

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590309

研究課題名(和文) エキソゾーム熱ショック蛋白質のToll様受容体を介する慢性骨髄性白血病発癌制御

研究課題名(英文) The role of TLR4 signaling pathway and exosome heat shock protein in chronic myeloid leukemia

研究代表者

塚原 富士子 (Tsukahara, Fujiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40119996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害薬(イマチニブ)は、慢性骨髄性白血病の有効な治療薬として用いられているが、薬剤耐性による治療抵抗性の症例が報告されている。本研究では、Toll様受容体4 (TLR4)の白血病発症機構および薬剤耐性機序への関与について、白血病モデル細胞を用いて検討した。その結果、TLR4の活性化によりBCR-ABL蛋白質が増加し、イマチニブ耐性が誘導されることを見出した。また熱ショックタンパク質が、BCR-ABL蛋白質の安定性に関与していることを認めた。本研究成果は、慢性骨髄性白血病の薬剤耐性を克服する新たな治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although BCR-ABL tyrosine-kinase inhibitor (imatinib) is effective front-line therapy for chronic myeloid leukemia (CML), drug resistance is a well-recognized problem. In the present study, we found that the stimulation of TLR4 signaling pathway up-regulates BCR-ABL protein levels and may contribute to imatinib resistance. Heat shock proteins appear to be involved in the protein stability of BCR-ABL. Our findings provide new insight into the role of the TLR4 signaling pathway in drug resistance, and may have implications for the development of new therapeutic strategies to overcome drug resistance in CML.

研究分野：分子薬理学

キーワード：慢性骨髄性白血病 熱ショックタンパク質 Toll様受容体 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病の95%以上は、9番染色体長腕と22番染色体長腕の相互転座によりBCR-ABLキメラ遺伝子が形成され発症する。BCR-ABL遺伝子産物であるBCR-ABLチロシンキナーゼは恒常的に活性化され、細胞の増殖を促進、アポトーシスを抑制する。近年、BCR-ABL分子標的薬(イマチニブ等)が開発され臨床効果を発揮している。一方、薬剤耐性により治療困難な症例も報告されている。イマチニブ耐性機序として、BCR-ABL遺伝子の変異、蛋白質の増加、他のシグナル伝達系の活性化等が報告されている。これに対して、熱ショック蛋白質(Hsp)90阻害薬は、BCR-ABL蛋白質の分解を促進することからイマチニブ耐性を克服する治療薬として期待され、現在、臨床研究が進行している。我々は、既にBCR-ABL蛋白質の分解機序について詳細な検討を行い、Hsp90阻害薬によるBCR-ABL蛋白質の分解機序として、分子シャペロンと相互作用して働くCHIP、およびBCR-ABLと結合するアダプター蛋白質c-Cblが、BCR-ABL蛋白質をユビキチン化して分解を促進すること、さらに白血病モデル細胞のBCR-ABL依存性細胞増殖を特異的に阻害することを明らかにした。一方、イマチニブのABLキナーゼ領域への結合によるBCR-ABL蛋白質構造の安定化は、イマチニブ耐性の原因の一つとなり得ることを明らかにした(Tsukahara and Maru Blood 2010)。

Hspは、細胞内蛋白質のフォールディングや機能制御、輸送等に関与する分子シャペロンとして働くことが知られている。一方、Hspは、細胞から分泌されて循環血流に入り遠隔の細胞に働く“シャペロカイン”として樹状細胞等の細胞膜に存在するToll様受容体(Toll-like receptor, TLR)のリガンドとして働き、自然免疫や炎症の調節に関与することが示唆されている。TLR4は、造血細胞に発現しており、TLR4刺激による細胞内情報伝達系は、BCR-ABLの下流情報伝達系とクロストークしている可能性が考えられる。しかしながら慢性骨髄性白血病の病態進行および薬剤耐性におけるTLR4刺激の関与については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、慢性骨髄性白血病の病態進行過程および薬剤耐性における、熱ショック蛋白質およびTLR4の病態生理学的役割について明らかにするために、白血病モデル細胞を用いて、BCR-ABL依存性の細胞増殖およびBCR-ABL蛋白質の発現量について検討した。さらにプロテインホスファターゼPP2Aおよび白血病モデル動物の血中エキソゾーム熱ショック蛋白質の変化について検討を行った。

3. 研究の方法

(1)Ba/F3細胞の増殖はIL3依存性であるが、BCR-ABLを遺伝子導入することにより、BCR-ABL依存性の細胞増殖が認められる。そこでBa/F3細胞にTLR4およびBCR-ABLを過剰発現させ、Toll様受容体刺激の効果を検討した。さらに白血病モデル細胞としてK562、AR230、KCL22細胞を用いた。

(2)細胞をイマチニブ、TLR4のリガンドであるLipopolysaccharide (LPS)存在または非存在下で培養し、BCR-ABL依存性の細胞増殖を検討した。

(3)TLR4の発現量は、フローサイトメーターにて計測した。

(4)蛋白質量およびリン酸化は、ウエスタンブロット法にて計測した。

(5)TLR4刺激によるNFκB活性化はルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて検討した。

(6)白血病モデルマウス(BCR-ABLトランスジェニックマウス)の血中エキソゾームを単離し、Hsp90、Hsc70の含量をウエスタンブロット法にて検討した。

(7)BCR-ABL蛋白質の分解機序におけるHsp90、Hsc70シャペロン系の役割について、in vitro ubiquitination assay法等により検討した。

4. 研究成果

(1)白血病モデル細胞の増殖に対するTLR4シグナル伝達系の役割

高度に精製されたエンドトキシンフリーのHsp70およびHsp90を用いて、TLR4シグナルによるNFκB活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて詳細に検討した。その結果、これらのHspによる明らかなTLR4刺激効果は認められなかった。Hspは、TLR4のリガンドであるLPSと親和性が高いことが報告されており、これまでに報告されている熱ショック蛋白質によるTLR4刺激効果は、精製蛋白質に僅かに含まれているLPSによるものである可能性が高いと考えられた。そこで以下の実験では、LPSを用いてTLR4の刺激を行った。

TLR4およびBCR-ABLを発現しているBa/F3細胞を用いて、BCR-ABL依存性増殖について検討したところ、LPSはイマチニブによる細胞増殖抑制効果を減弱することを見出した。このLPSの作用は、TLR4を発現している白血病モデル細胞AR230およびKCL22細胞でみられたが、TLR4を発現していないK562細胞では、認められなかった。従って、LPSは、TLR4刺激を介してイマチニブの作用を減弱することが示唆された。

BCR-ABLによるMAPキナーゼ(Mitogen-Activated Protein Kinase)活性促進作用は、イマチニブにより抑制された。

一方、LPS は、イマチニブ存在および非存在下、いずれにおいても MAP キナーゼ活性を促進した。以上の結果から、TLR4 刺激による細胞増殖シグナル伝達系の活性化は、イマチニブ耐性機序の一つとなり得ることが示唆された。

(2) TLR4 シグナルによる BCR-ABL 蛋白質の安定化

TLR4 および BCR-ABL を発現している Ba/F3 細胞を用いて BCR-ABL 蛋白質量の変化を検討したところ、LPS による TLR4 シグナルの活性化により、BCR-ABL 蛋白質の増加がおこることを見出した。さらに BCR-ABL 蛋白増加機序について解析を行った。Hsp90 シャペロン系により成熟した BCR-ABL 蛋白質は、リン酸化依存性に c-Cbl によりユビキチン化されプロテアソームで分解された。一方、BCR-ABL は双方向性に c-Cbl の自己ユビキチン化を促進して細胞内 c-Cbl 蛋白質発現を減少させた。またイマチニブは、BCR-ABL チロシンキナーゼ活性を阻害することにより、c-Cbl の活性を抑制した。すなわち TLR4 刺激により成熟した BCR-ABL 蛋白質は、イマチニブ存在および非存在下、いずれにおいても c-Cbl による分解を免れることが示唆された。

以上の結果から、TLR4 刺激により BCR-ABL 蛋白質の安定化がおこり、イマチニブ耐性を引き起こす可能性が考えられる。本研究成果は、慢性骨髄性白血病の薬剤耐性を克服する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

(3) プロテインホスファターゼ PP2A による BCR-ABL 蛋白分解促進

Hsp70 のコシャペロンである Bag1 は、BCR-ABL の異常構造を認識するセンサーとして働き、CHIP による BCR-ABL の分解を促進した。BCR-ABL 蛋白の分解について詳細な検討を行った結果、PP2A は Bag1 による BCR-ABL の分解を促進することを明らかにした。また分子内相互作用による BCR-ABL の分解調節機構について検討をおこない、BCR-ABL 蛋白の安定化には、4 量体の形成、および BCR 部分の領域と ABL の SH2 領域との相互作用が関与することを明らかにした。現在、さらに BCR-ABL の分子構造と蛋白質の安定性について詳細な解析を進めている。

(4) 白血病モデル動物の血中エキソソーム熱ショック蛋白質の変化

白血病モデル動物 (BCR/ABL トランスジェニックマウス) の骨髄細胞、脾臓細胞において、各種熱ショック蛋白質が増加することを認めた。一方、血中エキソソーム中の Hsp90 をウエスタンブロットで検討した結果、細胞内の Hsp90 に比べ分子量が小さいことから、分泌の際にプロテアーゼで切断される可能性が示唆された。分子シャペロンである熱ショック蛋白質は、BCR/ABL 蛋白質の安定性の

みならず、個体レベルの白血病の病態進行において、重要な役割を演じている可能性が示唆され、その生理学的意義について現在さらに研究を進めている。

<引用文献>

Tsukahara F, Maru Y: Bag1 directly routes immature BCR-ABL for proteasomal degradation. *Blood*, 116, 3582-3592 (2010)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Maru Y, Tomita T, Deguchi A, Ieguchi K, Takita M, Tsukahara F, Takemura K, Kitao A, Gusovskiy F, Drug targeting based on a new concept-Targeting against TLR4 as an example. *Endocrine Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, 査読有, in press

Watanabe K, Shimizu T, Noda S, Tsukahara F, Maru Y, Kobayashi N, Nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex: Interaction of Hsc70 with viral proteins M1 and NS2. *FEBS Open Bio*, 査読有, 4, 2014, 683-688, DOI: 10.1016/j.fob.2014.07.004.

塚原富士子, 丸 義朗, 発癌メカニズムにおける mTOR. *医学のあゆみ*, 査読有, 248, 2014, 121-127

Tsukahara F, Maru Y, LPS/TLR4 signaling induces imatinib-resistance in Chronic myeloid leukemia-model cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 124, Suppl. 2014, 202P

Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y, Otsuji E, Takamatsu T, Connexin43 Functions as a Novel Interacting Partner of Heat Shock Cognate Protein 70. *Sci. Rep.*, 査読有, 3, 2013, 2179, DOI: 10.1038/srep02719.

Tsukahara F, Maru Y, Intramolecular regulatory mechanism of degradation of chronic myeloid leukemia oncoprotein, BCR-ABL. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 121, Suppl. 2013, 126P

Tsukahara F, Maru Y, Inhibition of immature protein sensor Bag1-mediated BCR-ABL degradation by Hsp90-cdc37 chaperone. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 119, Suppl. 2012, 121P

Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, Tai I, Shinmyozu K, Tsukahara F, Maru Y, Nakayama K, Nakayama KI, Suda T, p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, 査読有, 9, 2011, 247-261, DOI: 10.1016/j.stem.2011.07.003.

[学会発表](計 8 件)

Tsukahara F and Maru Y: TLR4 signaling

induces imatinib-resistance in Chronic myeloid leukemia-model cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2014年9月25-27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

塚原富士子、丸 義朗: TLR4 シグナルによる慢性骨髄性白血病モデル細胞のイマチニブ耐性誘導作用. 第131回日本薬理学会関東部会, 2014年10月11日, 横浜市立大学(神奈川県・横浜市)

Tsukahara F and Maru Y: LPS/TLR4 signaling induces imatinib-resistance in Chronic myeloid leukemia-model cells. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2014年3月19-21日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Tsukahara F, Maru Y: Intramolecular regulatory mechanism of degradation of chronic myeloid leukemia oncoprotein, BCR-ABL. The 86th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2013年3月21-23日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Tsukahara F, Maru Y: PP2A promotes immature protein sensor Bag1-mediated BCR-ABL degradation. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012年9月19-21日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

Tsukahara F, Maru Y: Inhibition of immature protein sensor Bag1-mediated BCR-ABL degradation by Hsp90-cdc37 chaperone. The 85th Annual meeting of the Japanese Pharmacological society, 2012年3月16日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Tsukahara F, Maru Y: Hsp90/Cdc37 chaperones attenuate immature protein sensor Bag1-mediated BCR-ABL degradation. The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Tsukahara F, Maru Y: Bag1 targets conformationally immature BCR-ABL for degradation. The 2nd JSH International Symposium, 2011年4月23-24日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原富士子 (TSUKAHARA, Fujiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40119996