

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591131

研究課題名（和文） 分裂期キナーゼを標的とした新規造血器悪性腫瘍治療戦略

研究課題名（英文） Development of new treatment strategy targeting mitotic kinases in hematological malignancies

研究代表者

池添 隆之（Ikezoe Takayuki）

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：80294833

研究成果の概要（和文）：

一つの細胞が分裂し、全く同じ二つの細胞が創られることで細胞は増殖を続ける。この分裂の過程は分裂期キナーゼという酵素群によって精密に制御されている。これらキナーゼの機能破綻により細胞が無秩序に増殖しがん化が引き起こされていることが予想される。この度我々は分裂期キナーゼの一種であるポロ様キナーゼに注目しその白血病化への関与について検討を行った。ポロ様キナーゼは正常の造血細胞と比べて、急性白血病細胞で異常にその発現が亢進していた。そしてこのキナーゼを阻害剤を用いて不活化すると白血病細胞の増殖は抑制された。これらのことから、ポロ様キナーゼは白血病細胞の増殖に関与しており、格好の治療標的分子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Polo-like kinase1 (PLK1) belongs to the family of serine/threonine kinases and plays an important role in centrosome maturation, bipolar spindle formation, and cytokinesis during mitosis. We found in this study that PLK1 was aberrantly highly expressed in freshly isolated leukemia cells from individuals with acute myelogenous leukemia (AML, n=50) and acute lymphoblastic leukemia (ALL, n=15) compared to bone marrow mononuclear cells from healthy volunteers (n=13) (AML, $p=0.016$; ALL, $p=0.008$), as measured by real-time RT-PCR. Down-regulation of PLK1 by a small interfering RNA (siRNA) in NB4 AML cells inhibited their proliferation. GW843682X is a novel selective PLK1 inhibitor. The compound induced growth inhibition, caused accumulation of cells in the G2/M phase of the cell cycle and mediated apoptosis of human leukemia cells. Taken together, targeting PLK1 may be a promising treatment strategy for individuals with leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：分裂期キナーゼ、造血器悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

白血球をはじめ多くの造血器悪性腫瘍は、当

初は抗癌剤治療に反応を示しその増殖は抑制されるが一度再発すると抗癌剤治療に耐性化を示し死に至る予後不良の疾患群である。腫瘍細胞の耐性化獲得のメカニズムの解明、その克服とともに、新規治療標的分子の探索及びそれを標的とした治療法の確立は急務である。

2. 研究の目的

近年、癌細胞では細胞周期の分裂期を制御しているセリン/スレオニンキナーゼ（分裂期キナーゼ）が細胞周期非依存的に高発現し、その機能破綻が細胞の癌化に関与している可能性が示唆されている。今回我々は、これら細胞周期を制御しているキナーゼ群の造血器腫瘍化への関与、またそれらが治療標的となり得るかについて検討を行った。

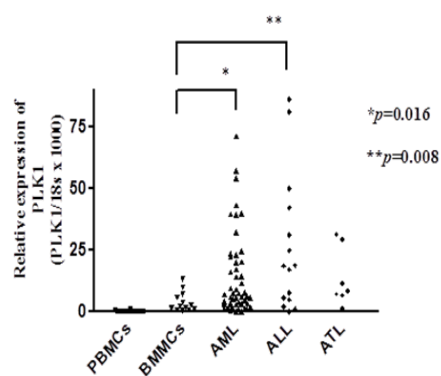
3. 研究の方法

①急性骨髄性白血病患者（AML, n=50）、急性リンパ芽球性白血病患者（ALL, n=15）、成人T細胞性白血病（ATL, n=7）から採取した白血病細胞から mRNA を抽出し real-time RT-PCR で、分裂期キナーゼファミリーに属する polo-like kinase 1（PLK1）の発現レベルを定量化した。正常人（n=13）の骨髄単核球における PLK1 の発現レベルと比較した。

②急性白血病細胞における PLK1 遺伝子を RNA 干渉で knock-down したり、特異的阻害剤でブロックすることでその細胞増殖に及ぼす影響やアポトーシスが誘導されるか否かについて検討した。

4. 研究成果

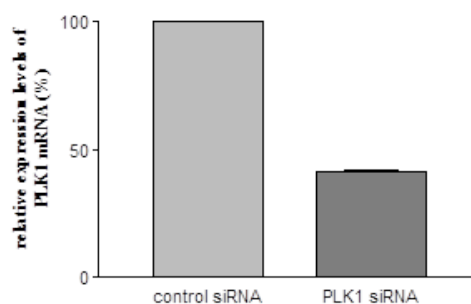
AML をはじめ造血器腫瘍細胞は正常造血細胞と比べて有意に PLK1 を高発現していた。



次に、白血病細胞増殖機構への PLK1 の関与を検討した。

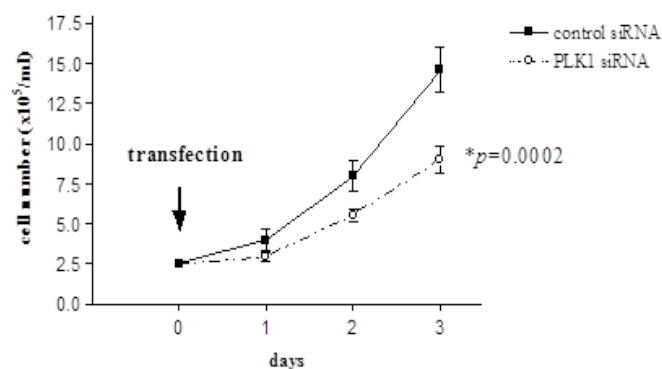
AML 細胞株 NB4 において、RNA 干渉（small interfering RNA, siRNA）で PLK1 を阻害した。

NB4

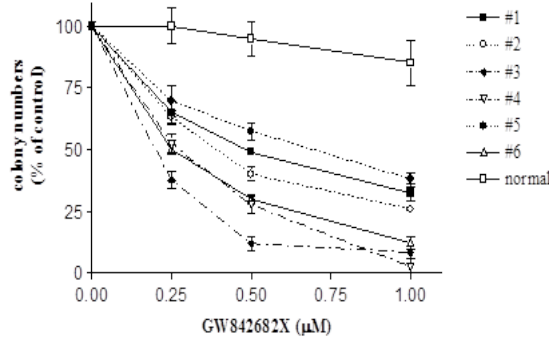


コントロール siRNA もしくは PLK1 siRNA を遺伝子導入した NB4 細胞を培養し、連日その細胞数をカウントしてそれらの細胞増殖を比較した。PLK1 siRNA で PLK1 の発現が抑制された NB4 細胞はコントロール細胞と比較して明らかにその細胞増殖は抑制された。

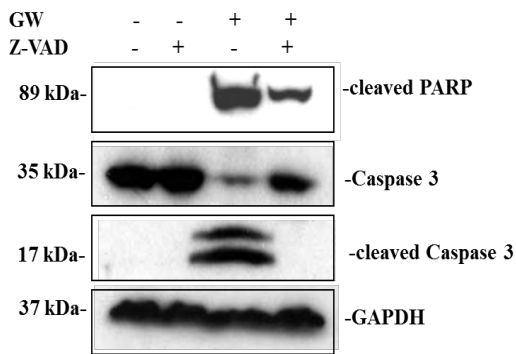
NB4



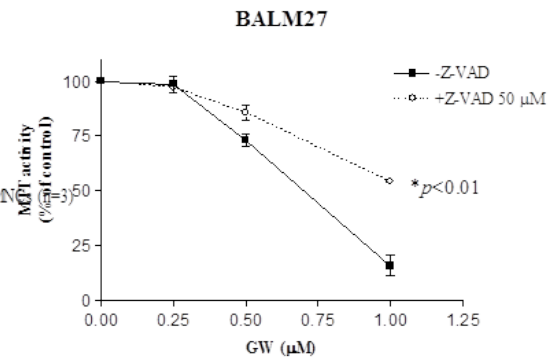
我々は更に AML 患者から採取した白血病細胞を PLK1 阻害剤 GW842682X に暴露し、その細胞増殖の変化を観察した。何れの細胞も PLK1 阻害剤の非存在下では多数のコロニーを形成したが、PLK1 阻害剤の存在下では濃度依存的にそれらのコロニー形成能は阻害された。重要なことに、正常人から採取した骨髄単核球はこれらの濃度の PLK1 阻害剤に暴露してもそれらのコロニー形成は有意には阻害されなかった。つまり、これらの結果から、PLK1 阻害剤は骨髄抑制の副作用なく、白血病細胞の増殖を効果的に抑制できる可能性が示唆された。



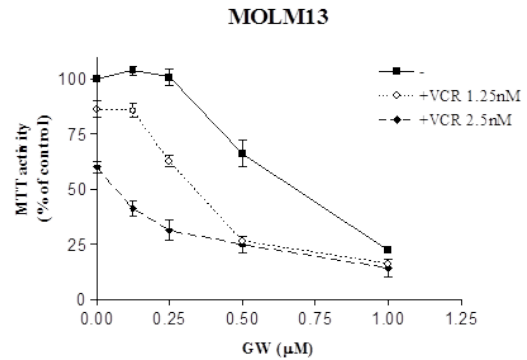
PLK1 阻害による細胞増殖抑制のメカニズムを探るべく、ALL 細胞 NALM27 を PLK1 阻害剤に暴露後蛋白質を抽出してウエスタンブロット法を用いて、細胞死に関わる様々な蛋白質の発現レベルを解析した。PLK1 を阻害すると PARP と caspase 3 が切断されることが明らかとなった。すなわち、PLK1 は caspase3 の活性化を介してアポトーシスを誘導して細胞死を導いている可能性が示唆された。



Caspase3 の活性をその阻害剤 Z-VAD でブロックすると PLK1 阻害剤による NALM27 細胞の増殖抑制は部分的ではあるが解除された。つまり、PLK1 阻害剤による白血病細胞増殖抑制は一部、caspase 3 を介したアポトーシスによることが明らかとなった。



これら一連の研究で、造血器腫瘍においては分裂期キナーゼ PLK1 が異常活性化しており、これら腫瘍細胞の増殖機構へ関与していること、また、PLK1 を阻害することで効果的にその細胞死を誘導できることが示唆された。また、既存の抗がん剤と併用すると PLK1 阻害剤の細胞死誘導能は明らかに増強することを明らかにした。中でも、分裂期の進行に必須であるチューブリンの重合を阻害する抗がん剤 vincristine (VCR) と併用するとその細胞抑制は顕著に増強した。



現在 PLK1 阻害剤の固形腫瘍に対する臨床試験が行われておりその臨床開発が進んでいる。

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 13 件)

1. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Furihata M, Yokoyama A. AZ960, a novel Jak2 inhibitor induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. Mol Cancer Ther. 2010;12:3386-95. 査読有

2. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A.
cells to multi-targeted tyrosine kinase inhibitor induces activations of AKT, ERK and STAT5 signaling via epigenetic silencing of the PTEN gene. *Leukemia*. 2010;24:1631-40. 査読有
 3. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Yokoyama A.
kinase inhibitor-mediated apoptosis in acute myelogenous leukemia cells. *Int J Hematol*. 2010;91:69-77. 査読有
 4. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A.
mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo. *Exp Hematol*. 2010;38:666-76. 査読有
 5. Ikezoe T, Togitani K, Tasaka T, Nishioka C, Yokoyama A.
treatment of imatinib-resistant hypereosinophilic syndrome with nilotinib. *Leuk Res*. 2010;34:e200-1. 査読有
 6. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A.
induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells via inhibition of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and down-regulation of Mcl-1. *Apoptosis*. 2010;15:795-804. 査読有
 7. Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, Adachi Y, Nishioka C, Furihata M, Koeffler HP, Yokoyama A.
in non-Hodgkin lymphoma. *Lab Invest*. 2009;89:1364-73. 査読有
 8. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A.
inhibitor stimulates expression of IL-6 and activates JAK2/STAT5 signaling in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia*. 2009;23:2304-8. 査読有
 9. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A.
receptor tyrosine kinase inhibitor, induces monocytic differentiation of acute myelogenous leukemia cells that is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Leukemia*. 2009;23:2171-3. 査読有
 10. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A.
Apoptosis. signaling enhances the ability of cytarabine to induce growth arrest and apoptosis of acute myelogenous leukemia cells. *Apoptosis* 2009;14:1108-20. 査読有
 11. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Gery S, Koeffler HP, Yokoyama A.
mammalian target of rapamycin signaling potentiates the effects of all-trans retinoic acid to induce growth arrest and differentiation of human acute myelogenous leukemia cells. *Int J Cancer*. 2009;125:1710-20. 査読有
 12. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Komatsu N, Koeffler HP, Yokoyama A.
Blockade of MEK signaling potentiates 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced apoptosis and upregulation of leukemia cells. *Int J Cancer*. 2009;125:1168-76. 査読有
 13. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Takezaki Y, Tasaka T, Togitani K, Koeffler HP, Yokoyama A.
targeting polo-like kinase 1 in hematological malignancies. *Leukemia*. 2009;23:1564-76. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
1. Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Chie Nishioka, Akihito Yokoyama. P53 is critical for the Aurora B kinase inhibitor-mediated apoptosis in acute myelogenous leukemia cells. AACR 101st Annual Meeting 2010 April 17-21, 2010 Washington, DC
 2. Nils H. Thoennissen, Gabriela B. Iwanski, Jianfei Ji, Takayuki Ikezoe, Kunik Lee, Yoshihiro Adachi, Tamotsu Takeuchi, Mutsuo Furihata, Dorothy J. Park, Adrian F. Gombart, H. P. Koffler. An oncogenic role for CCAAT/enhancer binding protein beta in non-small cell lung cancer. AACR 101st Annual Meeting 2010 April 17-21, 2010 Washington, DC
 3. Takayuki Ikezoe, Chie Nishioka, Jing Yang, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Akihito Yokoyama, Keiko Udaka. CD34+/CD38- Leukemia Stem Cells Aberrantly Express CD82 Adhesion Molecule. 52nd ASH Annual Meeting and Exp December 4-7, 2010 Orange County Convention Center, Orlando, FL
 4. Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Chie Nishioka, Mayuka Isaka, Naomi Iwabu, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Kazuto Togitani, Goichi

- Honda*, Akihito Yokoyama. Recombinant Human Soluble Thrombomodulin Enhances the Anti-Fibrinolytic and Ant Effects of All-Trans Retinoic Acute Promyelocytic Leukemia Cells. 52nd ASH Annual Meeting and Exp December 4-7, 2010 Orange County Convention Center, Orlando, FL
5. Takayuki Ikezoe, Yang Jing, Chie Nisioka, Sinsuke Kojima, Asako Takeuchi and Akihito Yokoyama. Inhibition of STAT5 by IL-1 β of the Inhibitor of Janus kinases Stimulates Dormant Humon Leukemia Stem Cells and Sensitizes Them to Anti-Leukemia Agents. 51ST ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION December 5-8. 2009. NEW ORLEANS
6. Sinsuke Kojima, Takayuki Ikezoe, Mutsuo Furihata, Jing Yang, Chie Nisioka, Asako Takeuchi, Mayuka Isaka, H. Phillip Koeffler, Akihito Yokoyama. Development of a Novel Treatment Strategy Targeting JAK2 in Acute myelogenous Leukemia. 51ST ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION December 5-8. 2009. NEW ORLEANS

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池添 隆之 (IKEZOE TAKAYUKI)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：80294833