

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16121

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病におけるDUSP4の役割と治療応用

研究課題名(英文)Role of DUSP4 in AML and development of Novel Therapy

研究代表者

安東 恒史(Ando, Koji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：90571357

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)：FLT3-ITD 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病(AML)細胞株を用いた検討によって、PRMT5(タンパク質アルギニンメルトランスフェラーゼ)阻害薬による増殖抑制効果を確認した。DUSP4は細胞増殖に重要であるリン酸化シグナルの一つであるERK1/2などを脱リン酸化する酵素として知られている。PRMT5阻害によりDUSP4の発現が増加することを確認した。

FLT3-ITD阻害剤とPRMT5阻害剤は、相乗的にFLT3-ITD陽性AML細胞の増殖抑制効果を認めた。これにより、FLT3-ITD陽性AMLに対するPRMT5阻害剤とFLT3阻害剤の併用療法が有効である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FLT3-ITDを有するAMLは予後不良として知られている。FLT3阻害剤が開発されているが、その効果は限定的で新規分子標的薬の開発及び、FLT3阻害剤との併用療法の開発が必要である。

本研究でPRMT5阻害薬はFLT3-ITDシグナルの下流に位置するERK1/2のリン酸化を抑制することが知られている。DUSP4の発現を促し、細胞増殖抑制効果を発揮することを明らかにした。また、FLT3-ITDを有するAML細胞株を用いた検討でFLT3阻害剤とPRMT5阻害剤の相乗効果を明らかにした。今後、FLT3-ITDを有するAML症例に対する新規併用療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using FLT3-ITD AML cell lines, we confirmed the inhibitory effect of the PRMT5 inhibitor on AML cell proliferation. DUSP4 is a known enzyme that dephosphorylates ERK1/2, which is important for cell proliferation. The PRMT5 inhibitor increased DUSP4 expression.

We showed synergistically inhibited the proliferation of FLT3-ITD AML cells with the combination therapy of FLT3 inhibitor and PRMT5 inhibitor. This indicates that combination therapy with the PRMT5 inhibitor and the FLT3 inhibitor may be effective in FLT3-ITD AML.

研究分野：血液悪性腫瘍学

キーワード：AML FLT3-ITD DUSP4 PRMT5

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)はシタラピンとアントラサイクリン系薬剤を組み合わせた寛解導入療法により70-80%の寛解を得るようになった¹⁾。しかし、長期生存は40%に止まっており、治療成績を改善するため分子標的薬を初めとする新薬の開発が進められている。FLT3は造血前駆細胞の増殖を促進し、分化およびアポトーシスを抑制するチロシンキナーゼタイプの膜貫通型受容体である。FLT3の傍膜領域の重複変化(internal tandem duplication; ITD)や、キナーゼ領域の点突然変異(tyrosine kinase-domain mutation; TKD)がAMLの20-30%に認められ²⁾、いずれの変異でもFLT3のキナーゼ活性の自己抑制機能が失われるため、下流シグナルの恒常的な活性化を引き起こし、AMLの発症・進展に関与することが示唆され、FLT3野生型と比較してこうしたAMLは予後不良であることが示されている。そのため最近、FLT3阻害薬の開発が進み³⁾、FLT3-ITDを有するAML細胞において、*in vitro*の研究ではFLT3のリン酸化および下流シグナルを強く阻害することで目覚ましい抗腫瘍効果を示す。しかし、臨床試験においては単剤投与は十分な臨床効果を得ることができず、高用量シタラピンや骨髄移植も含めた治療戦略においてのみ、優位性を示している⁴⁾。

従って、FLT3-ITD AMLが予後不良であることを考慮すると、FLT3阻害剤に加えて何らかの新規薬剤または、FLT3阻害剤との何らかの新規分子標的薬との併用療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

研究代表者は、FLT3-ITD AML細胞株(MV4-11)をFLT3阻害剤AC220で処理し、RNA-sequenceにて網羅的に解析することで、FLT3-ITD AML細胞の増殖維持に重要な経路の同定を試みた。その結果、FLT3の下流シグナルであるERK1/2、STAT5のリン酸化を抑制する脱リン酸酵素の一つであるDual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatase-2 gene (DUSP4)が重要な役割を担っている可能性を示唆する結果を得た。さらに、PRMT5阻害剤(GSK3186000A)を用いた研究では、PRMT5阻害剤投与でDUSP4の発現が上昇することを示唆する報告を行った(ASH 2016)。

そこでDUSP4に注目して、DUSP4の発現を増強するPRMT5阻害剤の作用機序とFLT3阻害剤とPRMT5阻害剤の併用効果を検討した。

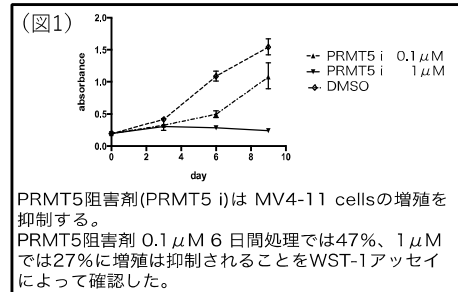
3. 研究の方法

- (1) MV4-11細胞株を用いてPRMT5阻害剤の細胞増殖抑制効果をWST-1アッセイで確認する。
- (2) PRMT5とDUSP4発現の関連を明らかにするために、PRMT5阻害剤またはshPRMT5を用いたPRMT5の機能抑制やノックダウンを行い、QT-PCRとWestern blottingでDUSP4の発現レベルを評価する。
- (3) DUSP4のpERK1/2リン酸化に与える影響をphosph flowで検討する。
- (4) shDUSP4でDUSP4をノックダウンしたMV4-11細胞を用い、FLT3阻害剤の細胞増殖抑制効果におけるDUSP4発現の影響をWST-1アッセイで検討する。
- (5) 様々濃度のFLT3阻害剤とPRMT5阻害剤の単剤投与または併用投与でMV4-11細胞株に対する細胞増殖抑制効果を評価し、両薬剤の細胞増殖抑制効果について相乗効果を認めるか検討する。

4. 研究成果

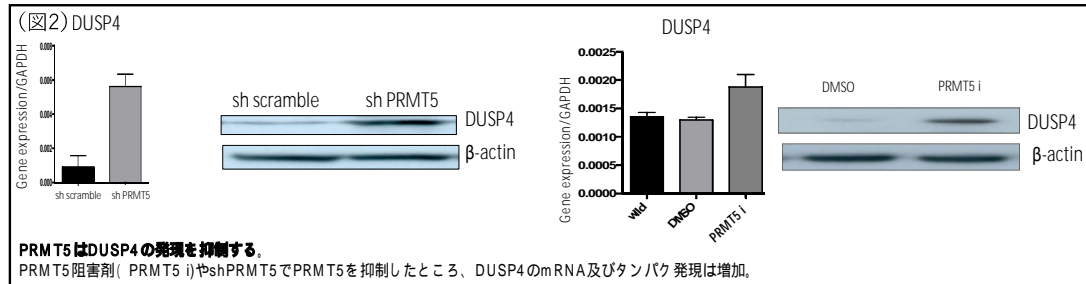
- (1) PRMT5によるMV4-11細胞株の細胞増殖抑制効果の検討(WST-1アッセイ)

PRMT5 阻害剤は濃度依存性に MV4-11 の細胞増殖抑制効果を示した (図 1)。



(2) PRMT5 と DUSP4 発現の関連を明らかにする (QT-PCR と Western blotting)

shPRMT5 または PRMT5 阻害剤(PRMT5i)で PRMT5 の発現を抑制したところ DUSP4 の発現は増加した (図 2)。

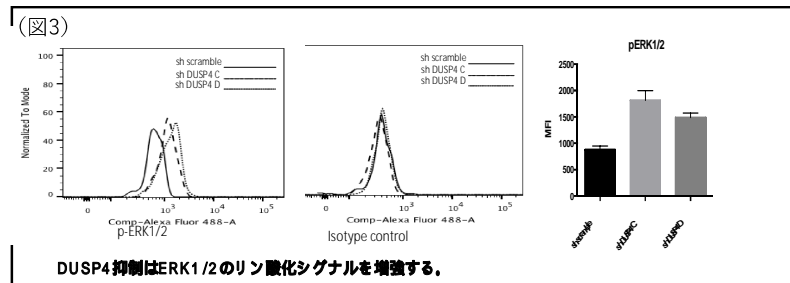


(3) DUSP4 の pERK1/2 リン酸化に与える影響を検討 (phosph flow)

DUSP4 を shDUSP4 でノックダウンしたところ、pERK1/2 シグナルは増強した (図 3)。

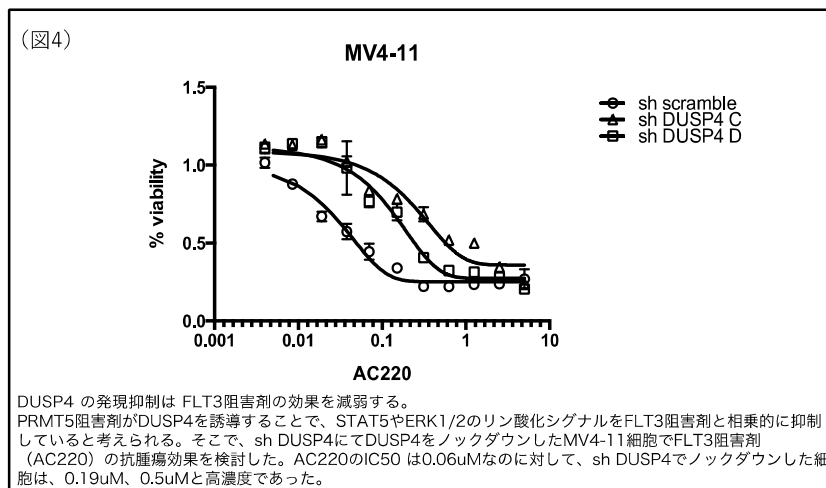
(4) DUSP4 の FLT3 阻害剤への影響の検討 (WST-1アッセイ)

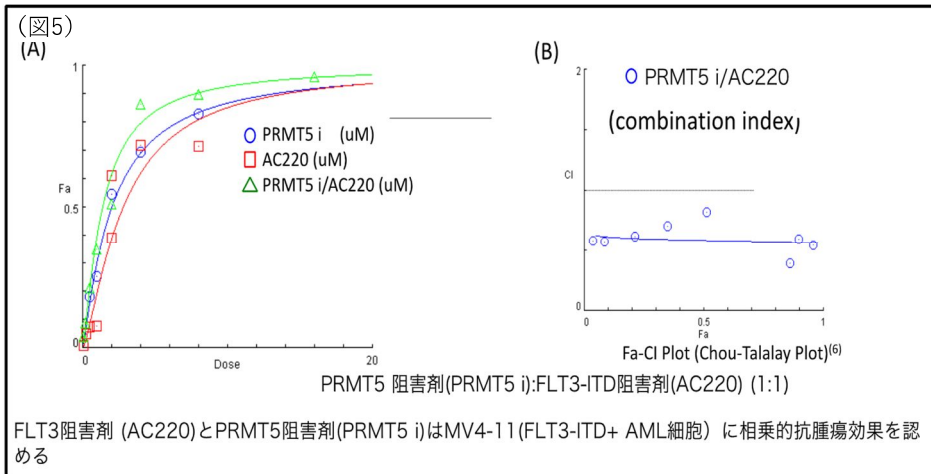
shDUSP4 で DUSP4 を抑制したところ、FLT3 阻害剤による MV4-11 の細胞増殖抑制効果が減弱した (図 4)。



(5) FLT3 阻害剤と PRMT5 阻害剤の相乗効果についての検討

FLT3阻害薬とPRMT5阻害薬はChou-plotのCombination Index(CI)でそれぞれの濃度でCI 1>であり、両薬剤は相乗効果を認めた (図 5)。





このように、FLT3-ITD 陽性 AML 細胞株を用いた検討によって、PRMT5 阻害薬による AML 細胞の増殖抑制効果と DUSP4 発現を増加させることを確認した。さらに、shRNA による DUSP4 発現抑制は FLT3-ITD 陽性 AML 細胞株特異的に細胞増殖抑制効果を発現することを確認した。この知見に基づき、FLT3-ITD 阻害剤と PRMT5 阻害剤による細胞増殖抑制効果を検討したところ、相乗的に FLT3-ITD 陽性 AML 細胞の増殖抑制効果を認めた。

本研究の結果、FLT3-ITD 陽性 AML 細胞株に対する PRMT5 阻害薬の増殖抑制効果を確認するとともに、その分子機序の一端を明らかにした。さらに新規の治療法として、FLT3-ITD 陽性 AML に対する PRMT5 阻害薬と FLT3-ITD 阻害薬の併用療法の可能性を示した。

- 1) Blood;2011;117(8):2358-65 Ohtake *et al*
- 2) Oncology Review;2012;6(1):64-74 Tiziana *et al*
- 3) Blood;2009;114(14):2984-92 Zarrinkar *et al*
- 4) Lancet Oncol;2017;18(8):1061-75 Perl AE *et al*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 蓬萊真喜子、佐藤信也、松尾真稔、岩永正子、田口正剛、糸永英弘、安東恒史、澤山 靖、今泉芳孝、波多智子、吉浦孝一郎、宮崎泰司	4. 巻 93
2. 論文標題 長崎原爆被爆者における骨髓異形成症候群の染色体解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 長崎医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 351~354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安東恒史, Pierre Harmard, Fan Liu, Na Man, Concepcion Martinez, 宮崎 泰司, Stephen Nimer
2. 発表標題 FLT3-ITD変異陽性AMLのサイトカインシグナル調整におけるPRMT5の役割
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓬萊真喜子、佐藤信也、松尾真稔、岩永正子、田口正剛、糸永英弘、安東恒史、澤山 靖、今泉芳孝、波多智子、吉浦孝一郎、宮崎泰司
2. 発表標題 長崎原爆被爆者における骨髓異形成症候群の染色体解析。
3. 学会等名 第59回原子爆弾後障害研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡 真知子、糸永 英弘、波多 智子、安東 恒史、澤山 靖、松尾 江美、高崎 由美、田口 潤、今西 大介、今泉 芳孝、對馬 秀樹、吉田 真一郎、城 達郎、森内 幸美、宮崎 泰司
2. 発表標題 実臨床におけるCMMLの臨床的特徴と予後について 長崎県下における後方視的解析
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
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
---------	---------