL-ENL 融合遺伝子、白血病関連遺伝子 EVI1 を発現することによって AML 細胞を作製した。特に MLL 転座を有する AML 細胞においては正常造血細胞と比較してプロテアソーム活性が非常に高まっていた。

プロテアソーム活性をリアルタイムにモニターできる細胞を複数の AML モデルで作製したところ、全てのモデルにおいて、LSC はもとより AML の多くの細胞で、プロテアソーム活性が亢進していた。細胞周期のプロテアソーム活性の関連について調べたところ、より増殖活性の高い分画でプロテアソーム活性が高まっていた。AML に対する標準的な治療薬であるシタラピンやダウノマイシンに暴露することによって、プロテアソーム活性は著明に抑制された。

また遺伝学的にプロテアソーム活性を制御した AML 細胞を作製したところ、プロテアソーム活性を抑制した AML 細胞は、抗がん剤に対して抵抗性を獲得した。細胞周期に入っている細胞がわずかに減少したものの、抗がん剤に対する抵抗性獲得の程度は明らかに強く、細胞周期以外の要因があると考えられた。逆にプロテアソーム活性を高めた AML 細胞は、化学療法剤に対して感受性が高くなることわかった。これらの事実から、AML 細胞ではプロテアソーム活性が亢進しているものの、抗がん剤などのストレスに暴露されるとプロテアソーム活性を抑制することでそれに対して抵抗性を獲得すること、この機序を阻害することが AML の新たな治療標的になりうる可能性が示唆された。

次に AML におけるプロテアソーム  $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 5 の各サブユニットの活性の変化、および各構成因子の発現量、サブユニットの結合性の変化を調べた。Psmb4 や Psmb5 の発現が AML において亢進しており、特に Psmb5 は高発現がプロテアソーム活性の亢進をもたらすことから、これがプロテアソームの活性化の一因になっていると考えられた。一般的に細胞抽出物を *in vitro* で SDS 処理すると、19S プロテアソームによる抑制制御が取り除かれてプロテアソームの活性を担う 20S プロテアソームの開口部が開き、*in vitro* で測定可能なプロテアソーム活性が高まることが知られている。正常造血前駆細胞では SDS 処理により活性の上昇がみられるものの、MLL 融合遺伝子 AML 細胞では SDS による活性の上昇は全く見られなかった。このことから、AML 細胞では 19S による抑制制御が低下することでプロテアソーム活性が亢進している可能性も考えられ、AML におけるプロテアソーム活性の亢進は複合的な機序によることが示唆された。

細胞障害性薬剤の処理によって、AML 細胞のオートファジーが活性化されることが明らかになった。つまり抗がん剤などのストレスに暴露されると、AML 細胞はタンパク分解をプロテアソームからオートファジーに切り替えることが示唆された。オートファジーを薬理的に阻害すると同時にプロテアソーム活性を高める、つまり AML による細胞障害性ストレス対応機序を両方遮断することで、細胞障害性薬剤に対する感受性が著しく亢進し、AML における新しい治療標的になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ebisawa K, Masamoto Y, Tokushige J, Nishi H, Honda K, Hinata M, Toyama K, Nangaku M, Kurokawa M.	4. 巻 98
2. 論文標題 Tocilizumab for focal segmental glomerulosclerosis secondary to multicentric Castleman's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1995-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00277-019-03616-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 Takaoka K, Kawazu M, Koya J, Yoshimi A, Masamoto Y, Maki H, Toya T, Kobayashi T, Nannya Y, Arai S, Ueno T, Ueno H, Suzuki K, Harada H, Manabe A, Hayashi Y, Mano H, Kurokawa M.	4. 巻 33
2. 論文標題 .A germline HLTF mutation in familial MDS induces DNA damage accumulation through impaired PCNA polyubiquitination.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1773-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41375-019-0385-0.	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 Masamoto Y, Kurokawa M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Targeting chronic myeloid leukemia stem cells: can transcriptional program be a druggable target for cancers?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Investigation	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.21037/sci.2018.03.05	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 Uni M, Masamoto Y, Sato T, Kamikubo Y, Arai S, Hara E, Kurokawa M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by derepression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 191-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41375-018-0198-6.	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 Ebisawa K, Masamoto Y, Koya J, Shimura A, Shinozaki-Ushiku A, Toyama K, Nakazaki K, Kurokawa M	4. 巻 19
2. 論文標題 Long-term Remission by Brentuximab Vedotin for Non-mediastinal Gray Zone Lymphoma Refractory to Autologous Stem Cell Transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Lymphoma Myeloma Leuk.	6. 最初と最後の頁 e602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.clml.2019.08.017.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----