

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591194

研究課題名（和文） 白血病細胞の恒常的活性化シグナルとチェックポイント機構に対する統合的分子標的療法

研究課題名（英文） Combined Anti-Leukemia Therapy Targeting Constitutively Activated Tyrosine Kinases and Checkpoint Activation Mechanisms

研究代表者

三浦 修 (MIURA OSAMU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10209710

研究成果の概要（和文）：種々の白血病や骨髄増殖腫瘍の発症や進展および治療抵抗性には、細胞の増殖や生存を調節する細胞内のチロシンリン酸化酵素の構造異常が重要な役割を果たしているが、その主なものである BCR/ABL, Flt3-ITD および Jak2-V617F を標的とした分子標的療法薬などと、抗癌剤とを併用することで、これらの異常酵素を発現する白血病細胞の抗癌剤耐性が克服される事を見だし、その詳細な仕組みを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Constitutively activated aberrant tyrosine kinases play important roles in development and evolution of hematopoietic malignancies and are also implicated in acquisition of therapy resistance. We found that the chemotherapy resistance of hematopoietic cells transformed by BCR/ABL, Flt3-ITD, or Jak2-V617F could be conquered by combining specific tyrosine kinase inhibitors against these aberrant kinases with DNA-damaging chemotherapeutic agents and elucidated the underlying molecular mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：血液腫瘍学・白血病・分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

白血病の発症と進展には BCR/ABL や Flt3-ITD 等のチロシンキナーゼ変異による増殖シグナルの異常活性化が重要な役割を果たし、これらを分子標的とした薬剤が開発され臨床応用されつつある。しかし、これらの活性化変異標的の抑制のみでは、特に急性白血病細胞では十分な効果が得られず、また容易

に耐性を生じうる。一方、白血病の治療に中心的役割を果たす抗癌剤治療は、主に DNA 損傷を生じ腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するが、正常細胞をも障害し強い副作用を伴い、細胞周期停止チェックポイント機構の活性化等の機序により治療抵抗性を生じる。最近申請者は増殖シグナル活性化がチェックポイント機構の亢進を介して抗癌剤耐性をもたらし、こ

れを抑制することにより抗癌剤によるアポトーシスの誘導を相乗的に亢進させることを見いだした。また、現在開発中のチェックポイントやアポトーシス制御機構に対する分子標的薬により活性化チロシンキナーゼ標的薬の効果を相乗的に亢進しうることを見いだしている。

DNA損傷によりATM/ATRが活性化され、p53とChk1の活性化を介して、それぞれG1およびG2チェックポイント制御誘導にいたるシグナル伝達機構に関しては、近年世界的に研究が進展している。しかしチェックポイント調節機構が腫瘍細胞の異常増殖シグナル伝達機構により制御され、抗癌剤耐性をもたらす腫瘍の難治化に至る過程に関しては、他にほとんど研究が見られず、その分子機構の詳細は不明である。また、Mdm2阻害薬nutlin-3aやBcl2阻害薬ABT-737等の分子標的薬は臨床応用も間近に期待され研究開発が行われているが、imatinib等の既存の分子標的薬や抗癌剤との有効な併用法およびその基礎となる相乗効果の分子機構に関しては、世界的にほとんど研究成果が得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、増殖・アポトーシス・チェックポイント制御のシグナル伝達ネットワークを統合的に標的とした根治的な白血病治療法の開発を目指して、これらの分子標的薬および抗癌剤の相乗的かつ効果的な組み合わせを見いだすと共に、その相乗効果の分子機構を明らかにして併用療法開発の理論的基盤の確立を目指す。種々の治療抵抗性Ph陽性急性リンパ性白血病（ALL）や急性骨髄性白血病（AML）臨床検体を含めて、白血病細胞でのBCR/ABL・FLT3-ITD・Jak2-V617F等の恒常的活性化異常チロシンキナーゼによる、Chk1及びp38依存性の抗癌剤誘導性G2チェックポイント活性化促進の分子機構を解明し、抗癌剤耐性獲得における意義を明らかにすると共にその制御法を検討する。特に、Chk1活性化調節機構に関しては、Chk1と相互作用する分子を網羅的な探索により明らかにする。白血病に対する統合的分子標的療法を開発するため、恒常的チロシンキナーゼ活性化シグナルの阻害薬と相乗的に作用しアポトーシスを誘導する分子標的薬および抗癌剤を見だし、その分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

IL-3 依存性マウス造血細胞株BaF3細胞にテトラサイクリン依存性にBCR/ABLを発現さ

せた細胞株Ton. B210細胞や、IL-3 依存性マウス造血細胞株 32D にエリスロポエチンレセプター(EpoR)を導入した細胞株 32DE とその派生クローン、および Epo 依存性ヒト急性巨核芽球性白血病 (AML-M7) 由来 細胞株 UT7、Jak2-V617F 変異を導入しサイトカイン非依存性を示す細胞株 UT7/Jak2-V617F を用い、VP16 や DXR など DNA 損傷ストレス下における Epo-Jak2 シグナル伝達因子および関与する分子の動向、様々な阻害薬の影響につきウェスタンブロット(WB)法にて検討した。Jak2 の Ubi 化について、ヒト胎児腎上皮細胞株 293T を用いた遺伝子導入実験により、WB 法で検討した。またフローサイトメトリー(FCM)法を用いて、これらの細胞における細胞周期法によるアポトーシス分析、またミトコンドリア膜電位変化、 Bcl2 ファミリー蛋白質 Bax およびカスパーゼ 3 の活性化について解析した。293T 細胞での検討では、Flt3-ITD や Cbl の発現プラスミドを遺伝子導入し一過性に発現させ、Flt3-ITD の安定性などをウェスタンブロット法により解析した。また 32D 細胞での検討では、Flt3-ITD や Cbl の発現プラスミドをレトロウイルスにより導入し同様にウェスタンブロット法により解析した。またヒト白血病細胞株 MV4-11 を用いた検討も行った。また細胞増殖については XTT アッセイを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 恒常的チロシンキナーゼ活性化シグナルの阻害と相乗的に作用し、白血病細胞のアポトーシスを誘導する細胞内シグナル制御法を開発するため、特にMDM2阻害薬nutlin-3aについてBCR/ABL阻害剤でPh陽性白血病の治療に用いられているimatinibとの相乗効果の可能性につき検討した。その結果、Ph陽性ALLおよびCML急性転化症例の臨床検体や、imatinib耐性E255K変異BCR/ABL発現株を含めたBCR/ABL発現細胞において、Mdm2阻害薬nutlin-3aがp53の発現誘導を介してimatinibと相乗的にBaxの活性化とmitochondria依存性アポトーシスを誘導することを明らかにした (Apoptosis 15:608-620, 2010)。Mdm2阻害剤は臨床応用に向けて世界的に開発が行われているが、チロシンキナーゼ阻害薬との相乗効果を見だし、その細胞内分子機構を明らかにした成果は、世界的にも類を見ず、Ph陽性白血病のみでなく、恒常的チロシンキナーゼが発症や進展に関与する他の種々の造血器腫

瘍やその他の癌に対する新たな統合的分子標的療法の開発への貢献が期待される。

(2) Raf阻害薬として開発され現在腎癌等の治療に臨床応用されているsorafenibが、imatinib耐性のT315I変異体を含めてBCR/ABLを直接抑制することによりPh陽性白血病にアポトーシスを誘導することを見いだした (Cancer Res 69:3917, 2009)。T315I変異は新たなBCR/ABL阻害薬を含めた治療にも抵抗性を示し、Ph陽性白血病治療における最大の臨床的問題点であるが、既に臨床応用されているsorafenibによりこの変異体の酵素活性自体が抑制され細胞死をもたらす事を世界に先がけて明らかにした本研究成果は、治療への応用が強く期待出来る。

(3) エトボシド(VP16)やドキシソルビシン(DXR)などの抗癌剤処理によるDNA損傷ストレスが、チロシンキナーゼ阻害薬による活性阻害下にJak2-V617Fのユビキチン・プロテアソーム系およびカスパーゼによる分解をもたらすことを見出した。またこの機構の制御にはGSK3βが重要な役割を果たし、この機構によりチロシンキナーゼ阻害薬と抗癌剤により相乗的にカスパーゼ活性化とアポトーシス誘導がもたらされることを示し報告した (PLoS ONE 6:E27397, 2011)。恒常的活性化チロシンキナーゼの抑制のみでなくその分解を誘導しうることを見いだした本研究成果は世界的に独自性に富む成果であり、耐性発症の予防や白血病幹細胞の撲滅を目指す治療法の開発へも貢献しうる意義を持つ。

(4) F13-ITDに関してはHSP90の機能を特異的阻害薬で抑制することで、E3ユビキチンリガーゼc-CblおよびCbl-bによりK48を介したポリユビキチン化を受けて、ユビキチン・プロテアソーム系にて分解されることを見出し報告した (J. Biol. Chem. 286:30263-73, 2011)。c-CblおよびCbl-bに関しては変異体が種々の造血器腫瘍で見出されており、造血細胞特異的チロシンキナーゼのUPSによる制御機構はこれらの腫瘍の発症進展や治療抵抗性獲得機構との関連でも重要な意義が予測される。

(5) BCR/ABL、JAK2-V617FおよびF1t3-ITDで形質転換した造血細胞を、をそれぞれの阻害薬imatinib, JakI-1およびsorafenibで阻害すると、VP16やDXRでのChk1の活性化によるG2/M期の細胞周期移行障害が抑制されアポトーシスが相乗的に誘導されることを見だし、またこの機能にはGSK3βの活性化とユビキチン・プロテアソーム系によるChk1の分解が関与する事を明らかにした (投稿準備中)。本

研究成果は対象とした恒常的活性化チロシンキナーゼが関与する種々の造血器腫瘍の治療に直ちに應用しうる結果であり、今後の分子標的療法と抗癌剤とを組み合わせた治療プロトコルの作成にも貢献しうるものである。

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 13 件)

- ① Oshikawa G, Nagao T, Wu N, Kurosu T, Miura O: c-Cbl and Cbl-b ligases mediate 17-allylaminodemethoxygeldanamycin-induced degradation of autophosphorylated Flt3 kinase with internal tandem duplication through the ubiquitin proteasome pathway. J Biol Chem 286:30263-30273, 2011. (査読有り)
- ② Nagao T, Oshikawa G, Wu N, Kurosu T, Miura O: DNA damage stress and inhibition of Jak2-V617F cause its degradation and synergistically induce apoptosis through activation of GSK3beta. PLoS ONE 6:e27397, 2011. (査読有り)
- ③ Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S: Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. PLoS Pathog 7:e1002326, 2011. (査読有り)
- ④ Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Yoshimori M, Koyama T, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O: Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. Int J Hematol 93:602-609, 2011. (査読有り)
- ⑤ Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Kagechika H, Miura O: Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3

through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 15:608-620, 2010. (査読有り)

- ⑥ Oshikawa G, Kurosu T, Arai A, Murakami N, Miura O: Clonal evolution with double Ph followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 199:56-61, 2010. (査読有り)
- ⑦ Nakauchi Y, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Shibata S, Ishiwata Y, Shibuya Y, Yasuhara M, Miura O, Arai A: Concurrent administration of intravenous systemic and intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma with central nervous system involvement. *Int J Hematol* 92:179-185, 2010. (査読有り)
- ⑧ Kurosu T, Ohki M, Wu N, Kagechika H, Miura O: Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway. *Cancer Res* 69:3927-3936, 2009. (査読有り)
- ⑨ Wakabayashi S, Arai A, Oshikawa G, Araki A, Watanabe M, Uchida N, Taniguchi S, Miura O: Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, of the small intestine diagnosed by double-balloon endoscopy. *Int J Hematol* 90:605-610, 2009. (査読有り)
- ⑩ Nonaka M, Uota S, Saitoh Y, Takahashi M, Sugimoto H, Amet T, Arai A, Miura O, Yamamoto N, Yamaoka S: Role for protein geranylgeranylation in adult T-cell leukemia cell survival. *Exp Cell Res* 315:141-150, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

- ① Oshikawa G, Nagao T, Wu N, Kurosu T,

Miura O.: c-Cbl and Cbl-b mediate 17-AAG-induced Flt3-ITD degradation through the ubiquitin proteasome pathway. 第 73 回日本血液学会総会, 2011 年 10 月 14-16 日, 名古屋.

- ② Wu N, Kurosu T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: PECAM-1 possibly mediates BCR/ABL signaling and modulates imatinib sensitivity of Ph⁺ leukemic cells. 第 73 回日本血液学会総会, 2011 年 10 月 14-16 日, 名古屋.
- ③ Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Inhibition of BCR/ABL downregulates Chk1 to induce apoptosis synergistically with chemotherapeutics. 第 73 回日本血液学会総会, 2011 年 10 月 14-16 日, 名古屋.
- ④ Nagao T, Oshikawa G, Wu N, Kurosu T, Miura O.: Inhibition of Jak2-V617F under DNA-damage stress induces its degradation and synergistic apoptosis. 第 73 回日本血液学会総会, 2011 年 10 月 14-16 日, 名古屋.
- ⑤ Oshikawa G, Wu N, Nagao T, Suzuki T, Kurosu T, Miura O.: c-Cbl-mediated ubiquitination of Flt3-ITD and cellular mechanisms regulating its degradation. 第 72 回日本血液学会総会, 2010 年 9 月 24-26 日, 横浜.
- ⑥ Wu N, Kurosu T, Suzuki T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Roles for PECAM-1 (CD31) in signaling from and leukemogenesis by BCR/ABL. 第 72 回日本血液学会総会, 2010 年 9 月 24-26 日, 横浜.
- ⑦ Nagao T, Wu N, Oshikawa G, Suzuki T, Kurosu T, Miura O.: Molecular mechanisms regulating DNA damage-induced degradation of Jak2-V617F and apoptosis. 第 72 回日本血液学会総会, 2010 年 9 月 24-26 日, 横浜.

- ⑧ Kurosu T, Wu N, Suzuki T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Chemotherapy resistance through enhanced Chk1 activation by BCR/ABL, Flt-ITD and Jak2-V617F. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 修 (MIURA OSAMU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号： 10209710

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：