

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08847

研究課題名(和文) BCR-ABL細胞内局在制御によるCML根治治療の開発

研究課題名(英文) Development of CML eradicated therapy by regulating BCR-ABL subcellular localization

研究代表者

小山 大輔 (Koyama, Daisuke)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50741071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia; CML)は、BCR-ABL融合タンパク質の恒常的なチロシンキナーゼ活性によって引き起こされる骨髄増殖性疾患である。チロシンキナーゼ阻害剤(tyrosine kinase inhibitor; TKI)の開発により、劇的に予後は改善しているが、TKI抵抗性CMLの予後は未だ不良であり、新規治療法が開発が望まれる。CML急性期ではBCR-ABLが主に核内に局在することが治療抵抗性に寄与することを明らかにした。AMPKの活性化やオートファジー誘導によってBCR-ABLの細胞内局在を核内から細胞質へと移行することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CML患者は寛解を維持するためにはTKIを長期内服せざるを得ない。本研究成果により、急性期CMLではBCR-ABLの細胞内局在の異常がTKI抵抗性に寄与していると考えられた。今後、急性期CML症例やTKI抵抗性症例における治療戦略を考える上で重要な研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic myeloid leukemia (CML) is driven by the BCR-ABL oncoprotein, a constitutively active protein tyrosine kinase. Although tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have greatly improved the prognosis of CML patients, the emergence of TKI resistance is an important clinical problem, which deserves additional treatment options based on unique biological properties to CML cells. The BCR-ABL protein activates AMP-activated protein kinase (AMPK) for ATP production and the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy. BCR-ABL is detected in the nuclei of advanced-stage CML cells, in which ATP is sufficiently supplied via enhanced glucose metabolism. AMPK is hyperactivated under energy-deprived conditions and triggers autophagy via ULK1 phosphorylation and mTOR inhibition. This pathway represents a novel therapeutic vulnerability that may be useful for treating TKI-resistant CML.

研究分野：血液内科学

キーワード：慢性骨髄性白血病 オートファジー AMPK mTOR p53

### 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。白血病幹細胞の中でも 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

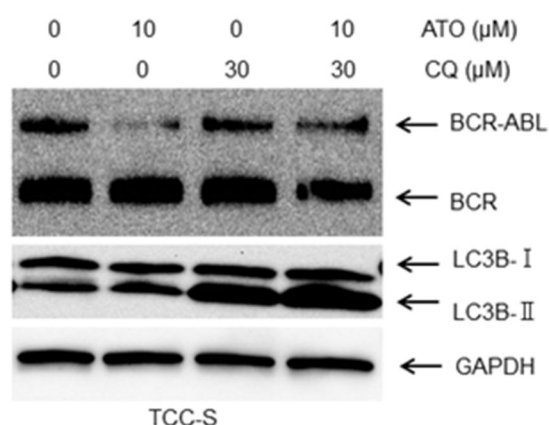


図1. BCR-ABL陽性細胞株TCC-SにATOを作用させるとオートファジーが促進され、BCR-ABLが分解されるがクロロキンでライソソームの融合を阻害するとBCR-ABLが蓄積している。

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。

申請者は CML に対し、急性前骨髄球性白血病の治療薬である Arsenic trioxide (ATO) が殺細胞効果を発揮することを発見し、そのメカニズムを検証していた (平成 29 年度 ~ 30 年度 若手研究 B の課題)。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 (図 1)。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 が結合していて、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、

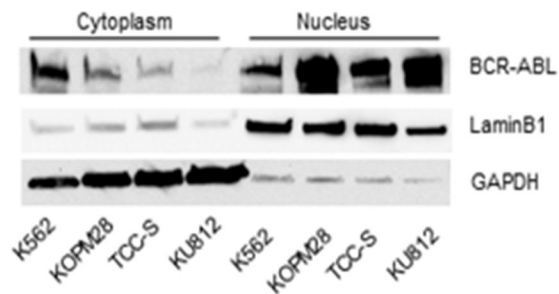


図2. BCR-ABL 陽性細胞株において細胞質成分、核成分に分離し immunoblot を行うと、BCR-ABL が核成分に多く含まれる。

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。そこで申請者は、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、クロロキンでライソソームとの融合を阻害すると細胞質内に BCR-ABL が蓄積することも明らかになった。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、申請者が追求してきた CML 根治療法の開発につながると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は CML における BCR-ABL 細胞内局在を制御するメカニズムを解明し、CML 根治療法開発のための、新規治療標的を見出すことにある。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。

### 3. 研究の方法

まずは自作の BCR-ABL に対する抗体で、CML 細胞株での BCR-ABL の細胞内局在を確認する。BCR-ABL がオートファジーで分解されることは申請者の予備実験の結果からも確実である。申請者が樹立した CML 細胞におけるオートファジーフラックスアッセイにおいて、ATO は、CML 細胞に対し、オートファジーフラックスを促進し、その際、BCR-ABL が核から細胞質に移動する。申請者の予備実験から BCR-ABL 陽性細胞の細胞内 ATP 濃度の維持には、AMPK が重要な役割を担っていることが示唆されている。例えば AMPK の活性剤である AICAR などを使用した時の細胞内 ATP 濃度、オートファジーフラックス、またはアポトーシスの状態などをアッセイすることによって (1)BCR-ABL 細胞内局在が変化する条件、(2)BCR-ABL 細胞内局在が核にあることの意義、(3)または細胞質にあることの意義付けを行っていく。それにより効率に CML 細胞特異的に細胞死を誘導できる条件を同定する。

### 4. 研究成果

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レル由来の c-ABL1 や BCR と BCR-ABL を区別することは不可能である。そこで申請者は、CML 細胞株の BCR-ABL 融合遺伝子の

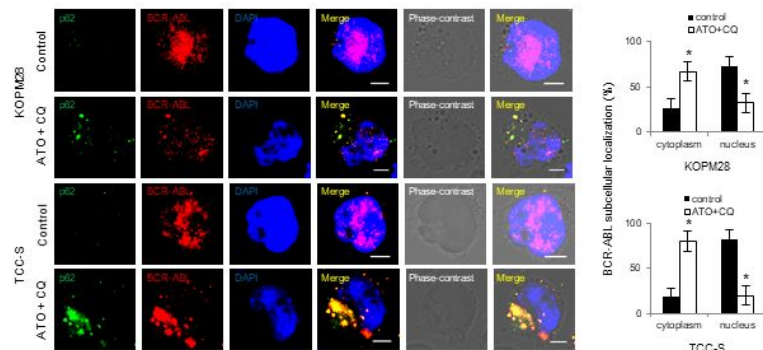


図3.自作のBCR-ABL e14a2に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色。ATOとクロロキンを併用すると核から細胞質へBCR-ABLが移動し、オートファゴソームに蓄積している。

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 (図 3)。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、クロロキンをライソソームとの融合を阻害すると細胞質内に BCR-ABL が蓄積することも明らかになった (図 3)。

CML 細胞株は BCR-ABL チロシンキナーゼに高度に依存しているため、定常時の細胞内 ATP 濃度が他の造血器腫瘍細胞株に比べ高い (図 4)。実際 BCR-ABL を外因性に発現させると細胞内 ATP 濃度が上昇し、ミトコンドリア活性も上昇する (図 5)。下記図にこれまでの研究成果をまとめた (Cancer Science. in press)。ATP が十分に供給されている状態では

BCR-ABL が

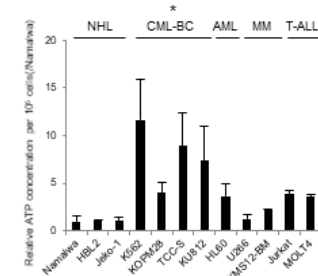


図4.造血器腫瘍細胞株の細胞内ATP濃度の比較

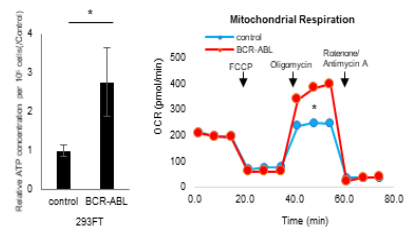


図5.外因性にBCR-ABLを発現させた時の細胞内ATP濃度、ミトコンドリア活性の変化

PI3K/AKT/mTOR の経路を介して細胞増殖を促進し、オートファジーを抑制することで BCR-ABL の自己分解を防いでいる (図 6)。しかし、細胞内 ATP 濃度が減少する状況下では、AMPK が活性化し、核内の BCR-ABL が 14-3-3、Beclin1 や XPO1 と複合体を形成し、細胞質へ移行してくる。そこで mTOR が阻害されるとオートファジーが誘導されるため、BCR-ABL が分解され、細胞死が誘導されることになる (図 7)。TKI で BCR-ABL を阻害すると mTOR 活性が抑制されることになり、オートファジーが誘導され BCR-ABL が分解される。この機構を治療標的とし、TKI と併用すれば CML の根治につながる考えた。申請者の検討では mTOR 阻害剤は CML 細胞での併用効果も見られているが、理論的に同一のシグナルを阻害することになる。CML の根治のためには、この経路と synthetic lethal を示す別な経路の薬剤を併用する必要があると考えられた。

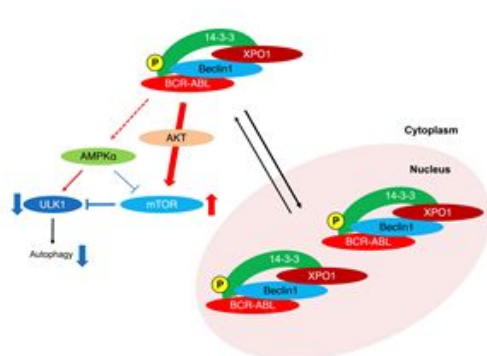


図6. ATPが十分に供給されている場合

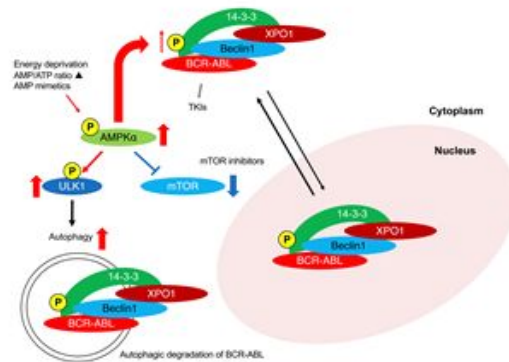


図7. 細胞内ATP濃度が低下しAMPKが活性化している場合

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Ikeda Shohei, Tsunoda Saburo, Koyama Daisuke, Suzuki Manabu, Sukegawa Masumi, Misawa Kyohei, Hojo Hiroshi, Zhu Xin, Utano Kenichi, Ohta Masatsugu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Femoral marrow MRI is a non-invasive, non-irradiated and useful tool for detecting bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.20054	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 Suzuki Manabu, Tsunoda Saburo, Koyama Daisuke, Ikeda Shohei, Sukegawa Masumi, Hojo Hiroshi, Ohta Masatsugu	4. 巻 61
2. 論文標題 MTX-HOPE is a low-dose salvage chemotherapy for aged patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 22 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.20051	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 Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Ohta Masatsugu, Furukawa Yusuke	4. 巻 112
2. 論文標題 AMP activated protein kinase activation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR ABL protein in CML cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 194 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14698	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 Kuroda Yoshiaki, Yashima-Abo Akiko, Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Mori Shigehisa, Ito Shigeki, Furukawa Yusuke	4. 巻 in press
2. 論文標題 Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-01035-x	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 Yamamoto Shogo, Koyama Daisuke, Igarashi Ryo, Maki Takumi, Mizuno Hiroyuki, Furukawa Yusuke, Kuro-o Makoto	4. 巻 59
2. 論文標題 Serum Endocrine Fibroblast Growth Factors as Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease and Various Metabolic Dysfunctions in Aged Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 345 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3597-19	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 Kikuchi Jiro, Hori Mitsuo, Iha Hidekatsu, Toyama-Sorimachi Noriko, Hagiwara Shotaro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Suzuki Atsushi, Furukawa Yusuke	4. 巻 34
2. 論文標題 Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 180 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0525-6	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 Yamamoto S, Koyama D, Igarashi R, Maki T, Mizuno H, Furukawa Y, Kuro-o M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Serum Endocrine FGFs as Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease and Various Metabolic Dysfunctions in Aged Patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 345-355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3597-19.	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 Kikuchi J, Hori M, Iha H, Toyama-Sorimachi N, Hagiwara S, Kuroda Y, Koyama D, Izumi T, Yasui H, Suzuki A, Furukawa Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Soluble SLAMF7 Promotes the Growth of Myeloma Cells via Homophilic Interaction with Surface SLAMF7.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia.	6. 最初と最後の頁 180-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0525-6.	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 Wada, T, Kikuchi, J, Koyama, D, Honda, H, Furukawa, Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 Lysine-specific Demethylase 1 Accelerates Oncogenesis in p53 Heterozygous Mice via Transcriptional Repression of the Residual Trp53 Allele.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia Res. 2019; 82: 29-32.	6. 最初と最後の頁 29-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2019.05.008.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小山大輔
2. 発表標題 Subcellular localization of BCR-ABL is regulated by AMPK in response to ATP demand in CML cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山大輔
2. 発表標題 Subcellular localization of BCR-ABL responds to ATP demand regulated by AMPK in CML cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019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
---------	---------