

機関番号：34315

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591122

研究課題名(和文) 白血病における kpm (Lats2)発現異常の分子病態

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of abnormal kpm (Lats2) expression in leukemia

研究代表者

堀 利行 (HORI TOSHIYUKI)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70243102

研究成果の概要(和文):

Kpm(Lats2)は、セリン・スレオニンキナーゼで、Hippo シグナル伝達経路の中核分子の一つである。われわれは、様々な白血病における kpm(Lats2)の発現を調べ、難治性白血病において kpm(Lats2)の発現が低下していることを見いだした。白血病細胞株の kpm(Lats2)をノックダウンすると抗がん剤に抵抗性となった。抗がん剤による DNA 傷害後の p73 の核内安定化とその下流の PUMA および p21 の発現誘導には Kpm(Lats2)による転写補助因子 YAP2 の 127 番セリンのリン酸化が必要であることを明らかにした。したがって、Kpm(Lats2)の低発現は治療抵抗性の一つの要因となると考えられる。

研究成果の概要(英文):

Kpm(Lats2) is a serine-threonine kinase that is one of the core components of the Hippo signaling pathway. We measured expression levels of kpm(Lats2) in various leukemias and found that expression of kpm was downregulated in refractory leukemias. Knockdown of kpm(Lats2) rendered leukemic cells resistant to anti-cancer drugs. We demonstrated that stabilization of nuclear p73 after DNA damage and subsequent induction of PUMA and p21 require phosphorylation of YAP2 at serine-127 by Kpm(Lats2). Thus, downregulation of kpm(Lats2) seems to be one of the mechanisms for chemoresistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：癌、白血病、シグナル伝達、Hippo 経路、kpm (Lats2)、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

白血病は白血病細胞の形態および染色体・遺伝子異常に基づいて分類され、それぞれの病型に対して標準的な治療法が確立している。また、造血幹細胞移植や分子標的治療などの進歩によって一部の白血病の治療成績は著しく向上している。しかし、一方では成人 T

細胞白血病(ATL)のように依然として治療が困難な疾患が存在する。このような一部の白血病の治療抵抗性がどのような分子機構によってもたらされているかに関しては不明な点が多い。

われわれは、これまでに CD34 陽性の急性骨髄性白血病由来細胞株 KG-1a より degenerate

PCR の手法により新規セリン・スレオニンキナーゼ kpm(Lats2)を同定、単離し、これがシヨウジョウバエのがん抑制遺伝子 warts/lats のヒト相同体の一つであることを明らかにした(Hori T, et al. Oncogene 19:3101-3109, 2000)。その前年にもう一つの相同体 Lats1 が報告されているので、哺乳類には2つの相同体 Lats1 と kpm(Lats2)があると考えられる。シヨウジョウバエにおいては Hippo (哺乳類の Mst-1,2 の相同体)から Warts を経て Yorkie (哺乳類の転写補助因子 YAP の相同体)に至るシグナル・カスケード (Hippo 経路) がチロシン・キナーゼ系や Ras-MAP キナーゼ系とは独立の極めて重要な細胞の増殖制御機構であることが判明している(Cell 122:421-423, 2005)。この経路は哺乳類においても保存されており、その質的、量的異常と発がんやがん細胞の不死化との関連が注目されている。

われわれは、これまでに Tet-off 遺伝子発現誘導システムを用いて kpm(Lats2)の過剰発現が細胞の G2/M 期での増殖停止と細胞死を誘導することを示した(Kamikubo Y, et al. J. Biol. Chem. 278:17609-17614, 2003)。Lats1 についても同様の報告があり、両者ともに細胞の生存と細胞周期制御に深く関わることが知られている。ただし、発現分布が大きく異なっていて、Lats1 のノックアウトマウスは正常に生育するのに対して kpm/Lats2 のノックアウトマウスは胎生期致死である。

kpm(Lats2)や Lats1 とがんの関係については、乳がんや大腸がんなどで発現が低下している症例があり、悪性度および予後との関連性が指摘されている。白血病に関しては、急性リンパ性白血病(ALL)において kpm(Lats2)の低発現の症例が極めて予後不良であることが報告された(Leukemia 19:2347-2350, 2005)。すなわち、kpm(Lats2) mRNA の発現量を正常骨髄細胞のそれを基準として高い群と低い群の2群に分けて生存率を比較すると、kpm(Lats2)低発現群では極めて予後不良であり、Bcr-abl 陽性に匹敵するかあるいはそれ以上に強い予後不良因子であった。一方、これまでのところ白血病と Lats1 との関係に関する報告はない。血液細胞では kpm(Lats2)が Lats1 に比べて優位に発現しており、より重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

われわれは、これまでに数種類の白血病の自検例で kpm(Lats2)や Lats1 の発現を比較検討した結果、いくつかの難治性白血病の臨床検体で著明な kpm(Lats2)発現低下を認めている。このことから、kpm(Lats2)の発現量が白血病の治療抵抗性に深く関わることを示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、さまざまな白血病での

kpm(Lats2)の発現量と治療抵抗性との関係を総合的に検証するとともに、kpm(Lats2)低発現の分子機構を明らかにし、さらに、kpm(Lats2)低発現によって引き起こされる白血病細胞の悪性化の進展と抗がん剤抵抗性の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) kpm(Lats2)の realtime PCR
様々な白血病細胞株、新鮮白血病における kpm(Lats2)の mRNA の発現を realtime PCR 法で定量化し、白血病の種類および悪性度と kpm(Lats2)発現低下との関連性をスクリーニングした。

(2) shRNA による kpm(Lats2)のノックダウン
shRNA 発現レトロウイルスベクター pSI Neo-hU6 を用いて骨髄系白血病細胞株 KG-1a および成人 T 細胞白血病(ATL)由来 T 細胞株 ED-40515+の kpm(Lats2)をノックダウンし、これらとコントロールベクター導入細胞を比較解析した。

(3) 抗がん剤感受性の測定
細胞の生存率およびアポトーシスを、それぞれ MTT アッセイおよび Annexin V 染色後のフローサイトメトリーで測定した。

(4) 免疫沈降、Western ブロット
HA タグを付けた kpm(Lats2)、FLAG タグを付けた YAP、p73 などの発現ベクターを HEK-293T 細胞にトランスフェクトし、それぞれに対する抗体を用いて、免疫沈降、Western ブロット解析を行い、それらの蛋白間の相互作用について検討した。

(5) クロマチン免疫沈降法
PUMA プロモーターへの p73 の結合を調べるために ChIP-IT enzymatic kits (Active Motif, Carlsbad, CA)を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。

4. 研究成果

(1) 難治性白血病における kpm(Lats2)の発現低下

realtime PCR 法によって様々な白血病細胞株および新鮮白血病細胞における kpm(Lats2)の発現量を定量した。われわれが調べたすべての ATL 由来細胞株および ATL 患者から分離した白血病細胞は、正常 CD4⁺ T 細胞と比較して kpm(Lats2)の発現が低下していた。同様に、NK 白血病/リンパ腫の白血病細胞は正常の CD3⁻ CD56⁺細胞と比較して kpm(Lats2)の発現が低下していた。これらのことから、代表的な治療抵抗性腫瘍である ATL および NK 白血病/リンパ腫で kpm/Lats2 の発現が低下していることが明らかとなった。

(2) kpm(Lats2)ノックダウン実験
kpm(Lats2)の発現低下による白血病細胞の性状変化を調べるために、siRNA 発現レトロウイルスベクターを用いて KG-1a と ATL 由来

T細胞株 ED-40515+の2つの白血病細胞株より kpm(Lats2)をノックダウンした亜株を作成した。これらの細胞の増殖速度は、コントロールベクターを導入した細胞と比較して有意な差を認めなかったが、抗 Fas 抗体、および2種類のDNA障害性抗がん剤 adriamycin と etoposide に対して明らかな抵抗性を示した。

(3) kpm(Lats2)ノックダウンによって発現が変化する遺伝子の探索

kpm(Lats2)のノックダウンにより、DNA 傷害性ストレスに耐性となるメカニズムを明らかにするために、細胞の生存の関わる遺伝子の変化を realtime PCR によってスクリーニングした。その結果、kpm(Lats2)ノックダウンにより、IAP ファミリー分子の発現には変化がなかったが、抗がん剤による DNA 傷害後の PUMA と p21 の発現誘導が起こらないことが判明した。

(4) kpm(Lats2)ノックダウンと核内 p73

kpm(Lats2)ノックダウン細胞では、抗がん剤による DNA 傷害後の p73 の核内集積が起こらなかった。Hippo 経路の下流にある転写補助因子 YAP2 はその WW ドメインを介して p73 と相互作用する。そこで、次に p73 と kpm(Lats2) と YAP2 の関係について検討した。293T 細胞への p73、kpm(Lats2)、YAP2 の一過性トランスフェクションでは、キナーゼ活性をもつ野生型 Kpm(Lats2)と YAP2 を共存させると p73 の蛋白量が増加したが、キナーゼ活性欠失 Kpm(Lats2)またはアミノ酸 127 番のセリンをアラニンに置換した YAP2 ではその効果が殆ど認められなかった。ChIP アッセイの結果、コントロール細胞では DNA 傷害後の PUMA プロモーター領域への p73 の結合が認められたのに対して、kpm(Lats2)ノックダウン細胞ではそれを認めなかった。

(5) 白血病の治療抵抗性との関わり

以上の結果から、抗がん剤による DNA 傷害後の p73 の核内安定化とその下流の PUMA および p21 の発現誘導には Kpm(Lats2)による YAP2 の 127 番セリンのリン酸化が必要であることが示された。したがって、kpm(Lats2)の発現低下は治療抵抗性の一因となると考えられる。

(6) *C. elegans*のWarts相同体(wts-1)と相互作用する分子の探索

哺乳類のHippo経路に関してはまだ不明な点が多い。Hippo経路の原初的な構造と機能を明らかにするために、上記(1)-(5)の研究とは独立に、単純なモデル動物である *C. elegans* を用いた研究を行った。*C. elegans* のWarts相同体である wts-1 の kinase domain を欠損させた変異型 (*wts-1 KD*) を bait として yeast two hybriide システムを用いてスクリーニングを実施した。16個の prey 候補を得て、そこからこれまでに10個の独立したクロ

ーンを単離した。現在、その中でE3ユビキチンリガーゼに属するNHL-1について一過性発現系での共免疫沈降による相互作用の確認実験および、個体レベルでの相互作用および発現型の機能的関連性についての epistasis 解析を行っている。

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6件)

Alexander Pedroza-Gonzalez¹, Kangling Xu, Te-Chia Wu, Caroline Aspod, Sasha Tindle, Florentina Marches, Michael Gallegos, Elizabeth C. Burton, Daniel Savino, Toshiyuki Hori, Yuetsu Tanaka, Sandra Zurawski, Gerard Zurawski, Laura Bover, Yong-Jun Liu, Jacques Banchereau, A. Karolina Palucka. TSLP fosters human breast cancer tumor development by promoting type 2 inflammation. *J. Exp. Med.* 208 査読有 2011, 479-490.

Mutsumi Hashimoto, Toshio Kitawaki, Norimitsu Kadowaki, Satoshi Iwata, Chikao Morimoto, Toshiyuki Hori, and Takashi Uchiyama. The CD70-CD27 interaction during the stimulation of dendritic cells promotes naïve CD4⁺ T cells to develop into T cells producing a broad array of immunostimulatory cytokines in humans. *Int. Immunol.* 21 査読有 2009, 891-904. Rimpei Morita, Tomoko Fujita, Takashi Uchiyama, and Toshiyuki Hori. Human plasmacytoid dendritic cells express an atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A. *Microbiol. Immunol.* 53 査読有 2009, 403-411.

Chisaki Mizumoto, Junya Kanda, Tatsuo Ichinohe, Takayuki Ishikawa, Masashi Matsui, Norimitsu Kadowaki, Tadakazu Kondo, Kazunori, Imada, Masakatsu Hishizawa, Hiroshi Kawabata, Momoko Nishikori, Kouhei Yamashita, Akifumi Takaori-Kondo, Toshiyuki Hori, Takashi Uchiyama. Mycophenolate mofetil combined with tacrolimus and minidose methotrexate after unrelated donor bone marrow transplantation with reduced-intensity conditioning. *Int. J. Hematol.* 89 査読有 2009, 538-545.

Masahiro Kawahara, Toshiyuki Hori, Tsutomu Oka, Marius Sudol and Takashi Uchiyama. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells

through the stabilization of p73. Blood 112 査読有 2008, 3856-3866.

Takero Shindo, Takakyuki Ishikawa, Akiko Fukunaga, Toshiyuki Hori and Takashi Uchiyama. Growth and differentiation advantages of CD4⁺OX40⁺ T cells from allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. Biol. Blood Marrow Tr. 14 査読有 2008, 268-281.

[学会発表](計10件)

竹中元彦、井上英樹、香座知典、堀利行: C. elegans における RASSF 相同体 T24F1.3 の機能解析. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

香座知典、井上英樹、竹中元彦、堀利行: Warts の C. elegans 相同体 Wts-1 と相互作用する細胞分子の探索. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

Masatoshi Nishikawa, Tadakazu Kondo, Masakatsu Hishizawa, Momoko Nishikori, Kohei Yamashita, Toshiyuki Kitano, Tatsuo Ichinohe, Hiroshi Kawabata, Akifumi Takaori, Norimitsu Kadowaki, Toshiyuki Hori, Hiroshi Takayama, Takayuki Ishikawa, Takashi Uchiyama. Poor tolerability to imatinib in elderly CML patients may lead to inadequate responses. 第72回日本血液学会総会 2010年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Wataru Kishimoto, Tadakazu Kondo, Kouhei Yamashita, Hiroshi Kawabata, Tatsuo Ichinohe, Akifumi Takaori, Norimitsu Kadowaki, Toshiyuki Hori, Takayuki Ishikawa, Takashi Uchiyama. Autologous stem cell transplantation for 32 patients with multiple myeloma. 第72回日本血液学会総会 2010年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Masahiro Kawahara, Toshiyuki Hori, Kazuhisa Chonabayashi, Tsutomu Oka, Marius Sudol, Takashi Uchiyama. Kpm/Lats2 of the Hippo pathway is linked to chemo-sensitivity of leukemic cells. The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, December 6, 2008. Poster session.

Masahiro Kawahara, Kazuhisa Chonabayashi, Takashi Uchiyama, Tsutomu Oka, Marius Sudol, Toshiyuki Hori. Relationship between the Hippo

pathway and DNA damage signals: Kpm/Lats2 affects chemo-sensitivity of leukemic cells. 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月28日、名古屋国際会議場(愛知)

篠原正信、諫田淳也、一戸辰夫、丸山 互、山本和代、石上隆宏、内山達樹、阪本貴士、藤田晴之、小林正行、錦織桃子、菱澤方勝、川端 浩、門脇則光、高折晃史、堀利行、山下浩平、近藤忠一、石川隆之、内山 卓: 非血縁者間同種骨髄移植後の非感染性肺合併症: 緩和な前処置と従来型前処置の比較. 第70回日本血液学会総会 一般口演 2008年10月12日、京都国際会館(京都府)

丸山 互、一戸辰夫、山本和代、石上隆宏、内山達樹、篠原正信、阪本貴士、藤田晴之、菱澤方勝、錦織桃子、山下浩平、近藤忠一、川端 浩、高折晃史、門脇則光、堀利行、石川隆之、内山 卓: 単一施設における複数回同種移植に関する検討. 第70回日本血液学会総会 一般口演 2008年10月11日、京都国際会館(京都府)

内山達樹、一戸辰夫、丸山 互、山本和代、石上隆宏、篠原正信、阪本貴士、藤田晴之、小林正行、錦織桃子、菱澤方勝、川端 浩、門脇則光、高折晃史、堀利行、山下浩平、近藤忠一、石川隆之、内山卓: 穏和な前処置を用いた同種造血幹細胞移植後の造血器腫瘍再発例の予後に関する検討. 第70回日本血液学会総会 一般口演 2008年10月11日、京都国際会館(京都府)

堀利行、河原真大、蝶名林和久、内山卓: 難治性白血病における Hippo 経路の破綻と治療抵抗性の分子機構. 第70回日本血液学会総会 一般口演 2008年10月11日、京都国際会館(京都府)

山本和代、近藤忠一、菱澤方勝、錦織桃子、山下浩平、一戸辰夫、川端 浩、高折晃史、門脇則光、堀利行、石川隆之、内山 卓: 臍帯血移植後に donor cell leukemia を発症した悪性リンパ腫の1例. 第70回日本血液学会総会 一般口演 2008年10月10日、京都国際会館(京都府)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/bm/hori/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 利行 (HORI TOSHIYUKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：70243102

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

川真田 伸 (KAWAMATA SHIN)
先端医療振興財団・先端医療センター研究
所・専門役
研究者番号：00360842