

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390298

研究課題名（和文）

Survivin を標的とした活性化型 Flt3 陽性造血腫瘍に対する新たな治療戦略開発

研究課題名（英文）

Targeting Survivin as a novel therapeutic strategy for the hematological malignancies with activating mutations on Flt3 gene

研究代表者 福田 誠司（ FUKUDA SEIJI ）

島根大学・医学部・准教授

研究者番号： 30273147

研究成果の概要（和文）：ITD-Flt3 変異は、急性骨髄性白血病患者の予後不良因子である。この研究では Survivin という分子が ITD-Flt3+白血病を促進することを明らかにし、抗 Survivin 療法が ITD-Flt3+白血病の新たな治療法となりうることを示した。Survivin 標的は正常造血幹細胞機能も障害したが、Evi-1 という分子が Survivin 機能の喪失により生じた造血幹細胞機能の障害を部分的に回復することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：ITD-Flt3 mutations in AML are associated with extremely poor prognosis of the patients, indicating additional therapeutic strategies are warranted. In the present study, we identified that Survivin positively regulates progression of acute leukemia induced by ITD-Flt3 in mice model. While the data suggest that targeting Survivin can be a novel treatment strategy for ITD-Flt3+ acute leukemia, we also found that antagonizing Survivin impairs normal hematopoietic stem cell (HSC) function. However, our data demonstrated that Evi-1 partially but significantly compensates impaired HSC function induced by loss of Survivin, suggesting that manipulation of Survivin/Evi-1 pathway may represent potential salvage strategy to protect HSC in the patients undergoing anti-Survivin therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 小児科学

キーワード：小児血液学、造血器腫瘍、Flt3、Survivin

## 1. 研究開始当初の背景

ITD-Flt3 変異は、小児では約 10-15%、成人では約 30%の急性骨髄性白血病 (AML) 患者において検出されるが、ITD-Flt3 を標的とした治療効果は充分でない。また、ITD-Flt3 による造血細胞異常増殖は、Stat5 や Ras 等が関与するが、そのメカニズムは十分に解明されていない。一方、アポトーシス抑制分子 Survivin は caspase、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>、p53、Rb 等の細胞周期や細胞死を制御する分子群と機能的に関わりながら細胞増殖を制御するが、AML を含む大部分の悪性腫瘍において発現が極めて高く、不良予後と関連する一方で、正常組織では極めて発現が少ない。したがって、Survivin に対する標的療法が、新たな治療につながりうると考えられる。また、白血病幹細胞 (LSC) は正常 HSC により引き起こされることが、示唆されており、LSC を完全に除去することが、難治性白血病の治療効果を高める重要なポイントである。しかし、LSC の増殖、自己複製メカニズムについては多くが不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ITD-Flt3 陽性造血腫瘍での Survivin の機能解析を、Survivin コンディショナル欠損マウス細胞を用いた移植モデルで検討し、Survivin と ITD-Flt3 に対する分子標的療法が、ITD-Flt3 陽性造血器腫瘍の新たな治療戦略となりうるかに関して明らかにした。そして正常造血幹細胞の機能と ITD-Flt3 陽性造血幹前駆細胞における Survivin 機能とその機能の制御機構も解析した。以下の具体的な項目を明らかにした。

- (1) ITD-Flt3 による異常造血での Survivin の機能解析
- (2) ITD-Flt3 陽性造血幹前駆細胞における Survivin の機能解析
- (3) 正常造血幹細胞での Survivin の

## 機能解析とその制御機構

### 3. 研究の方法

ヒト ITD-Flt3 陽性白血病細胞株 MV4-11 を ITD-Flt3 抑制剤で処理し、Survivin の発現が減少するかを検討した。また、マウス造血細胞株 Ba/F3 に各種シグナル分子抑制剤を添加し、増加した Survivin 発現が減少するかを確認し、ITD-Flt3 による Survivin の発現増加の機構を解析した。Survivin が ITD-Flt3 陽性急性白血病の増殖に関わることを明らかにするために、ドミナントネガティブ変異 T34A Survivin を導入した Ba/F3 ITD 細胞を移植し、急性白血病の進展程度をマウスの生存率、並びに病理学的所見により比較した。次にヒト Survivin コンディショナル欠損マウス骨髄細胞に ITD-Flt3 を発現させたもの、造血因子非依存性 HSPC 増殖と 2 次コロニー形成を正常骨髄と比較した。またまた、私達は ITD-Flt3+ 造血幹前駆 (KSL) 細胞の中で Survivin により発現制御され、ヒト白血病幹細胞でも異常発現する分子群を同定し、ヒト急性骨髄性白血病幹細胞でも異常変化する分子と比較同定した。そしてそれらをバイオインフォーマティクス手法により機能的に分類した。最後に Survivin 欠損マウス骨髄細胞と正常対照マウスの骨髄の造血幹細胞 CD34-KSL 細胞を回収し、Survivin の欠損により変動する遺伝子を同定し、その中の分子が Survivin 機能に関わるかを、造血幹細胞移植により解析した。

### 4. 研究成果

#### ITD-Flt3 による異常造血での Survivin の機能解析

- ITD-Flt3 陽性ヒト白血病細胞株 (MV4-11) を AG1296、SU5416 処理により ITD-Flt3 を抑制したところ、Survivin 発現が減少し細胞増殖も減少した。これは Survivin が機能的に

ITD-Flt3 の下流に存在し、増殖に促進的に関わることを示唆する。

- また、PI3-kinase、Akt 抑制剤により ITD-Flt3 による Survivin の発現上昇が減少した。また、dominant negative の Akt を導入したところ同様に Survivin 発現が減少した。これに対して、Ras-MAPK 経路の抑制は、Survivin 過剰発現には影響を及ぼさなかった。これらは、ITD-Flt3 による Survivin の発現上昇には PI3-kinase/Akt 経路が関与するのに対し、Ras-MAPK 経路は関わらないことを示唆する。
- 次に Survivin が ITD-Flt3 陽性急性白血病の増殖に関わることを明らかにするために、ドミナントネガティブ型 T34A Survivin を導入した Ba/F3 ITD 細胞を Balb/C マウスに移植したところ、急性白血病の進行と骨髄芽球の増殖抑制が観察された。これは、Survivin が ITD-Flt3 陽性急性白血病の増殖に関わることを示唆する (Blood 2009)。

#### ITD-Flt3 陽性造血幹前駆細胞における Survivin の機能解析

- ITD-Flt3 により、Survivin 発現は上昇したのに対し、ITD-Flt3 抑制は ITD-Flt3 陽性急性白血病細胞において Survivin を減少させ、同時に細胞増殖も抑制した。次に ITD-Flt3 を正常マウス骨髄細胞で発現させると、造血因子非存在下での造血幹前駆細胞の増殖と自己複製能の指標である 2 次コロニー形成等の異常増殖を引き起こしたのに対し、Survivin を欠損させるとこれらの異常増殖が顕著に抑制された。同時に ITD-Flt3+ KSL 細胞の増殖も Survivin 欠損により有意に減少した (Blood 2009)。
- ITD-Flt3 により誘導される KSL 細胞の増殖は、Survivin 欠損により有

意に抑制されたが、同時に増減した分子のうち 137 個はヒト LSC でも発現異常が見られた。うち 124 個は HSC では Survivin 欠損により変化しなかった。また、137 個の内、様々の固形腫瘍で増殖異常に関わる EGFR 経路分子群が、Survivin により有意に発現変化を受けた。これらは、EGFR 経路を始め、LSC 特異的な Survivin 下流分子群の存在を示し、これらが Survivin 直接標的に替る標的候補となりうる。最近報告された EGFR 抑制剤の AML での有効性は、本結果と矛盾しない (Journal of Oncology 2011)。

#### 正常造血幹細胞での Survivin の機能解析とその制御機構

- Survivin 欠損マウス骨髄細胞と正常対照マウスの骨髄の造血幹細胞 CD34-KSL 細胞を回収し、Survivin の欠損により変動する遺伝子群はこれまで Survivin の機能と関連があるとされてきた細胞周期や細胞分裂に関わる分子以外に、転写や翻訳に関わる分子群が変動していた。さらに重要な点は、Survivin の欠損によって造血幹細胞の数が体内で減少し、造血再構築能も有意に障害された。これに伴って、造血幹細胞の機能維持に必須であるとされている転写因子 Evi-1, Gata2, Pbx1, Sal2 などが Survivin 欠損に伴って有意に減少した。興味深いことに Gata2, Pbx1, Sal2 はいずれも Evi-1 により転写が増加する。Survivin 欠損によってこれらが減少することは、これらの分子が Survivin の機能的下流に存在することを示唆する (投稿中)。
- 次に、Survivin 欠損マウス骨髄細胞に Evi-1 を強制発現させたものと、発現させないものを致死量放射線照射後のマウスに移植し、その後の

造血再構築能を比較した。Survivinを欠損させると造血再構築能はSurvivin存在下に比べて有意に低下したが、Survivin欠損細胞にEvi-1を強制発現すると造血再構築能は部分的ではあるが、有意に改善した。これは、Evi-1がマウスの造血幹細胞においてSurvivinにより発現制御を受けると同時にSurvivinの機能的下流に存在することを示唆する。私たちのデータはSurvivin標的治療はITD-Flt3陽性造血器腫瘍の治療に有用であることを示すが、同時に正常造血幹細胞への影響が出現することを示唆する（投稿中）。

造血器腫瘍細胞には感受性が高く、正常造血幹細胞には影響が最小限であるようなSurvivin標的治療が望ましいが、今回の研究では正常造血幹細胞でSurvivin下流に存在するEvi-1を操作することが、正常造血幹細胞へのSurvivin標的の悪影響を回復させようことを示唆する。今後、Survivin/Evi1機能経路が白血病幹細胞にも同様に存在するのか、あるいは異なるのかを検討する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Singh P, Hogatt J, Speth JM, Fukuda S, Breyer RM, Pelus LM: Blockade of Prostaglandin E2 Signaling Through EP1 and EP3 Receptors Attenuates Flt3L-Dependent Dendritic Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells: *Blood*: 119(7):1671-82, 2012  
doi: 10.1182/blood-2011-03-342428  
(査読あり)

2. Fukuda S, Abe M, Onishi C, Taketani T, Purevsuren J, Yamaguchi S, Conway EM, Pelus LM: Survivin Selectively Modulates Genes Deregulated in Human Leukemia Stem Cells: *Journal of Oncology*: 2011 (in press)  
doi: 10.1155/2011/946936 (査読あり)
3. Srirangam A, Milani M, Mitra R, Guo Z, Rodriguez M, Kathuria H, Fukuda S, Rizzardi A, Schmechel S, Skalnik DG, Pelus LM, Potter DA: The Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Ritonavir Inhibits Lung Cancer Cells, in Part, by Inhibition of Survivin: *J Thorac Oncol*: 6: 661-670: 2011  
doi: 10.1097/JTO.0b013e31820c9e3c  
(査読あり)
4. Taketani T, Taki T, Nakamura T, Kobayashi K, Ito E, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y: High frequencies of simultaneous *FLT3*-ITD, *WT1*, and *KIT* mutations in hematologic malignancies with *NUP98*-fusion genes: *Leukemia*: 24: 1975-1977: 2010:  
doi:10.1038/leu.2010.207 (査読あり)
5. Guzman JR, Fukuda S, Pelus LM: Inhibition of caspase-3 by Survivin prevents Wee1 Kinase degradation and promotes cell survival by maintaining phosphorylation of p34Cdc2: *Gene Ther Mol Biol*: 13, 264-273: 2009  
(査読あり)
6. Fukuda S, Singh P, Moh A, Abe M, Conway EM, Boswell HS, Yamaguchi S, Fu XY, Pelus LM: Survivin Mediates Aberrant Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation and Acute Leukemia in Mice Induced by Internal-Tandem-Duplication of Flt3:

*Blood*: 114 (2): 394-403: 2009

Doi: 10.1182/blood-2008-11-188714

(査読あり)

7. Pelus LM, **Fukuda S**:

Chemokine-mobilized adult stem cells:  
defining a better hematopoietic graft

*Leukemia*: 22(3):466-73: 2008

doi: 10.1038/sj.leu.2405021 (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Abe M., Yamaguchi S., Taketani T., **Fukuda S**  
Cyclin Dependent Kinase Inhibitor P21  
Negatively Regulates PBX-1 Via Internal  
Tandem Duplication of Flt3 Dependent  
Manner, a Novel Mechanism That Does Not  
Exist in Normal Hematopoietic Progenitor  
Cells  
53<sup>rd</sup>, Annual meeting of the American  
Society of Hematology  
2011, Dec 10. San Diego, CA, USA
2. **Fukuda S**, Onishi C, Abe M, Yamaguchi S  
ITD-Flt3 Regulates CXCR4 Signaling  
Pathways Functionally Distinct From Normal  
Hematopoietic Cells  
Pediatric Academic Societies and Asian  
Society for Pediatric Research, 2011,  
Joint Meeting, 2011, May 3<sup>rd</sup>. Denver, CO,  
USA
3. **福田誠司** 白血病細胞は体内で増えて動く、  
動いて増える -動きを照準にした新しい白  
血病治療法のアイデア-  
血液疾患 Lecture Meeting、2011年3月17  
日、(高槻) たかつき京都ホテル
4. Abe M., Pelus LM., Singh P., Yamaguchi S.,  
Taketani T., **Fukuda S**.  
p21WAF1/CDKN1 Function In

Hematopoietic Progenitor Cell

Proliferation Is Inversely Regulated by  
Wild-Type Flt3 and Internal Tandem  
Duplication Mutation of Flt3

52<sup>nd</sup> Annual meeting of the American  
Society of Hematology

2010, Dec 4. Orlando, FL, USA

5. **Fukuda S.**, Sihgh P., Hoggatt J., Speth  
J., Abe M., Conway EM., Crispino J/  
Nucifora G., Yamaguchi S., Pelus LM  
Survivin Modulates Gene Expression That  
Connects through An Extensive  
Functional Signaling Network and  
Regulates Proliferation of  
Hematopoietic Stem Cells through Evi-1  
52<sup>nd</sup> Annual meeting of the American  
Society of Hematology  
2010, Dec 6. Orlando, FL, USA
6. **Fukuda S.**  
Blood Stem Cells and Leukemia: How do  
they move in our body?  
*Ningxia-Japan Annual Genetic Metabolic  
Disease Forum*, 2010、September 23  
(invited symposium), Ningxia, China
7. **福田誠司** 活性化Flt3とSurvivinによる  
造血異常の制御機構、基礎血液懇話会、  
2010年5月7日、(名古屋) 名古屋大学
8. **Fukuda S.**, Mori S., Abe M., Yamaguchi S.,  
Pelus LM  
ITD-Flt3 Enhances Migration of  
Hematopoietic Cells through Aberrant  
CXCR4 Signaling Pathways Overlapping  
but Functionally Distinct From  
SDF1/CXCR4 Signaling Axis in Normal  
Hematopoietic Cells.  
51<sup>st</sup> Annual meeting of the American  
Society of Hematology  
2009, Dec 5 New Orleans, LA, USA

9. Fukuda S., Abe M., Yamaguchi S., Pelus LM  
Overlapping but Distinct Role of  
p21WAF1/CDKN1 and Survivin in  
Hematopoietic Progenitor Cell  
Proliferation  
50<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society  
of Hematology  
2008, Dec 6, San Francisco, CA, USA
10. Fukuda S., Sampath J, Singh P, Pelus LM.  
Survivin Regulates Proliferation and  
Expression of Genes Affecting Divergent  
Cellular Functions in Hematopoietic Stem  
Cells,  
37th Annual Scientific Meeting of the  
International Society of Experimental  
Hematology, 2008 June 10, Boston, MA, USA

〔図書〕 (計 5 件)

1. Fukuda S., Onishi C, Pelus LM,  
InTech - Open Access Publisher  
Trafficking of Acute Leukemia  
Cells: Chemokine Receptor Pathways  
that Modulate Leukemia Cell  
Dissemination  
*Acute Leukemia* 2011, 137-156,  
(査読あり)
2. Pelus LM, and Fukuda S.  
InTech - Open Access Publisher  
Survivin: Identification of  
Selective Functional Signaling  
Pathways in Transformed Cells, and  
Identification of New Splice  
Variants with Growth Survival  
Activity  
*Cancer Treatment* 2011, 187-200,  
(査読あり)
3. Fukuda S and Pelus LM.  
The Humana Press Inc. NJ,  
Transmigration of CD34<sup>+</sup> cells *Methods*

*Mol Biol: Hematopoietic Stem Cell  
Protocols.*

2008: 430:55-75

doi: 10.1007/978-1-59745-182-6\_4

4. Fukuda S and Pelus LM.  
Nova Science Publishers, Inc. NY,  
Role of Survivin in Adult Stem  
Cells and Cancer  
*Stem Cell Applications in Diseases,*  
2008, Chapter 9, 257-270
5. Sampath J, Fukuda S., Pelus LM,  
Nova Science Publishers, Inc. NY  
Survivin Splice Variants: New  
Players in Cancer  
*Oncogenic Proteins: Structure, Function  
and Analyses.* Chapter 5, 139-159,  
2008

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pediatrics/2-3/2-3.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
福田 誠司 (FUKUDA SEIJI)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30273147