

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09476

研究課題名(和文) WT1遺伝子の癌遺伝子機能の新展開：白血病細胞の代謝シフトとゲノム安定性の維持

研究課題名(英文) A novel oncogenic function of Wilms tumor gene WT1 in leukemia

研究代表者

尾路 祐介(Oji, Yusuke)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20294100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：白血病および様々な固形癌に過剰発現するWT1遺伝子が腫瘍細胞の代謝酵素と結合し、これらの酵素の活性を増強すること、さらにこの相互作用を標的とした低分子化合物が効率よく白血病細胞に細胞死を誘導することを明らかにした。これらの結果は、白血病細胞においてWT1タンパクと代謝酵素の相互作用が分子標的となることを示し、新たな分子標的治療法の開発につながる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed that 1) WT1 protein, which is overexpressed in leukemia and various types of solid cancers, associated with metabolic enzymes in leukemia cells and 2) a small molecule targeting this association efficiently induced cell death in WT1-expressing leukemia cells. These results indicate that the association between WT1 protein and metabolic enzymes could be a novel target of molecule-targeted cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：WT1 leukemia

## 1. 研究開始当初の背景

ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1 遺伝子) は小児腎腫瘍ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として単離された遺伝子で従来癌抑制遺伝子と考えられてきた。WT1 遺伝子は zinc finger モチーフを持ち、DNA と強く結合すると考えられる WT1 (KTS-) isoform は様々な遺伝子の転写を調節する転写因子として研究がなされてきた。さらに WT1 は RNA 結合領域をもつとともに複数の領域で様々なタンパクと相互作用しうることがこれまでに報告されている。

我々は野生型 WT1 遺伝子がほとんどすべての白血病において過剰発現し、鋭敏で特異的な白血病の腫瘍マーカーとなることを明らかにして以来、(1) 変異のない野生型 WT1 遺伝子が白血病以外にも肺癌、大腸癌、膵癌などの様々な固形癌において高い頻度で過剰発現していること、(2) WT1 遺伝子の発現抑制は WT1 を発現する白血病細胞や固形癌細胞の増殖抑制やアポトーシスを誘導し、WT1 遺伝子の強制発現は正常骨髄前駆細胞の好中球への分化を抑制する、(3) WT A および WT B isoform は Bcl2 family 遺伝子の発現を制御し、白血病細胞および固形癌細胞のミトコンドリア膜電位の安定化により抗がん剤誘導性のアポトーシスを抑制する、(4) WT1 の 4 種の isoform のうち WTC isoform (17AA-KTS+: これまで機能が明確ではなかった) が XRCC2, Rad51D, および Rad54 の発現を上昇させて DNA の二重鎖切断の主たる修復経路である homologous recombination (HR) を促進し、抗癌剤抵抗性を誘導する、を明らかにし、WT1 遺伝子が癌抑制遺伝子というよりはむしろ癌遺伝子として機能していることを明らかにした。さらに細胞膜透過配列を付加した WT1 ペプチドライブラリーから、白血病細胞 K562 に導入し効率よく細胞死を誘導するふたつの WT1 ペプチドを同定した。

さらにこれらの WT1 ペプチドが直接結合しうるタンパクを探索し、エネルギー代謝経路のふたつの酵素を同定した。

これらの結果は、WT1 遺伝子のそれぞれの isoform が標的遺伝子の転写調節や標的分子との直接結合によりゲノム安定性の維持、細胞骨格の制御、さらには細胞の代謝シフトに関与し、細胞死抵抗性 (臨床的には放射線、化学療法抵抗性) や浸潤能・運動能の増強 (臨床的には腫瘍の増大、転移) などの形質変化を腫瘍細胞に誘導し腫瘍の悪性化において重要な役割を果たしていることを示す。さらに重要なことは WT1 タンパクが標的分子 (例えばエネルギー代謝に関わる酵素) との直接相互作用により標的分子の機能を調節しうること、さらにはその相互作用を阻害することにより腫瘍細胞に細胞死を誘導しうることである。これは WT1 と腫瘍細胞の生存に重要な役割を果たす分子との相互作用が白血病や固形癌の分子標的治療のターゲットになりうることを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では白血病細胞の代謝シフトおよびゲノム安定性の維持における WT1 遺伝子の機能の分子機序を明確にすること、および白血病細胞の増殖・生存において重要な役割を果たす WT1 と binding partner 分子との相互作用を標的とした分子標的治療法を開発することを研究目的とする。特に WT1 タンパクが直接結合しうる代謝酵素やゲノム代謝関連因子を同定すること、さらにこれらの binding partner との相互作用を阻害する分子を同定することを目的にした。

## 3. 研究の方法

まず、WT1 の部分ペプチドが結合しうることをこれまでに見出した代謝酵素タンパク A お

よびタンパク B と WT1 タンパクが細胞内で結合してタンパク複合体を形成するかを免疫沈降法により明らかにした。さらに WT1 の結合が、これらの代謝酵素 A および B の活性に及ぼす影響をはじめに WT1 タンパクを強制発現させた細胞のライゼートを用いて、さらに発現精製したタンパクを用いて解析した。最後に WT1 ペプチドとこれらの代謝酵素の阻害物質の探索のために ELISA 系を構築し、低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。

#### 4. 研究成果

本研究ではまず、WT1 の部分ペプチドが結合しうることをこれまでに見出したタンパク A およびタンパク B と WT1 タンパクが細胞内で結合してタンパク複合体を形成するか検討した。WT1 を高発現する白血病細胞 K562 において免疫沈降を行った結果、WT1 タンパクがこれらの代謝酵素タンパク A およびタンパク B とタンパク複合体を形成することを明らかにした。(図 1)

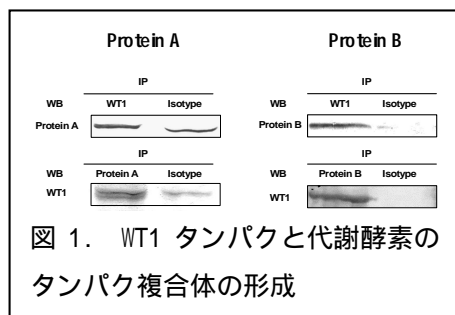


図 1. WT1 タンパクと代謝酵素のタンパク複合体の形成

次に WT1 とのタンパク複合体の形成がこれらのふたつの代謝酵素 A および B の酵素活性に影響を与えるのか検討した。まず WT1 を内在性に発現しない細胞株に WT1 を発現させた細胞とコントロール空ベクターを発現させた細胞のライゼートを用いて、代謝酵素 A および B の酵素活性を比較した。その結果二つの代謝酵素 A および B のいずれも WT1 を発現させた細胞に比較して酵素活性が増強していた。さらにこれらの代謝酵素と結合する

WT1 ペプチドをこれらのライゼートに加えたところこれらの代謝酵素の活性は阻害された。そこで、発現精製した WT1 タンパクを代謝酵素 A および B の溶液に直接添加したところ、いずれの酵素活性も増強した。これらの結果は WT1 タンパクが代謝酵素 A および B に直接結合して、これらの酵素活性を増強することを示している。さらに、代謝酵素 A および B の WT1 が結合することによって増強した酵素活性を、WT1 ペプチドが結合阻害を介した酵素活性の阻害をもたらすことで細胞死を誘導する可能性が示した。これらの結果は、WT1 と代謝酵素 A および B の相互作用が白血病細胞の分子標的になりうることを示している。

そこでこれらの相互作用を標的とする白血病の分子標的治療薬の開発を目指し、低分子化合物の探索を行うことにした。約 6000 種の低分子化合物を用いて、WT1 ペプチドとタンパク A および WT1 ペプチドとタンパク B の相互作用を ELISA により解析したところ、WT1 ペプチドとタンパク A の結合を阻害する化合物として約 20 種類の化合物がヒットした。WT1 ペプチドとタンパク B の結合阻害についてはヒット化合物が得られなかった。これらのヒット化合物のうち、最も阻害効率の高かった化合物 A の WT1 を発現する白血病細胞に対する増殖抑制効果を解析した。その結果、化合物 A は IC50 0.64  $\mu$ M で白血病細胞の増殖を抑制した。これに対してコントロールとして用いた WT1 を発現しない白血病細胞に対する化合物 A の増殖抑制効果は IC50 >20  $\mu$ M であった。(図 2) これらの結果は化合物 A が WT1 の発現特異的に細胞増殖を抑制する可能性を示しており、この化合物 A が WT1 を標的とする白血病の分子標的治療法のリード化合物になる可能性がある。

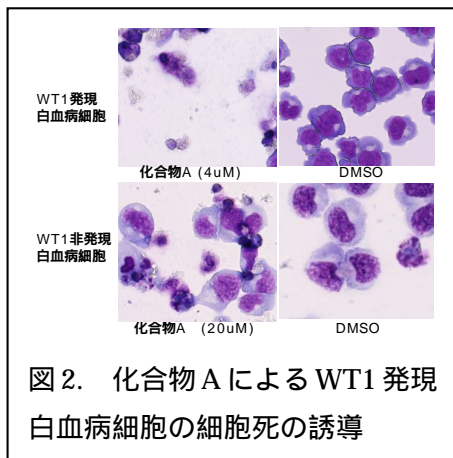


図2. 化合物AによるWT1発現白血病細胞の細胞死の誘導

### 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)

1. Oji Y, Inoue M, Takeda Y, Hosen N, Shintani Y, Kawakami M, Harada T, Murakami Y, Iwai M, Fukuda M, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Shirakata T, Nakajima H, Hasegawa K, Kida H, Kijima T, Morimoto S, Fujiki F, Tsuboi A, Morii E, Morita S, Sakamoto J, Kumanogoh A, Oka Y, Okumura M, Sugiyama H. WT1 peptide-based immunotherapy for advanced thymic epithelial malignancies. *Int J Cancer*. 142: 2375-2382, 2018
2. Anguille S, Van de Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, Nijs G, Stein B, Lion E, Van Driessche A, Vandenbosch I, Verlinden A, Gadisseur AP, Schroyens WA, Muylle L, Vermeulen K, Maes MB, Deiteren K, Malfait R, Gostick E, Lammens M, Couttenye MM, Jorens P, Goossens H, Price DA, Ladell K, Oka Y, Fujiki F, Oji Y, Sugiyama H, Berneman ZN. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood*. 130: 1713-1721, 2017.
3. Nakata J, Nakae Y, Kawakami M, Morimoto S, Motooka D, Hosen N, Fujiki F, Nakajima H, Hasegawa K, Nishida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Wilms tumour 1 peptide vaccine as a cure-oriented post-chemotherapy strategy for patients with acute myeloid leukaemia at high risk of relapse. *Br J Haematol.*, in press. 2017.
4. Takashima S, Oka Y, Fujiki F, Morimoto S, Nakajima H, Nakae Y, Nakata J, Nishida S, Hosen N, Tatsumi N, Mizuguchi K, Hashimoto N, Oji Y, Tsuboi A, Kumanogoh A, Sugiyama H. Syndecan-4 as a biomarker to predict clinical outcome for glioblastoma multiforme treated with WT1 peptide vaccine. *Future Sci OA.*, 2: FS096, 2016.
5. Oji Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Murakami Y, Iwai M, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Eliseeva O, Ichinohasama R, Sakamoto J, Morita S, Nakajima H, Takashima S, Nakae Y, Nakata J, Kawakami M, Nishida S, Hosen N, Fujiki F, Morimoto S, Adachi N, Iwamoto M, Oka Y, Yoshimine T, Sugiyama H. Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. *Int J Cancer*, 139: 1391-401, 2016.

6. Hojo N, Tatsumi N, Moriguchi N, Matsumura A, Morimoto S, Nakata J, Fujiki F, Nishida S, Nakajima H, Tsuboi A, Oka Y, Hosen N, Hayashi S, Sugiyama H, Oji Y. A Zbtb7a proto-oncogene as a novel target for miR-125a. Mol Carcinog, 55: 2001-2009, 2016.
7. Takashima S, Oka Y, Fujiki F, Morimoto S, Nakajima H, Nakae Y, Nakata J, Nishida S, Hosen N, Tatsumi N, Mizuguchi K, Hashimoto N, Oji Y. Tsuboi A, Kumanogoh A, Sugiyama H. Syndecan-4 as a biomarker to predict clinical outcome for glioblastoma multiforme treated with WT1 peptide vaccine. Future Sci OA., 2: FS096, 2016.
8. Hasegawa K, Tanaka S, Fujiki F, Morimoto S, Nakano K, Kinoshita H, Okumura A, Fujioka Y, Urakawa R, Nakajima H, Tatsumi N, Nakata J, Takashima S, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Oji Y. Miyoshi E, Hirata T, Kumanogoh A, Sugiyama H, Hosen N. Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytolysis. PLoS One, 11:e0152326, 2016.
9. Kondo K, Fujiki F, Nakajima H, Yatsukawa E, Morimoto S, Tatsumi N, Nishida S, Nakata J, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Oji Y. Sugiyama H. An essential role of the avidity of T cell receptor in differentiation of

self-antigen-reactive CD8+ T cells. J Immunother, 39:127-39, 2016.

10. Nakajima H, Murakami Y, Morii E, Akao T, Tatsumi N, Odajima S, Fukuda M, Machitani T, Iwai M, Kawata S, Hojo N, Oka Y, Sugiyama H, Oji Y. Induction of eEF2-specific anti-tumor CTL responses in vivo by vaccination with eEF2-derived 9mer-peptides. Oncology Reports, 35:1959-66, 2016.
11. Tatsumi N, Hojo N, Yamada O, Ogawa M, Katsura Y, Kawata S, Morii E, Sakamoto H, Inaba R, Tsuda A, Fukuda I, Moriguchi N, Hasuwa H, Okabe M, Fujiki F, Nishida S, Nakajima H, Tsuboi A, Oka Y, Hosen N, Sugiyama H, Oji Y. Deficiency in WT1-targeting microRNA-125a leads to myeloid malignancies and urogenital abnormalities. Oncogene, 35:1003-14, 2016.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

尾路 祐介 (OJI YUSUKE)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20294100