

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07972

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングに立脚した原発性骨髄線維症の腫瘍性クローン選択的排除法

研究課題名(英文) Selective elimination of tumor clones of primary myelofibrosis based on drug repositioning

研究代表者

後藤 明彦 (Gotoh, Akihiko)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00297293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：原発性骨髄線維症(PMF)の主要なドライバー変異であるcalreticulin(CALR)の変異遺伝子をthrombopoietin(TPO)依存性細胞株に導入し、安定的変異遺伝子導入株を得た。変異遺伝子導入株はTPO非依存性の増殖能を獲得しており、PMFの腫瘍性性格を反映していると考えられた。クラリスロマイシン(CAM)は単独ではCALR変異導入細胞に対する抑制効果を示さないが、ルキソリチニブ(RUX)との併用によりRUXの細胞増殖抑制作用を増強した。安全性の確立したマクロライドのドラッグ・リポジショニングによるRUXとの併用はRUXの臨床効果を高めるのに有望な選択と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性骨髄線維症(PMF)は予後不良な難治性造血器腫瘍である。JAK2 阻害薬ルキソリチニブはPMFに対して脾腫縮小、全身症状改善などの高い臨床効果を示すが腫瘍クローン減少効果は低い。本研究では安全性が確立しているマクロライドのオートファジー阻害活性に注目し、ルキソリチニブとの併用により相乗的にPMFのモデル細胞が抑制されることを示した。この結果はマクロライドのドラッグ・リポジショニングにより、PMFに対して安全性と医療経済効果の両立した分子標的療法を確立する可能性を期待させるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A mutant gene of calreticulin (CALR), which is a major driver mutation for primary myelofibrosis (PMF), was introduced into thrombopoietin (TPO) -dependent cell lines to obtain stable mutant transgenic lines. The mutant transgenic strain acquired TPO-independent growth ability and was considered to reflect the neoplastic character of PMF. Although clarithromycin (CAM) alone does not show a suppressive effect on CALR-mutated cells, the combination with ruxolitinib (RUX) enhanced the cytostatic action of RUX. The combination with RUX by drug repositioning of the macrolides with established safety was considered as a promising option to enhance the clinical effect of RUX.

研究分野：血液内科学

キーワード：primary myelofibrosis ruxolitinib macrolide thrombopoietin calreticulin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原発性骨髄線維症 (PMF) は造血幹細胞の腫瘍性変化に伴い、骨髄内の公汎な線維化を生じ、髄外造血による巨大な脾腫とこれらに伴う多彩な臨床症状 (貧血、出血傾向、食欲不振、腹部膨満感、腹痛、活動性・集中力低下、うつ状態、骨痛、頭痛、性機能障害、掻痒感、体重減少、発熱、盗汗) を呈するため生活の質が著しく損なわれる。また、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の中でも PMF は他の MPN より明らかに予後不良であり 50% 生存は 4~6 年程度である。主な死因は白血病への進展と血栓症、骨髄抑制による感染症や出血である。造血幹細胞移植を除けば完治を望める治療法はないが、発症年齢中央値は高く、若年で同胞がある患者でも治療関連死のリスクが比較的高い難治性造血器腫瘍である。このため従来、対症的治療としてハイドロキシウレアによる血球や脾腫のコントロール、あるいは輸血、輸血による鉄過剰に対する除鉄療法などの支持療法が行われてきた。

PMF のドライバー変異として *JAK2V617F* の点突然変異がおよそ半数の症例に、thrombopoietin (TPO) 受容体 *MPL* 遺伝子の変異が 5% ほど認められるが、残りは不明であった。2013 年に *JAK2*、*MPL* の異常のない PMF のおよそ半分に *calreticulin (CALR)* の遺伝子異常が認められることが報告された。*CALR* はマルチファンクショナルな蛋白で構造上 N 末の  $Zn^{2+}$  結合部位を有する N ドメインはシャペロン機能を示し、C 末の C ドメインは acidic aminoacids で ER retention signal (KDEL) や  $Ca^{2+}$  バッファリング機能を有する。N ドメインと C ドメインに挟まれた P ドメインはプロリンリッチでシャペロン-レクチン様機能や高親和性  $Ca^{2+}$  結合性、ERp57 との結合部位などを有する。MPN における *CALR* 変異は C ドメイン内に主に生じ、数塩基の欠失 (type 1) もしくは挿入 (type 2) によりフレームシフトが起こるために acidic な性質を失い、KDEL を欠失している。この変異により Stat5 が恒常的に活性化され、造血因子非依存性を獲得するという報告はあるが、*CALR* 変異による腫瘍化の詳細なメカニズムは不明であった。

近年 *JAK2* 阻害薬であるルキソリチニブが日本でも認可され、脾腫縮小、全身症状の改善が *JAK2* 遺伝子の変異のない症例でもみられ、高い有用性が示されている。しかし、*JAK2V617F* のクローン減少は 3 年で 20% 程度と低く、さらに *CALR* の異常を持つ群でのクローン減少効果は明らかにされていない。したがって、臨床では極めて有用な薬剤であるが、BCR-ABL 陽性慢性骨髄性白血病 (CML) におけるイマチニブをはじめとする ABL チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) のような劇的なクローン減少は望めず、現状では有効な症例では継続的な服用が必要である。

CML の治療では TKI 中断によりおよそ半数で再発が起こるため、若年者特に拳児希望者における持続服用のデメリットや高額な医療費による患者および社会の負担の増大が問題になっている。ABL TKI に劣らずルキソリチニブも高額であり、上記のようにクローン減少効果が低いことから有効症例で中止できる可能性は極めて低く、将来 ABL TKI のように患者および社会の負担が無視できなくなることが危惧される。ルキソリチニブの高い臨床作用を考慮すると、何らかの薬剤との併用により、クローン減少効果を高めることは治療効果増強のみならず、治療期間を短縮することも期待される。その併用薬は安全性が確立され経済的にも負担にならないもの、すなわちドラッグ・リポジショニングで開発できれば上記目的には理想的といえる。

我々は以前より多発性骨髄腫などの難治性悪性腫瘍を対象に細胞内蛋白分解系のコントロールをターゲットとした新規分子標的療法の立案を目指して研究を進めてきた。粗面小胞体で合成されたペプチドは「正常な折りたたみ (folding)」によりタンパク質本来の機能を発現するが、小胞体内で正常な立体構造として折りたたまれないタンパク質 (unfolded protein) が過度に蓄積された状態を「ER ストレス」と呼ぶ。細胞の処理能力を超える ER ストレスに曝されるとア

ポトースが誘導され細胞は死滅する。これまで、多発性骨髄腫、肺癌、膵癌、転移性乳癌を中心とする難治性腫瘍を対象に、細胞内のタンパク質分解機構であるユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系、およびアグリソーム形成における細胞内の綿密な“ネットワーク”の存在に着目し、これを計画的かつ効率的に遮断することにより、ER ストレス負荷による細胞死を誘導する全く新たな治療概念に基づく治療法を開発することを目的として下記のような成果をあげてきた。プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブとオートファジー阻害剤 bafilomycin A1 とを併用すると、骨髄腫細胞において ER ストレス負荷を介したアポトーシスが相乗的に誘導される。(Kawaguchi T et al, Int J Oncol. 2011.) 14 員環マクロライド系抗生剤クラリスロマイシン(CAM)はオートファジー阻害活性を有することを発見し、ボルテゾミブとの併用により乳癌、骨髄腫細胞において細胞質内にアグリソームが蓄積し、ER ストレスを介したアポトーシスが強力に誘導される。(Komatsu S et al. Int J Oncol. 2012, Moriya S. Int J Oncol. 2013.)

これらの研究はプロテアソームとオートファジーを同時に遮断し、ER ストレス負荷による細胞死を誘導するという概念を立証したといえる。近年、がん幹細胞においても細胞内 ER ストレスが恒常的に亢進していることが明らかにされつつあり、PMF の腫瘍性幹細胞も同様な状態にあることが推測される。特に正常の CALR は ER における folding の過程に参与していることが知られており、ルキソリチニブの優れた臨床効果を維持しつつ、PMF のクローンに対する抗腫瘍効果を高める併用薬剤の有力な候補として CAM のドラッグ・リポジショニングに着目した。

## 2 . 研究の目的

安全性が確立している 14 員環マクロライド系抗生剤のオートファジー阻害活性に注目し、ルキソリチニブとの併用により効果的に PMF の腫瘍クローン排除が可能であることを立証し、臨床応用への道を開きドラッグ・リポジショニングによる安全性と医療経済効果の両立した分子標的療法を立案する。

## 3 . 研究の方法

UT-7 はヒトの急性巨核芽球性白血病患者より樹立された造血因子依存性細胞株で、EPO あるいは thrombopoietin (TPO) にのみ増殖依存性を示す UT-7/EPO、UT-7/TPO などの亜株も樹立され、国内外の様々な研究施設において広く研究に用いられている。

(1) PMF の病態の核となるのは巨核球であるため、TPO 依存性かつ巨核球様に分化する UT-7/TPO をモデル細胞として用いて CALR の欠失型変異(type 1)、挿入型変異(type 2)を導入した細胞株を樹立する。

(2) 得られた安定的変異遺伝子導入株において、造血因子の存在の有無、ER ストレス誘導剤(ツニカマイシン、タブシガルギン)添加の有無による細胞増殖を Cell Titer Blue assay で、アポトーシスを Annexin V/PI 二重染色によるフローサイトメトリーで、オートファジーを抗 LC3 抗体、抗 p62 抗体を用いたウェスタン・ブロッティングで評価する。

(3) 変異遺伝子導入株におけるルキソリチニブと CAM の単独および併用による細胞増殖、アポトーシス、オートファジーに対する効果を上記手法で解析し、細胞内タンパクのチロシンリン酸化状態を抗チロシンリン酸化抗体によるウェスタン・ブロッティングで解析する。

#### 4 . 研究成果

まずトロンボポエチン(TPO)依存性細胞株 UT7/TPO に *CALR* の欠失型変異と挿入型変異を各々2種類、安定的に導入した細胞株 UT7/TPO *CALR* De114-3、UT7/TPO *CALR* De123-5 および UT7/TPO *CALR* ins7-1、UT7/TPO *CALR* ins7-8 の計 4 種類の細胞株を確立した。変異遺伝子導入株は TPO 非依存性の増殖能を獲得しており、PMF の腫瘍性性格を反映していると考えられた。

ルキソリチニブ添加による細胞増殖抑制作用は *CALR* 変異導入株で強く観察されたが、*CALR* 挿入型変異導入クローンのうち 1 種はルキソリチニブに高い耐性を示した。CAM は単剤では *CALR* 変異導入細胞に対して細胞増殖抑制効果を示さなかったが、ルキソリチニブとの併用によりルキソリチニブの細胞増殖抑制作用を増強した。細胞内タンパクのチロシンリン酸化状態を検討するとルキソリチニブ添加によりチロシンリン酸化は効果的に抑制されたが、CAM 単独でのチロシンリン酸化抑制は認めなかった。ルキソリチニブと CAM の併用でもルキソリチニブ単独と細胞内タンパクのチロシンリン酸化レベルに著変はなく、CAM のルキソリチニブによる細胞増殖抑制効果増強効果は JAK2 のチロシンキナーゼの恒常的活性化とは関係ないことが示された。また、ルキソリチニブ抵抗性を示したクローンではルキソリチニブによるチロシンリン酸化抑制が認められず、ルキソリチニブ耐性機序の一つとして記憶すべきであると考えられた。

無血清の条件下で LC3-II の動態を詳細に観察すると *CALR* 変異導入細胞では無血清下 4 時間まで LC3-II が経時的に増加するのが観察され、オートファジーが経時的に誘導されるのが示された。オートファジーを阻害する CAM はここをターゲットとしてルキソリチニブの作用を増強している可能性があり、安全性の確立したマクロライドのドラッグ・リポジショニングによるルキソリチニブとの併用はルキソリチニブの臨床効果を高めるのに有望な選択と考えられた。

親株である UT-7/TPO を一晚 TPO 無しで培養し、様々な条件(10% FCS+TPO を含む完全培地、FCS を 1%まで減らし、TPO を加えた場合と抜いた場合等)で p62 や LC3 の発現を検討した。TPO が存在するとオートファジーは誘導されず、血清と TPO ともない状態ではオートファジーが経時的に誘導されることを確認した。一方、*CALR* 変異導入細胞では上述のように無血清培養開始後 4 時間まで経時的にオートファゴゾーム形成が促進されるが、無血清培養 8 時間ではベクターコントロールと比較してオートファゴゾーム形成が一時的に抑制されることも認められた。この結果からは、*CALR* 変異はオートファゴゾーム形成に抑制的に働くことで、骨髄増殖性腫瘍細胞の増殖優位性獲得に寄与している可能性も示唆され、今後の新規治療ターゲットの開発上、重要な意義を持つと考えられた。

最後に *CALR* の野生型、欠損型変異、挿入型変異に GFP 遺伝子を結合したウイルス・ベクターを UT-7/TPO に導入し、変異 *CALR* を発現すると GFP の蛍光で確認できる細胞株を作成した。これらの細胞株は予想通り TPO に非依存的に増殖し、TPO 非存在下でもオートファジーが誘導されないことを確認した。これらの新たに確立したモデル細胞を用いて、ルキソリチニブと CAM の効果を再検討したところ、CAM 単独では欠損型変異、挿入型変異いずれに対しても有意な細胞増殖抑制効果を示さなかったが、ルキソリチニブによって誘導されるオートファジーを有意に増強し細胞増殖抑制効果を高めることが再確認できた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計7件)

Fukuda Yasutaka, Araki Marito, Yamamoto Kouji, Morishita Soji, Inano Tadaaki, Misawa Kyohei, Ochiai Tomonori, Eda Hiro Yoko, Imai Misa, Yasuda Hajime, Gotoh Akihiko, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio: Evidence for prevention of renal dysfunction associated with primary myelofibrosis by cytoreductive therapy. Haematologica (2019) 査読有 印刷中 DOI: 10.3324/haematol.2018.208876

Misawa Kyohei, Yasuda Hajime, Araki Marito, Ochiai Tomonori, Morishita Soji, Shirane Shuichi, Eda Hiro Yoko, Gotoh Akihiko, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio. Int J Hematol (2018) 査読有 107: 673-680 DOI: 10.1111/bjh.15266

後藤明彦. 骨髄増殖性腫瘍(MPN)の分子病態と診断・治療の up-to-date Ph 陰性 MPN の予後・予後予測因子 (2017) 査読無 最新医学 72: 1565-1571

[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ap7saisa/2017/007211/011&name=1565-1571j&UserID=202.21.163.142&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ap7saisa/2017/007211/011&name=1565-1571j&UserID=202.21.163.142&base=jamas_pdf)

Moriya S, Komatsu S, Yamasaki K, Kawai Y, Kokuba H, Hirota A, Che XF, Inazu M, Gotoh A, Hiramoto M, Miyazawa K. Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress mediated cell death in multiple myeloma cells. Int J Oncol (2015) 査読有 46: 474-86 DOI: 10.1007/s12185-018-2421-7

### 〔学会発表〕(計9件)

Eda Hiro Y, Mano S, Takei H, Li L, Morishita S, Gotoh A, Tsuneta S, Osaka A, Araki M, Komatsu N. Copy number of JAK2V617 modulates human hematopoietic cell differentiation. (2018) 8th International Conference on Myeloproliferative Neoplasms

Fukuda Y, Araki M, Imamoto K, Morishita S, Inano T, Misawa K, Ochiai T, Eda Hiro Y, Imai M, Gotoh A, Osaka A, Komatsu N. Cytoreductive therapy prevents worsening of renal function in patients with primary myelofibrosis. (2018) 第80回日本血液学会学術集会

Eda Hiro Y, Gotoh A, Ando J, Tsutsui M, Morishita S, Osaka A, Komatsu N. Interferon therapy for pregnant patients with myeloproliferative neoplasms. (2018) 第80回日本血液学会学術集会

### 〔図書〕(計1件)

後藤明彦 骨髄線維症 小松則夫編 第3章 骨髄線維症の診断と予後 1.診断 医薬ジャーナル社 (2016) 187 ページ中 8 ページ

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：小松 則夫

ローマ字氏名：KOMATSU, Norio

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50186798

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：宮澤 啓介

ローマ字氏名：MIYAZAWA, Keisuke

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50209897

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：荒木 真里人

ローマ字氏名：ARAKI, Marito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。