

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23659487

研究課題名（和文）

シグナル伝達・転写活性化因子を標的とした画期的抗腫瘍剤の開発

研究課題名（英文）

Development of innovative anti-tumor agents that target signal transducers and activator of transcription

研究代表者

直江 知樹 (Naoe Tomoki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50217634

研究成果の概要（和文）：

In vitro で OPB-31121 の作用機序の解明を行い、本薬剤により JAK2 のリン酸化を阻害する事無く STAT3 のリン酸化が阻害されている事を確認した。多種類の細胞株で本薬剤の薬効を調べ、本薬剤が多様な造血器悪性腫瘍に対し効果がある中でも、BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ腫瘍細胞は高率に本薬剤感受性である事を発見し、本薬剤適合癌種の選択を行った。更にこうした変異を持つ白血病の患者より採取した白血病細胞、および正常ヒト臍帯血を免疫不全マウスに移植したマウスモデルを作成し、これに対し OPB-31121 を投与し著明な腫瘍退縮効果 (T/C: 4~58%) と正常造血細胞への安全性 (T/C:99%) を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that a novel STAT inhibitor, OPB-31121, strongly inhibited STAT3 and STAT5 phosphorylation without upstream kinase inhibition, and induced significant growth inhibition in various hematopoietic malignant cells. Investigation among various cell lines indicated that OPB-31121 is particularly effective on leukemia cells harboring BCR-ABL, FLT3/ITD and JAK2 V617F, oncogenic kinases depended their oncogenicities on STAT3/5. Using immunodeficient mice transplantation system, we also showed the significant anti-tumor effect of OPB-31121 on primary human leukemia cells harboring those aberrant kinases and the safety on normal human cord blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：シグナル伝達、STAT3、STAT5、FLT3

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、FLT3 キナーゼ変異が急性骨髄性白血病の約 30%に見いだされ、活性化変異であると同時に予後不良マーカーであること、変異 FLT3 は恒常的に活性化し野生型 FLT3 では認められない STAT5 活性化を引き起こすこと、変異 FLT3 は増殖・生存に関わる恒常的なシグナルを伝達し、白血病の発症・進展に関わることを報告してきた。現在は我々が開発に関わった薬剤も含め、多くの FLT3 阻害剤の臨床開発が進行中である。しかしこれまでの FLT3 阻害剤の第 I/II 相試験では、その臨床効果は限局的である。我々は FLT3 リン酸化の不十分な抑制や下流シグナル STAT5 のへのバイパスシグナルが FLT3 阻害剤抵抗性の一つの原因であり、STAT5 が有望な標的であることを想定し研究を進めてきた。

一方、国内メーカーでは肝の線維化抑制剤をスクリーニングする過程で STAT3 あるいは STAT5 のリン酸化を強力に阻害する新規化合物を見いだしている。申請者らは、これらの化合物はナノモルレベルで腫瘍細胞の増殖抑制と STAT リン酸化の抑制を示すが、in vivo および in vitro ともチロシンキナーゼ阻害を全く示さないことを確認した。

海外では STAT のリン酸化酵素である JAK2 の阻害剤が多数臨床開発されている。しかし STAT を直接の標的とした阻害剤の臨床開発は少ない。STAT3 アンチセンスやデコイ、二量体化を阻害する化合物も報告され始めているが、医薬品としての開発としては困難であろうと予想されている。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ本研究で我々は以下の事を目的とする。(1) STAT 阻害剤 OPB-31121

の STAT3/5 阻害作用の分子メカニズムを解明する。(2) 細胞株およびプライマリー白血病細胞で本剤の有効性を検討し、ヒト腫瘍に対する有効性の Proof-of-Concept (POC) の確立と適合癌種の同定を行う。(3) 阻害剤感受性に関するバイオマーカーを同定する。(4) STAT 阻害の腫瘍免疫への影響について研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌細胞株 Hep G2 の細胞溶解液より抗 STAT3 抗体で免疫沈降してきた STAT3 タンパクを基質、リコンビナントな JAK2 を酵素とするインビトロキナーゼ反応を行い、その反応に対する OPB-31121 の阻害活性を検討した。リン酸化の検出は抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットで行った。

(2) JAK2 に恒常的活性化変異の入っている細胞株 HEL に対し OPB-31121 を添加し、経時的に細胞溶解液を抽出し、抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットにより JAK2、STAT3 のリン酸化を調べた。

(3) 35 種類の造血器悪性腫瘍細胞株に対する OPB-31121 の増殖阻害活性を調べ、本薬剤の適合癌種を検討した。細胞増殖は MTT 法で測定した。

(4) 白血病患者より採取した白血病細胞 (倫理委員会により承認された研究計画のもと同意を得た患者より採取) および正常ヒト臍帯血 (RIKEN 研究用幹細胞バンクより入手) を NOG マウスに移植したマウスモデルを作成した。これに対し OPB-31121 を 10 日間連続経口投与した後マウスを解剖し、骨髄、脾臓細胞を採取した。これらにおけるヒト細胞の割合をフローサイトメーターで調べることで本薬剤のヒト白血病細胞および正常造血細胞に対する増殖抑制効果を調べた。

4. 研究成果

(1) インビトロキナーゼ反応において OPB-31121 を添加しても JAK2 による STAT3 のリン酸化反応は阻害されなかった。しかし、Hep G2 細胞を OPB-31121 添加のもと培養した後抽出した細胞溶解液から免疫沈降された STAT3 を基質として用いると JAK2 によるインビトロでのリン酸化反応が減弱した。いずれの実験においても JAK2 のリン酸化は阻害されなかった。これらのことは OPB-31121 が STAT3 に間接的に作用し JAK2 を阻害する事なく STAT3 リン酸化を阻害することを示唆している。

(2) HEL 細胞で OPB-31121 添加後の経時的な STAT3 のリン酸化を観察すると、STAT3 リン酸化の減弱は OPB-31121 添加後 30 分の時点で始まっており、この時点で JAK2 のリン酸化は減弱していなかった。このことは細胞内でも JAK2 など STAT3 上流のキナーゼのリン酸化を阻害する事無く STAT3 リン酸化が阻害されている事を示している。これらのことから OPB-31121 の作用は JAK2 等 STAT 上流のキナーゼの阻害ではなく、STAT3 に対する作用であると考えられた。

(3) 35 種類の造血器悪性腫瘍細胞株に対する OPB-31121 の IC₅₀ を算出し比較した所、FLT3/ITD、BCR-ABL、JAK2V617F 変異を持つ白血病細胞株では 7 株中 7 株が IC₅₀ 30 nM 以下なのに対して、こうした変異を持たない白血病細胞株では 12 株中 4 株しか同程度の感受性を示さなかった。これらのキナーゼ変異はその下流で STAT3/5 を恒常的に活性化し、その活性化が白血病細胞増殖に重要であることが確立されている変異で、こうした変異を持つ白血病が本薬剤の適応癌種となる可能性が示唆された。

Ph+ALL (BCR-ABL 陽性) 3 例、CML-BC (BCR-ABL

陽性) 1 例、FLT3/ITD 陽性 AML 1 例の患者検体を移植したマウスモデルを作成した。これらに対し本薬剤は著明な腫瘍退縮効果 (T/C: 4~58%) を示した。一方、ヒト正常造血細胞を移植したマウスにおいては、本薬剤を投与してもヒト細胞の増殖には抑制効果が認められなかった。こうしたことから本薬剤はヒトプライマリ白血病に対しても腫瘍抑制効果があり、一方で正常造血細胞の増殖に与える影響は少ないと考えられた。こうした差異の原因としては STAT を活性化しそれに依存して異常増殖する白血病細胞と、正常細胞の間には STAT 活性化の要求性の強さに差があることが考えられた。

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 10 件)

1. Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B Cell Receptor-ERK1/2 Signal Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1 through PAX5 Phosphorylation: A Mechanism of Antigen-Trigging Plasma Cell Differentiation. *J Immunol.* 2012; 188:6127-6134. 査読有
2. Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, Naoe T. CML cells expressing the TEL/MDS1/EVI1 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737. *Exp Hematol.* 2012;40: 724-737. 査読有
3. Mizuno H, Nakayama T, Miyata Y, Saito S, Nishiwaki S, Nakao N, Takeshita K, Naoe T. Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib. *Leukemia.* 2012;26:2269-2276. 査読有
4. Tokunaga T, Shimada K, Yamamoto K, Chihara D, Ichihashi T, Oshima R, Tanimoto M, Iwasaki T, Isoda A, Sakai A, Kobayashi H, Kitamura K, Matsue

- K, Taniwaki M, Tamashima S, Saburi Y, Masunari T, Naoe T, Nakamura S, Kinoshita T. Retrospective analysis of prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a multicenter cooperative study in Japan. *Blood*. 2012;119:2837-2843. 査読有
5. Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood*. 2011;118:1600-1609. 査読有
 6. Kuwatsuka Y, Minami M, Minami Y, Sugimoto K, Hayakawa F, Miyata Y, Abe A, Goff DJ, Kiyoi H, Naoe T. The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Cancer J*. 2011 May;1(5):e17. 査読有
 7. Sakai K, Ishikawa Y, Mori Y, Kobayashi M, Iriyama C, Ozawa Y, Suzuki T, Minami Y, Ishikawa K, Kaneda N, Naoe T, Kiyoi H. A novel insertion mutation of K294RGG within BCR-ABL kinase domain confers imatinib resistance: sequential analysis of the clonal evolution in a patient with chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Int J Hematol*. 2011;93:237-242. 査読有
 8. Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T. PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*. 2011;30:1822-1830. 査読有
 9. Minami Y, Kajiguchi T, Abe A, Ohno T, Kiyoi H, Naoe T. Expanded distribution of the T315I mutation among hematopoietic stem cells and progenitors in a chronic myeloid leukemia patient during imatinib treatment. *Int J Hematol*. 2010;92:664-666. 査読有
 10. Tsujimura A, Kiyoi H, Shiotsu Y, Ishikawa Y, Mori Y, Ishida H, Toki T, Ito E, Naoe T. Selective KIT inhibitor KI-328 and HSP90 inhibitor show different potency against the type of KIT mutations recurrently identified in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2010;92:624-633. 査読有
- [学会発表] (計 4 件)
1. Yosuke Minami, Yosuke Niwa, Akihiro Abe, Fumihiko Hayakawa, and Tomoki Naoe. Wnt Signaling Is Associated with Anti-Apoptosis in the Interaction Between Acute Myeloid Leukemia Cells and Stromal Cells. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.8. Atlanta (USA).
 2. Keiki Sugimoto, Fumihiko Hayakawa, Takahiko Yasuda, and Tomoki Naoe. Drug Development Targeting Microenvironment for Malignant Lymphoma ASH Annual Meeting Abstracts 2012 120:1661. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. 2012.12.8. Atlanta (USA)..
 3. Hayakawa F, Sugimoto K, Kurahashi S, Sumida T, Naoe T. A Novel STAT3 Inhibitor OPB-31121 Induces Tumor-Specific Growth Inhibition in a Wide Range of Hematopoietic Malignancies without Growth Suppression of Normal Hematopoietic Cells. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.10. San Diego, USA.
 4. Minami Y, Abe A, Minami M, Kuwatsuka Y, Fukushima N, Kitamura K, Hiraga J, Yamamoto K, Jamieson C, Naoe T. Retention of Slow-Cycling CD34+ cells During Imatinib Treatment and Rapid Decline After 2nd ABL-TKI Treatment in Ph+ Leukemia Cells. The American Society of Hematology 53th Annual Meeting. 2011.12.10. San Diego, USA.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
直江 知樹 (Naoe Tomoki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50217634
 - (2) 研究分担者なし
 - (3) 連携研究者なし