

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591381

研究課題名(和文) JAKを阻害しない新規STAT3阻害剤の作用機序解明と白血病幹細胞への効果の検討

研究課題名(英文) Mechanism of action of a novel STAT3 inhibitor and its effect on leukemic stem cell

研究代表者

早川 文彦 (Hayakawa, Fumihiko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30402580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：STATは細胞の増殖、分化の制御に関わる転写因子で、その異常が癌の発症に深く関わっている。今回我々は新規STAT阻害剤OPB-31121がSTAT3及びSTAT5のリン酸化を阻害し、種々の造血器悪性腫瘍細胞株の増殖を抑制する事を示した。本剤はBCR-ABL、FLT3/ITD、JAK2 V617Fなどの癌遺伝子を持つ白血病に特に効果が高く、これらの白血病に対する効果がヒト化マウス白血病モデルでも示された。

研究成果の概要(英文)：STAT proteins are transcription factors that mediate cell proliferation and differentiation. Aberrant signals of STAT are strongly involved in cancer. We demonstrated that a novel STAT inhibitor, OPB-31121, strongly inhibited STAT3 and STAT5 phosphorylation, and induced significant growth inhibition in various hematopoietic malignant cells. OPB-31121 was particularly effective against leukemia harboring BCR-ABL, FLT3/ITD, and JAK2 V617F. We showed the significant anti-tumor effect of OPB-31121 against human leukemia cells using patient-derived xenograft model.

研究分野：内科系臨床医学

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：STAT阻害剤 分子標的薬 ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

STAT3 は種々のサイトカイン、増殖因子により JAK family あるいは Src family kinase(SFK)によりリン酸化・活性化され、2量体形成後核内へ移行し、細胞に増殖、抗アポトーシス等をもたらすシグナル伝達因子・転写因子である。急性骨髄性白血病を初めとする種々の造血器疾患や多くの固形腫瘍で STAT3 が活性化されている事は古くから知られており有望な治療標的と考えられてきた。STAT の上流キナーゼである JAK family に対しては阻害剤の開発が進んでおり、一部臨床試験が行われているものもあるが、上流キナーゼを阻害してもエスケープシグナルにより STAT のリン酸化が維持されてしまうなどして、期待された程の成果があがっていない。STAT family の機能を直接阻害する阻害剤への期待は高いが、実験試薬レベルでは存在しても、臨床応用が進んでいるものはまだない。

OPB-31121 は大塚製薬により開発中の高い抗腫瘍活性を持つ低分子化合物である。各種造血器悪性疾患細胞株、固形腫瘍細胞株に対し *ex vivo* で  $IC_{50} < 10$  nM という強い増殖抑制を示し、またマウス皮下播種されたこれら細胞株腫瘍の増殖を抑え一部では縮小/消失させる。こうした結果を受けて大塚製薬では香港、韓国、米国でフェーズ1臨床試験を行っている。本剤の作用機序には不明な点が多く、STAT3 のリン酸化を抑制する事は判明しているが、どのような機序で STAT3 リン酸化を抑制するのかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は上記のごとく高い抗腫瘍活性と安全性が動物実験で確認され、フェーズ1臨床試験を施行中の新規 STAT3 阻害剤 OPB-31121 の作用機序を明らかにし、また本薬剤が有効な癌種を同定する目的で開始された。

3. 研究の方法

(1) IL-6 により種々の細胞増殖シグナルが活性化するセルラインを用いて、本剤が主要な細胞増殖シグナルをどのように阻害するかを検討する。また、JAK2、Src など STAT の上流キナーゼが恒常的に活性化している細胞株において本剤を使用し、経時的な変化をみることで、上流キナーゼの抑制と STAT 抑制の時間的關係を検討する。

(2) 本剤使用後の細胞を抗 STAT 抗体で免疫染色することで STAT の核内移行の阻害の有無を検討する。

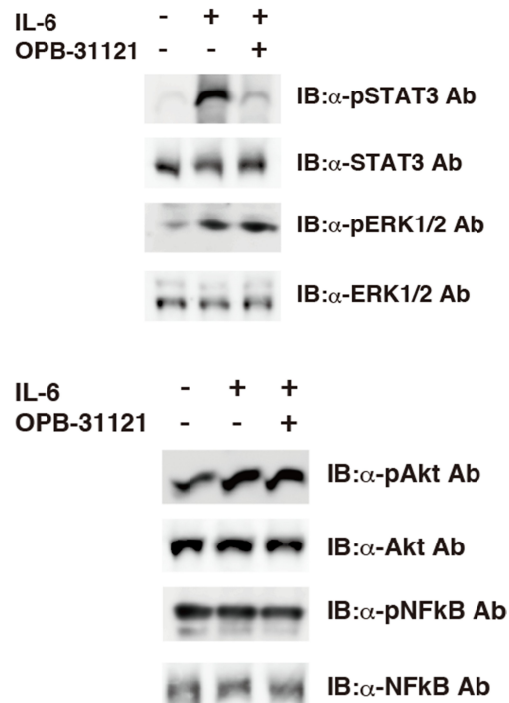
(3) 各種造血器悪性腫瘍細胞株に対する本薬剤の感受性を検討し、本薬剤の有効性が高い癌種を同定する。

(4) プライマリ白血病細胞を免疫不全マウスに移植したヒト化マウス白血病モデルを用いて本薬剤の有効性を検討する。

4. 研究成果

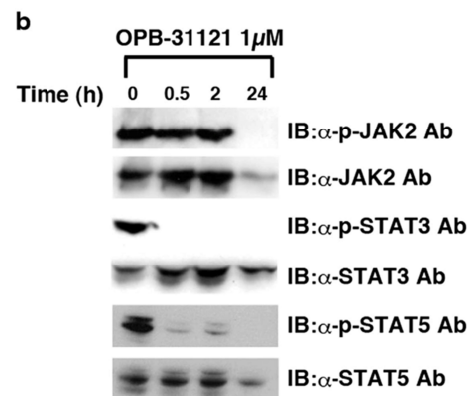
(1) 肝細胞癌細胞株 HepG2 を IL-6 で刺激し、活性化する主要な細胞増殖シグナル (STAT3、ERK1/2、Akt、NF- $\kappa$ B) のリン酸化に対し本剤が与える影響を検討した所、STAT3 のリン酸化のみが抑制され、他のシグナルへの影響はなかった(図1)。本剤は STAT シグナルを標的にしている事が確認された。

図1



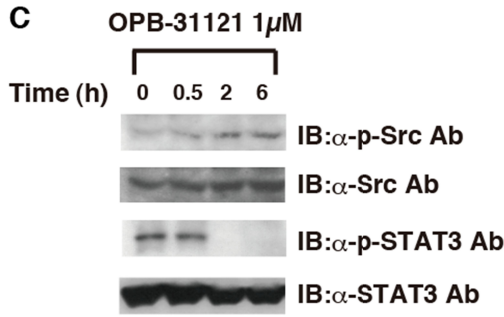
AML 細胞株 HEL に対し本薬剤を投与後経時的に JAK2 と STAT3、STAT5 のリン酸化を検討した所、JAK2 リン酸化が抑制されるより早く STAT のリン酸化は強く抑制されていた(図2)。

図2



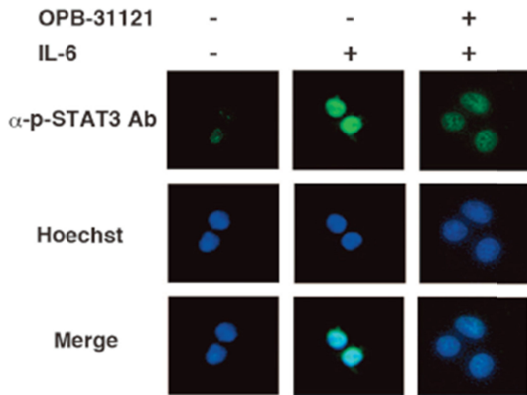
Src キナーゼが恒常的に活性化する事で STAT3 のリン酸化が起きている肺癌細胞株 H1650 でも同様に、Src のリン酸化が低下するより早く、STAT3 のリン酸化が消失していた(図3)。

図 3



(2) HepG2 細胞を本薬剤で処理した後 IL-6 で刺激すると、本薬剤の処理により STAT3 のリン酸化は強く抑制されていた。しかし弱いながらもリン酸化された STAT3 は核内へ移行しており、本薬剤は STAT3 の核内移行は阻害しないものと考えられた (図 3)。

図 3



(3) 本薬剤の IC<sub>50</sub> は BCR-ABL、FLT3/ITD、JAK2 V617F 陽性の白血病細胞株で特に低値であった。これらの癌遺伝子による癌化には STAT の異常活性化が重要であると考えられておりこれらを STAT-addictive oncokinas (SAO) と名付けた。SAO は本薬剤感受性腫瘍のマーカーになると考えられた (表 1)。

またこれらの癌種の細胞株を播種したマウスに対し本薬剤を経口投与した所著明な腫瘍退縮効果を認め、マウスモデルでの有効性も確認された (表 2)。

(4) SAO 陽性白血病症例でヒト化マウス白血病モデルを作製し、これに対し本薬剤を使用した所、著明な腫瘍の抑制効果を認めた (表 3)。

これらの結果より本薬剤作用機序の一部が解明され、SAO 陽性白血病に対し本薬剤の効果が期待できる事が明らかになった。これら情報は本薬剤の臨床開発戦略、早期臨床応用に資することになると期待される。

表 1

**Table 2. Comparison of OPB-31121 effect between STAT-addictive oncokinas-positive and unknown leukemia**

Disease	Cell line	SAO	IC <sub>50</sub> (nm)
AML	MV 4-11	FLT3/ITD	4.0
	MOLM13	FLT3/ITD	10.0
	HEL	JAK2 V617F	9.5
CML	KU812	BCR-ABL	0.6
	K562	BCR-ABL	21.0
B-ALL	ALL-1	BCR-ABL	2.5
	TCC-Y/sr	BCR-ABL T315I	24.7
AML	KG-1	Unknown	0.3
	U937	Unknown	3.2
	NB4	Unknown	19.0
	HL-60	Unknown	95.0
	UT-7	Unknown	95.0
B-ALL	THP-1	Unknown	> 100
	Kasumi	Unknown	> 100
	BALL-1	Unknown	> 100
T-ALL	RS4;11	Unknown	> 100
	Jurkat	Unknown	5.6
	CCRF-CEM	Unknown	70.0
	MOLT-4	Unknown	> 100

Abbreviation: SAO, STAT-addictive oncokinas.

Legend:  
 Yellow: IC<sub>50</sub> (nm) ≤ 10  
 Light Yellow: IC<sub>50</sub> (nm) > 10 to ≤ 100  
 Light Purple: IC<sub>50</sub> (nm) > 100.

表 2

**Table 3 Effect of OPB-31121 on cell lines inoculated to mice**

Disease	Cell line	Dose (mg/kg)	T/C (%)
SAO-positive leukemia	HEL	300	21.9
	KU812	100	1.8
	TCCY/sr	100	5.9
SAO-unknown leukemia	KG-1	100	0.4
	U937	300	36.4
	WIL-2-729HF2	300	6.9
Multiple myeloma	RPM18228	300	21.6
	RL	200	18.5
Lymphoma			

SAO: STAT-addictive oncokinas  
 T/C: Tumor volume of treated group/Tumor volume of control group

表 3

**Table 4 Effect of OPB-31121 on primary leukemia and normal hematopoietic cells**

Sample	Disease	SAO	Duration	Dose (mg/kg)	T/C (%)
OMR	ALL	BCR-ABL	Day 23-32	200	4
ARK	ALL	BCR-ABL	Day 18-31	300	58
KWI	ALL	BCR-ABL Y253H	Day 45-54	200	57
INH	CML-BC	BCR-ABL T315I	Day 1-29	200	87
			Day 29-38	200	15.3
MAE	AML	FLT3/ITD	Day 29-38	200	15.9
MIZ	AML	FLT3/ITD	Day 40-51	200	26.3
CB	Normal	(-)	Day 49-59	200	99.9

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 5件)

1. Hayakawa F 他6名(1番目) A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant anti-tumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinasases. **Blood Cancer Journal** 2013; 3: e166 (査読有)

2. Niimi K, Hayakawa F, 他6名(4番目) GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. **Leuk. Res. Rep.** 2013; 2: 21-25 (査読有)

3. Yasuda T, Hayakawa F, 他6名(2番目) B cell receptor-ERK1/2 signal cancels PAX5-dependent repression of BLIMP1 through PAX5 phosphorylation: a mechanism of antigen-triggering plasma cell differentiation. **J Immunol.** 2012; 188: 6127-6134 (査読有)

4. Goto E, Hayakawa F 他7名(3番目) Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. **Blood.** 2011; 118: 1600-1609. (査読有)

5. Kuwatsuka Y, Hayakawa F 他8名(5番目) The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Phpositive acute lymphoblastic leukemia cells. **Blood Cancer J.** 2011; 1: e17. (査読有)

[学会発表](計 3件)

1. (招待講演) Hayakawa F, Feasibility and safety of pediatric-type therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescences

and young adults: Interim analysis of JALSG ALL202-U. 25th Anniversary International Symposium of Japan Adult Leukemia Study Group 2012.6.24 東京都千代田区 国際フォーラム

2. Fumihiko Hayakawa, Keiki Sugimoto, Shingo Kurahashi, Takumi Sumida, Tomoki Naoe A novel STAT3 inhibitor OPB-31121 induces tumor-specific growth inhibition in a wide range of hematopoietic malignancies. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology 2011.12.11 米国 サンディエゴ

3. (招待講演) Hayakawa F, Development of growth signal inhibitors for hematopoietic malignancies. 第70回日本癌学会学術総会腫瘍別シンポジウム 2011.10.4 名古屋 白鳥国際会議場

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 悪性リンパ腫のインビトロ腫瘍細胞モデル及びその利用

発明者: 早川文彦 他4名

権利者: 名古屋大学 他4名

種類: 特許

番号: 特願 2012-137462(JP)

出願年月日: 2012年6月19日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

早川 文彦 (HAYAKAWA FUMIHIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30402580

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし