

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25年 5月 28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591036

研究課題名（和文） 腫瘍原性チロシンキナーゼ依存性細胞増殖機構の弱点の解析

研究課題名（英文） Analysis of weak points in oncogenic tyrosine kinase-dependent growth

研究代表者

水木 満佐央（MIZUKI MASAO）

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80283761

研究成果の概要（和文）：

t(4;14)は多発性骨髄腫の予後不良因子であるが、本染色体異常を有する骨髄腫細胞においては線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR3)遺伝子の異所性高発現が生じている。更にt(4;14)陽性骨髄腫の一部の進行例では、FGFR3の活性化変異が認められる。プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブは、Lys650Glu変異FGFR3発現形質細胞腫瘍に特に有効であり、その細胞毒性の増強は小胞体ストレス依存性であることが示唆された。またその小胞体ストレスの増強は、Lys650Glu変異FGFR3が小胞体において異所性に活性化を示すことと関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The ectopically expressed fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) and its constitutive active mutations have been detected in patients with multiple myeloma (MM). This study investigated whether the cytotoxic effects of bortezomib on malignant plasma cells are associated with FGFR3 expression and the existence of mutations of FGFR3. Materials and Methods: Cell apoptosis assays were performed in a plasmacytoma cell line, FR4 cells and a myeloma cell line, RPMI8226 cells overexpressing wild-type FGFR3 (FGFR3WT) or two different mutants, FGFR3K650E or FGFR3Y373C, and the induction of endoplasmic reticulum (ER) stress protein was compared between each type of cells. Results: FR4 cells with FGFR3K650E showed enhanced sensitivity to bortezomib together with increased induction of ER stress proteins, compared to FR4 cells with mock, FGFR3WT or FGFR3Y373C. RPMI8226 cells with FGFR3K650E also showed enhanced bortezomib sensitivity. Conclusion: This study indicated that FGFR3K650E is associated with bortezomib sensitivity in malignant plasma cells via ER stress pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

恒常的活性化変異および過剰発現によるチロシンキナーゼの異常活性化は、多くの癌に共通して認められる遺伝子異常であり、癌の発症および悪性化に重要な役割を担っている。我々のグループは、特に造血器腫瘍におけるレセプター型チロシンキナーゼ c-Kit, FLT3 の活性化変異について研究を行ってきた。今日、多くのチロシンキナーゼ阻害剤が多種のがんに対して開発され一定の臨床効果をおさめている。しかし、一方で耐性の出現、及び CML の imatinib 治療において示されたように、がん幹細胞がこれらの阻害剤では駆逐することができないという事実が明らかとなり、より根治的な治療法の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

(1) チロシンキナーゼ依存性の腫瘍性増殖にがん細胞が適応することにより必要となっている相補的な遺伝子異常を見出し、本異常に対する分子標的療法を併用することにより、チロシンキナーゼ異常活性化を有するがん、特にそのがん幹細胞に対してより強力な治療法の開発を目指す。

(2) プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブは、多発性骨髄腫に対して極めて有用な薬剤であるが、その作用機序は完全には明らかになっていない。一方ボルテゾミブは、これまで予後不良とされてきた染色体異常 t(4;14)をもつ骨髄腫患者に対しても有効であることが明らかにされつつある。t(4;14)は線維芽細胞増殖因子受容体 3(FGFR3)遺伝子の異所性発現を生じさせるが、この FGFR3 の発現は細胞死の抑制や増殖促進に結びつくと考えられている。更に、t(4;14)陽性骨髄腫の一部の進行例では、FGFR3 の活性化変異が認められる。そこで今回は、FGFR3 (野生型、変異型)の発現による腫瘍細胞のボルテゾミブ感受性の亢進の可能性について検討した。

(3) 患者末梢血中には、腫瘍細胞由来の樹状細胞(dendritic cell; DC)が認められ、また in vitro で腫瘍細胞を樹状細胞に分化させることが可能である。これらの腫瘍由来の樹状細胞は腫瘍抗原特異的な免疫反応に関与しうるものであり、同細胞集団の解析は造血器腫瘍の発症、再発における免疫学的機序の解明に重要と考えられる。しかし、これまで骨髄系造血器腫瘍由来樹状細胞は GM-CSF を用いた炎症状態での誘導のみが検討され、疾患の発症や再発時に相当すると考えられる定常状態での分化は検討されてこなかった。また、樹状細胞分化における骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の役割も明らかではない。そこで本研究ではまず、FLT3 リガンドを用い定常状態に相当する状況下でマウス

造血幹・前駆細胞から樹状細胞を誘導する培養系を確立し、この培養系において骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常が、樹状細胞分化に及ぼす影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性化変異レセプターキナーゼ発現腫瘍性形質細胞のプロテアソーム阻害剤への感受性の解析

① 形質細胞腫細胞株 FR4 及び骨髄腫細胞株 RPMI8226 に FGFR3 遺伝子(野生型、Lys650Glu 変異、Tyr373Cys 変異)を導入した。各細胞株の免疫染色での FGFR3 発現及びその活性化状態について解析を行った。

② 各種 FGFR3 を発現した形質細胞腫瘍細胞株の FGF リガンド存在下におけるボルテゾミブ感受性を Annexin V assay 法を用いて検討した。

③ ボルテゾミブの投与が小胞体ストレス蛋白の誘導へ及ぼす影響を、FGFR3 導入 FR4 細胞を用いて real time PCR 法で解析した。

④ FGFR3 導入 FR4 細胞に glycosylation 阻害剤である tunicamycin を加えて小胞体ストレスを負荷、もしくは蛋白合成阻害剤である cycloheximide を加えて小胞体ストレスを軽減させることでのボルテゾミブ感受性について検討した。

(2) 骨髄系造血器腫瘍特異的遺伝子異常が樹状細胞分化に及ぼす影響の解析

① 樹状細胞誘導培養系の確立
マウス骨髄細胞から造血幹・前駆細胞分画である LSK 細胞をソーティングし、TPO+SCF で 2 日間培養後、96well 丸底プレートを用い FLT3 リガンド存在下で 7 日間培養した。

② 骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の樹状細胞分化に及ぼす影響の解析

LSK 細胞に骨髄系腫瘍関連遺伝子異常を導入し、その後 FLT3 リガンド存在下で 7 日間培養した。誘導された全 DC 数、pDC/cDC ratio、成熟度、allo MLR、programmed death ligand-1 (PD-L1)の発現について検討した。Class I mutation として FLT3-ITD、FLT3-TKD、CA(constitutive active)-N-Ras、c-Kit-TKD、FIP1L1/PDGFR α 、TEL/PDGFR β 、class II mutation として AML1/ETO、PML/RAR α 、CBF β /MYH11、AML1dC について検討した。

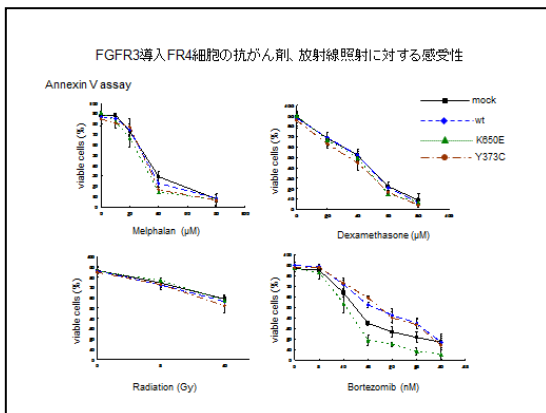
4. 研究成果

(1) 活性化変異レセプターキナーゼ発現腫瘍性形質細胞のプロテアソーム阻害剤への感受性の解析

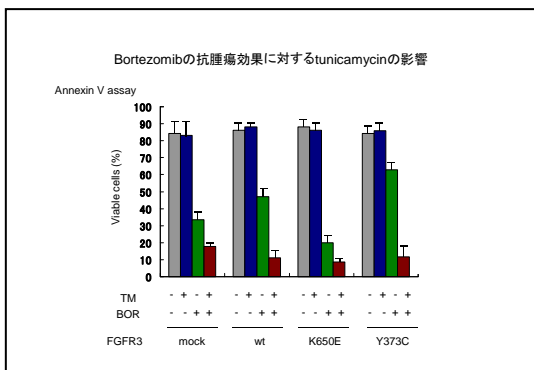
① 形質細胞腫細胞株 FR4 及び骨髄腫細胞株 RPMI8226 に FGFR3 遺伝子(野生型、Lys650Glu 変異、Tyr373Cys 変異)を導入した。各細胞株の免疫染色での解析により、野生型または

Tyr373Cys 変異 FGFR3 は細胞表面に発現し主として細胞膜上で活性化を示すことに対して、Lys650Glu 変異 FGFR3 は細胞内の小胞体に局在すると共に同部において恒常的活性化を示し特異的活性化形態を示した。

② 上記の細胞の FGF リガンド存在下におけるボルテゾミブ感受性を Annexin V assay 法を用いて検討した。その結果、FR4 細胞にメルファランやデキサメサゾンの投与、あるいは放射線照射を行った場合は各細胞間に毒性の差はみられなかったが、ボルテゾミブを投与した場合は、FGFR3 Lys650Glu 発現細胞においてその作用が増強していた。同様に、RPMI8226 細胞に放射線照射を行った場合は各細胞の細胞死に差を認めなかったが、ボルテゾミブを投与した場合は、やはり FGFR3 Lys650Glu 発現細胞においてその作用が増強する傾向を認めた。



③ ボルテゾミブの投与が小胞体ストレス蛋白の誘導へ及ぼす影響を、FGFR3 導入 FR4 細胞を用いて real time PCR 法で調べたところ、FGFR3 Lys650Glu 発現細胞において、BiP、Edem1 及び CHOP の誘導が強くなっていた。また RPMI8226 細胞においても、ボルテゾミブ投与により、FGFR3 Lys650Glu 発現細胞において CHOP の誘導がより強くなる傾向が認められた。さらに、FGFR3 導入 FR4 細胞に glycosylation 阻害剤である tunicamycin を加えて小胞体ストレスを負荷したところ、各細胞ともボルテゾミブ感受性が増強し、同等の細胞死を示した。



一方で、蛋白合成阻害剤である cycloheximide を加えて小胞体ストレスを軽減させたところ、Lys650Glu 発現によるボルテゾミブ感受性増加がうち消され、各細胞ともボルテゾミブ感受性の低下を認めた。

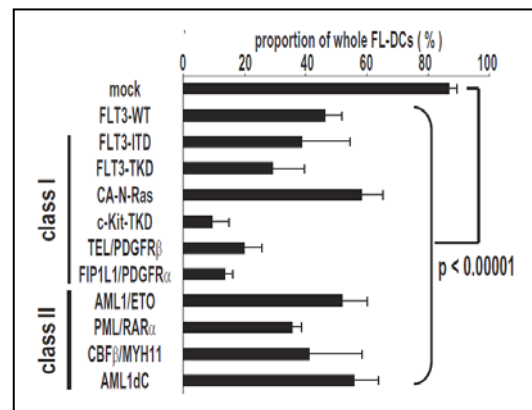
(2) 骨髄系造血器腫瘍特異的遺伝子異常が樹状細胞分化に及ぼす影響の解析

① 樹状細胞誘導培養系の確立

培養 9 日目には全培養細胞の 80%以上が CD11c 陽性を示した。CD11c 陽性細胞は、plasmacytoid DC (pDC) と conventional DC (cDC) に分けられ、その比率 (pDC/cDC ratio) は、再現性をもって定常状態における脾臓 DC の比率とほぼ同等な値を示した。この培養系で誘導された DC は、allo MLR 活性或いは CpG 刺激による IFN- α 産生能を有し、機能的であることを確認した。

② 骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の樹状細胞分化に及ぼす影響の解析

コントロールに比べ FLT3-ITD、CA-N-Ras は全 DC 数の増加を認めたが、それ以外ではすべて減少を認めた。pDC/cDC ratio は、FLT3-ITD、FLT3-TKD およびすべての class II mutation はコントロールと同等の値を示したが、CA-N-Ras、c-Kit-TKD、FIP1L1/PDGFR α 、TEL/PDGFR β では著明な低下を認めた。また恒常活性化型のシグナル伝達分子について検討したところ、CA-STAT3 および CA-PI3 kinase では pDC/cDC ratio は軽度上昇したが、CA-MEK1 および CA-STAT5A では著明な減少を認め、FLT3-ITD、FLT3-TKD 以外の class I mutation に認められた pDC/cDC ratio の低下は MEK、STAT5 の異常活性化の関与が示唆された。DC 細胞表面の MHCII、共刺激分子 (CD80、CD86) の発現強度を指標に成熟度を解析したところ、class I mutation 間で成熟度が異なり、成熟度の低い FLT3-ITD 誘導 DC はコントロールと同等の MLR 活性を示したが、成熟度の高い CA-N-Ras 誘導 DC および TEL/PDGFR β 誘導 DC は高い MLR 活性を示した。更に FLT3-ITD、CA-N-Ras および TEL/PDGFR β はコントロールには見られない PD-L1 陽性 DC を誘導し、抗腫瘍免疫異常への関連が示唆された。



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)

- ① Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Matsui K, Shibata M, Mizuki M, Kanakura Y. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 26:303-311, 2012 査読有
- ② 水木満佐央, 金倉 譲. 肥満細胞症の病因・病態と治療. *日本臨牀* 70(増刊2):337-341, 2012 査読無
- ③ Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett* 136:61-73, 2011 査読有
- ④ Otsuka M, Mizuki M, Fujita J, Kang S, Kanakura Y. Constitutively active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. *Anticancer Res* 31:113-122, 2011 査読有
- ⑤ 池田純一郎, 水木満佐央, 金倉 譲. Primary effusion lymphoma の発症機序と治療の進歩. *血液・腫瘍科* 61:307-312, 2010 査読無
- ⑥ 水木満佐央, 金倉 譲. 肥満細胞症の病態と治療. *血液・腫瘍科* 61:177-183, 2010 査読無

[学会発表] (計7件)

- ① 藤田二郎, 水木満佐央, 大塚正恭, 江副幸子, 佐藤友亮, 福島健太郎, 徳永正浩, 田中宏和, 松村 到, 金倉 譲. 造血器腫瘍関連遺伝子異常が樹状細胞分化に及ぼす影響の解析. 2012.6.29, 第22回日本サイトメトリー学会学術集会、大阪国際会議場
- ② Otsuka M, Mizuki M, Fujita J, Kang S, Kanakura Y. Constitutive active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. 2011.6.9, The 16th Congress of the European Hematology Association, London, UK
- ③ 大塚正恭, 水木満佐央, 藤田二郎, 金倉 譲. 恒常活性化変異 FGFR3 Lys650Glu は形質細胞腫瘍のボルテゾミブ感受性を増強する. 2011.10.14, 第73回日本血液学会学術集会、愛知
- ④ 大塚正恭, 前田哲生, 水木満佐央, 石橋知彦, 近藤有理, 佐多 弘, 南 亮太,

福島健太郎, 江副幸子, 田所誠司, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 譲. 当科における悪性リンパ腫に対する DeVIC 療法施行例の後方視的検討. 2011.7.22, 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、神奈川

⑤ Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect FLT3-ligand mediated dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. 2010.12.6, The American Society of Hematology 52nd Annual meeting, Orlando, USA

⑥ 藤田二郎, 水木満佐央, 大塚正恭, 江副幸子, 田中宏和, 佐藤友亮, 福島健太郎, 徳永正浩, 松村 到, 金倉 譲. Leukemia-related gene abnormalities affect steady-state dendritic cell differentiation (非炎症状態の樹状細胞分化における白血病関連遺伝子異常の役割). 2011.9.22, 第69回日本癌学会学術総会、大阪

⑦ 藤田二郎, 水木満佐央, 大塚正恭, 江副幸子, 田中宏和, 佐藤友亮, 福島健太郎, 徳永正浩, 松村 到, 金倉 譲. Leukemia-related gene abnormalities affect FLT3-ligand-mediated dendritic cell differentiation. 2010.9.25, 第72回日本血液学会学術集会、神奈川

[図書] (計5件)

- ① 水木満佐央, 金倉 譲. 多発性骨髄腫治療マニュアル (木崎昌弘編)、南江堂、2012、pp293-299
- ② 水木満佐央, 金倉 譲. 内科学 (門脇孝、永井良三総編集)、西村書店、2012、pp1389-1394
- ③ 西村純一, 柴山浩彦, 水木満佐央, 金倉 譲. 薬剤ごとの違いがわかるステロイドの使い分け (山本一彦、鈴木洋史編)、羊土社、2010、pp215-236
- ④ 水木満佐央. がんの統合医療 (伊藤壽記、上島悦子監訳)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、2010、pp198-216
- ⑤ 水木満佐央. TNM 悪性腫瘍の分類 日本語版第7版 (Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch 編, UICC 日本委員会, TNM 委員会訳)、金原出版、2010、pp286-291

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水木 満佐央 (MIZUKI MASAO)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 80283761

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：60346202