

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16929

研究課題名（和文）核小体ストレス応答を利用した革新的な小児白血病治療の開発

研究課題名（英文）Development of Innovative Childhood Leukemia Therapy Using the Nucleolar Stress Response

研究代表者

中川 俊輔（Nakagawa, Shunsuke）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：60789973

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）：核小体ストレス応答はRPL11を介してMDM2を抑制し、P53を活性化させる癌抑制機構である。小児B前駆細胞性急性リンパ性白血病（BCP-ALL）ではTP53遺伝子変異がほとんど認められないため、核小体ストレス応答は良い治療標的と考えられる。本研究では、まず、細胞株を用いて小児BCP-ALLで核小体ストレス応答が機能することを明らかにした。次に、小児BCP-ALLの治療で用いる薬剤の中で、4種類の薬剤が核小体ストレス応答を誘導することを明らかにした。また、臨床検体を用いた解析で、再発時にRPL11が低下する傾向があり、核小体ストレス応答の機能低下が再発に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は小児BCP-ALLで核小体ストレス応答が機能することを明らかにし、これまでに核小体ストレス応答を誘導することが報告されていない4つの抗腫瘍薬の新たな作用機序を明らかにした点で学術的意義がある。また、臨床的検体を用いた検討では、核小体ストレス応答の機能低下が再発や薬剤抵抗性に関連する可能性を示した。以上のことから、核小体ストレス応答が小児BCP-ALLの再発や治療抵抗性を克服するための治療標的となり得ることを示し、小児BCP-ALLの新たな治療戦略を構築するための材料となる点において、社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The nucleolar stress response is a tumor suppressor mechanism that suppresses MDM2 via RPL11 and activates p53. Since TP53 mutations are rarely observed in pediatric B-cell precursor cell acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), the nucleolar stress response is considered a good therapeutic target. In this study, we first demonstrated that the nucleolar stress response is functional in pediatric BCP-ALL using cell lines. Next, among the drugs used in the treatment of pediatric BCP-ALL, we found that four drugs induced the nucleolar stress response. Analysis of clinical samples showed that RPL11 tended to be decreased at the time of relapse. The results suggest that dysfunction of the nucleolar stress response may be associated with recurrence.

研究分野：小児血液がん

キーワード：小児急性リンパ性白血病 核小体ストレス応答 薬剤抵抗性 P53

## 1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia; ALL) は多剤併用化学療法や造血幹細胞移植の進歩によって、生存率は大きく改善した。しかし、約 20% は再発し治療抵抗性となるため、再発のリスク評価や新たな治療法の開発が強く望まれている。

近年、核小体を起点として P53 を活性化し、核小体ストレス機構が報告された。P53 は強力な癌抑制因子で、その機能の活性化は発癌抑制や腫瘍細胞の増殖抑制に大きく影響する。核小体ストレス応答は、Actinomycin D (ActD) 等の薬剤によるリボソーム RNA (rRNA) の転写阻害を起点として作動する。核小体ストレス応答が起こると、核小体内のリボソーム蛋白質 L11 (RPL11) が放出され、これが核小体外の核質領域において MDM2 と結合し、MDM2 による P53 の分解を抑制する。結果として、P53 が安定化し細胞増殖が抑制される。これまでに、このストレス応答が P53 依存性に腫瘍細胞の増殖や、個体の腫瘍化形成を抑制することが報告されている。臨床的にも、大腸癌、食道癌、肺癌、胃癌において、この応答が強い患者群は生存期間が延長し、予後規定因子であることが報告されている。

一方、白血病などの血液腫瘍においては、核小体ストレス応答と化学療法の関係性は報告されていない。核小体ストレス応答が作動し抗腫瘍効果を発揮するためには、P53 が正常 (*TP53* 野生型) である必要がある。小児 ALL はほとんどが *TP53* 野生型のため、核小体ストレス応答の良い解析対象と考えた。申請者は、まず、再発小児 B 前駆細胞性急性リンパ性白血病 (B-cell precursor ALL; BCP-ALL) 患者 3 例の骨髓検体を用いて RPL11 の mRNA の発現を解析した。興味深いことに、小児 ALL の再発症例は RPL11 の発現が低下する傾向がみられ、核小体ストレス応答の機能低下が再発や治療抵抗性に関連した可能性が示唆された。前述のように、核小体ストレス応答は RNA 合成阻害によって引き起こされるが、小児白血病治療に使用される薬剤の中では、6-mercaptopurine (6MP) や methotrexate (MTX) が rRNA 合成阻害作用を有するため、6MP や MTX が核小体ストレス応答に関連すると想定した。

## 2. 研究の目的

本研究では P53 を制御する核小体ストレス応答機構に着目し、

- (1) RPL11 が BCP-ALL の治療抵抗性を予測するマーカーとなるか？
- (2) 核小体ストレス応答を利用した治療候補化合物が治療につながるかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) ActD を用いて、BCP-ALL 細胞株においても核小体ストレス応答が機能することを明らかにする。具体的には、siRNA を用いて RPL11 をノックダウンし、ActD に対する感受性を ATP assay を用いた細胞生存率で評価する。また、western blot や real time PCR 法を用いて ActD が P53 やその下流の遺伝子の発現を調整することを明らかにし、免疫染色や免疫沈降法を用いて RPL11 と MDM2 の結合を評価する。
- (2) BCP-ALL 細胞株を用いて、小児 BCP-ALL で使用される抗腫瘍薬が核小体ストレス応答を介して抗腫瘍効果を発揮することを明らかにする。具体的には、小児 BCP-ALL で用いられる主な抗腫瘍薬に対する RPL11 をノックダウンした細胞の薬剤感受性を評価する。さらに、感受性が低下した薬剤が核小体ストレス応答を誘導することを、ActD と同様の実験を行い評価する。
- (3) 患者検体を用いて、小児 BCP-ALL の再発と核小体ストレス応答の関連を評価する。

## 4. 研究成果

- (1) BCP-ALL 細胞においても核小体ストレス応答が機能し抗腫瘍効果を発揮する野生型 *TP53* を有する BCP-ALL の細胞株 2 種類 (Nalm-6, RS4;11) を用いて実験を行った。 Electroporation 法により BCP-ALL 細胞株に siRNA を導入し、RPL11 をノックダウンした。RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞株は ActD に対して薬剤抵抗性を示したが、MDM2 阻害剤である HDM201 は RPL11 をノックダウンしても薬剤抵抗性を示さなかった (図 1)。この薬剤感受性実験の結果から、BCP-ALL 細胞株に対する ActD の効果は RPL11 に依存すると考えられた。また、Control の siRNA を導入した BCP-ALL 細胞株は ActD で P53 タンパクの発現が増加したが、RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞株では P53 の発現が抑制された (図 1)。Control の siRNA を導入した BCP-ALL 細胞株は P53 の下流の遺伝子 (*p21*, *MDM2*, *Fas*) の発現を増加させたが RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞株ではそれらの遺伝子の発現が抑制された。一方で、HDM201 では RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞株でも P53 は control と同程度の発現を示し、P53 下流の遺伝子の発現は低下しなかった。この結果から、ActD が RPL11 を介して P53 の発現を増加させ機能することが明らかとなった。RPL11 を介した細胞死がアポトーシスによるかどうかを評価するために、アポトーシスを caspase 3/7 を用いて評価した。Control の siRNA を導入した BCP-ALL 細胞株では Caspase 3/7

が ActD によって増加したが、RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞株では ActD で刺激しても Caspase 3/7 の発現は増加しなかった。一方で、HDM201 では RPL11 をノックダウンしても caspase 3/7 の発現は抑制されなかった。以上から、BCP-ALL 細胞株でも ActD は RPL11 を介して P53 を増加させ、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

続いて、免疫染色によって ActD で刺激した後の BCP-ALL 細胞株の核小体を評価した。ActD で BCP-ALL 細胞株を刺激し NPM1 を免疫染色すると、核小体が崩壊し NPM1 が核内に拡散する様子が観察された。次に、MDM2 抗体による免疫沈降で MDM2 と RPL11 の結合を評価した。ActD で Nalm-6 を刺激し MDM2 抗体で免疫沈降を行い western blot を行うと RPL11 が検出された。以上から、ActD は核小体を崩壊させ、MDM2 と RPL11 の結合を増加させ、P53 を増加させると考えられた。

核小体ストレス応答は rRNA の発現低下を起点として発動することが知られているため、ActD による rRNA の発現の変化を real time PCR で評価した。ActD で BCP-ALL 細胞株を刺激すると、45s pre-rRNA の発現が低下し、rRNA の合成を阻害することが明らかとなった。

以上の結果から、BCP-ALL 細胞株において、ActD が rRNA の生合成を阻害することを起点として核小体が崩壊し、RPL11 と MDM2 の結合が増加し、その結果として P53 が活性化し、抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。つまり、BCP-ALL 細胞株においても、核小体ストレス応答が機能することを明らかにすることができた。これまでに急性リンパ性白血病で核小体ストレス応答が機能することを明らかにした報告はなく、本研究の重要な新規知見の一つと考えた。

しかし、小児 ALL の治療では ActD を使用せず、また、小児 ALL で用いられる薬剤の中で核小体ストレス応答を引き起こすことが知られた薬剤はない。そのため、核小体ストレス応答と小児 ALL の臨床的意義を明らかにするために、小児 ALL で使用される複数の薬剤の中で、核小体ストレス応答を引き起こす薬剤を特定する必要があった。

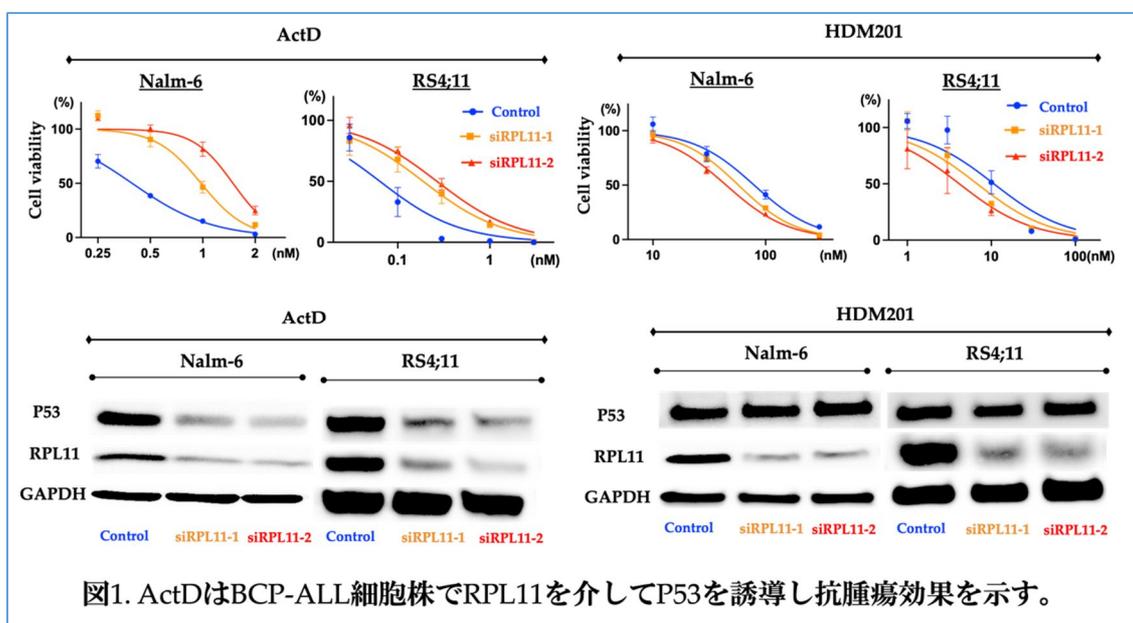


図1. ActDはBCP-ALL細胞株でRPL11を介してP53を誘導し抗腫瘍効果を示す。

## (2) 核小体ストレス応答の機能低下はBCP-ALL細胞株に対して多剤耐性を示す

ActD を用いた実験と同様に、野生型 TP53 を有する BCP-ALL の細胞株 2 種類 (Nalm-6, RS4;11) を用いて実験を行った。RPL11 をノックダウンした BCP-ALL 細胞は、6-mercaptopurine (6-MP), methotrexate (MTX), daunorubicin (DNR), cytarabine (AraC) に抵抗性を示した (図 2)。続いて、これら 4 つの抗腫瘍薬を用いて、ActD と同様の実験を行い解析した。6-MP/MTX/DNR/AraC は P53 のタンパク発現と P53 下流の遺伝子の発現を増加させたが、その効果は RPL11 のノックダウンによって抑制された。また、6-MP/MTX/DNR/AraC それぞれで程度の差はあったが 45s pre-rRNA の発現を抑制し、核小体の崩壊を誘導した。Nalm-6 を用いて、6-MP/MTX/DNR/AraC で刺激した後に MDM2 抗体で免疫沈降すると、RPL11 が検出された。以上から、6-MP/MTX/DNR/AraC が核小体ストレス応答を誘導することが明らかとなった。

これらの薬剤は、他の癌腫においても核小体ストレス応答を起こすことは報告されておらず、各薬剤における新たな抗腫瘍作用機序の一つと考えられた。6-MP/MTX/DNR/AraC は RNA polymerase I を阻害することが過去に報告されており、本研究の結果を支持するものだった。また、小児 BCP-ALL において多剤耐性に関連する因子は報告されておらず、核小体ストレス応答の機能低下が 6-MP, MTX, DNR, AraC の多剤耐性に関連することを示した本研究は意義深いものと考えた。

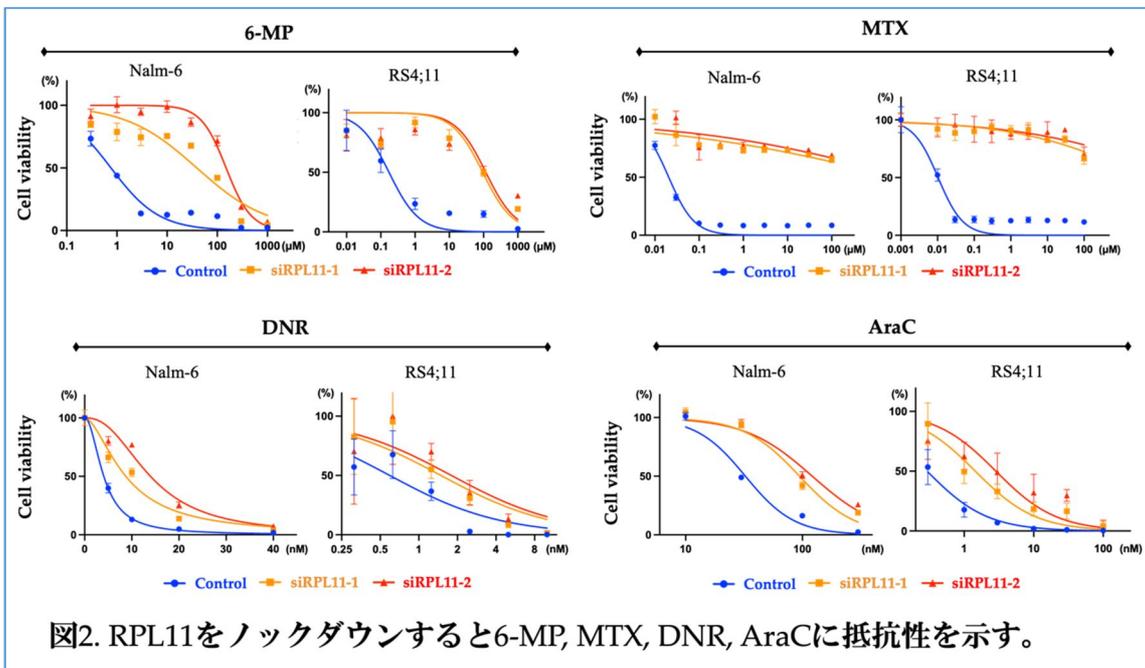


図2. RPL11をノックダウンすると6-MP, MTX, DNR, AraCに抵抗性を示す。

### (3) 核小体ストレス応答の機能低下は薬剤抵抗性と再発に関連する

再発した小児 BCP-ALL 患者の 9 症例の診断時と再発時の検体を用いて解析した。Real time PCR 法で RPL11 の mRNA を評価すると、9 症例中 7 症例で再発時に RPL11 の発現が低下していた。また、3 症例では第二再発時は第一再発時よりも RPL11 の発現が低下していた (図 3)。再発時に RPL11 が低下した症例の中で、検体が十分量採取・保存されていた一症例を用いて、6-MP/MTX/DNR/AraC の薬剤感受性とタンパク発現を評価したところ、再発時にはこれらの薬剤に対して P53 の発現低下を伴って薬剤抵抗性を示した。以上から、6-MP/MTX/DNR/AraC は臨床的にも薬剤抵抗性を示し、再発に関連することが示唆された。

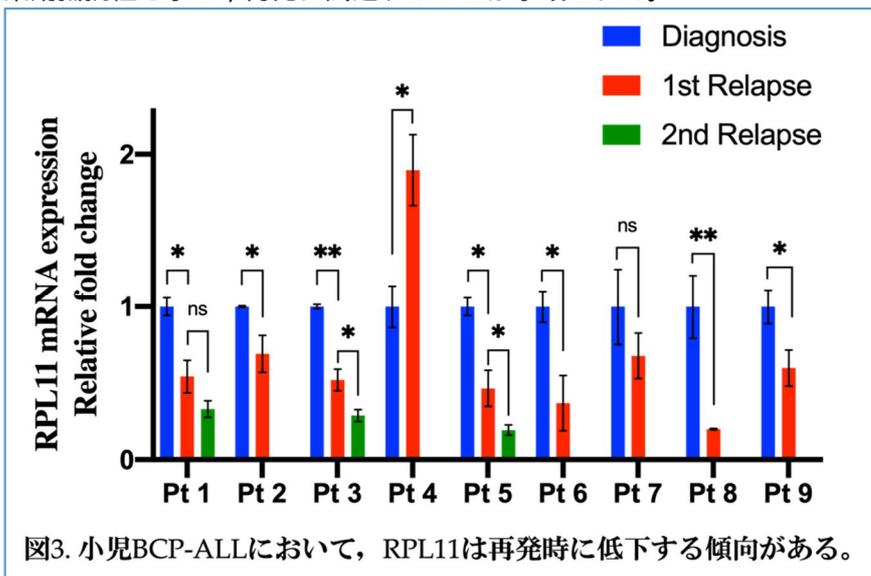


図3. 小児BCP-ALLにおいて、RPL11は再発時に低下する傾向がある。

### まとめ

本研究によって、BCP-ALL でも核小体ストレス応答が機能し、抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。さらに、小児 ALL 治療で用いられる抗腫瘍薬の中で 4 種類 (6-MP, MTX, DNR, AraC) が新たに核小体ストレス応答を誘導する薬剤として特定できた。また、臨床的にも核小体ストレス応答の機能低下が再発や治療抵抗性に関連する可能性が示唆された。

本研究で得られた重要な点として、RPL11 が小児 BCP-ALL の多剤耐性を予測するためのマーカーとなり得ることである。今後も研究をすすめ、RPL11 を多剤耐性予測マーカーとして確立することで再発・治療抵抗性の小児 ALL 治療の改善に寄与できる可能性がある。また、核小体ストレス応答を活性化させる仕組みを解明、開発することができれば、新たな小児 ALL 治療の展開につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 小児白血病に対する薬剤の有効性の判定を補助する方法、小児白血病に対する薬剤投与後の予後の判定を補助する方法及びキット	発明者 中川俊輔，河原康一，岡本康裕，古川龍彦	権利者 国立大学法人鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-070943	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------