

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17402

研究課題名（和文）HTLV-1感染伝播、ATLの発症/悪性を阻止しうる新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment toward prevention of HTLV-1 transmission and ATL disease onset

研究代表者

原田 武志（HARADA, Takeshi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・准教授

研究者番号：10618359

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NF- κ B経路が構成的に活性化している成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）細胞では、NF- κ B経路の阻害あるいはその枢軸的転写因子RELAの発現抑制は、アポトーシスを誘導し、PIM1発現を低下させた。さらに、PIM1発現抑制/PIMキナーゼ阻害薬PIM447は、ATL細胞に著明なアポトーシスを誘導し、RelAや転写因子c-MYBの発現を低下させた。これらの転写因子の発現低下はmRNAレベルでは認めず、翻訳阻害による機序が示唆された。PIM447とAkt阻害薬MK-2206は、協調的な細胞傷害活性を発揮し、ATLおよびHTLV-1感染細胞に対する有効な標的治療となり得る可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NF- κ B経路とPIM1の関係を中心にATLに対する治療標的の探索を行い、PIM阻害薬とAkt阻害薬によるタンパク質合成経路の阻害が、ATL細胞において、NF- κ B経路の制御因子を含む転写因子の発現を低下させ、アポトーシスを誘導できる結果を見出した。本研究成果は、ATL研究において未だ未開発で、ATL治療開発を促進できる可能性があり、学術的意義は大きい。また、HTLV-1ウイルス感染伝播やATL発症に関する研究にも視野を広げていく予定であり、社会的意義は今後大きくなると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) cells constitutively activate NF- κ B signaling pathway. Inhibition of the signaling or gene suppression of the transcription factor (TF) RELA, which is the pivotal TF in the signaling, induced apoptosis and downregulated PIM1 expression in ATL cells. PIM1 suppression/ a PIM inhibitor PIM447 induced apoptosis and downregulated RelA and TF c-MYB in protein levels but not mRNA levels. Puromycin incorporation assay demonstrated that PIM-kinase inhibition blocked translation in ATL cells. Furthermore, an Akt inhibitor MK-2206 cooperatively induced cytotoxicity in combination with PIM447 against ATL cells, suggesting PIM kinases and PI3K/Akt signaling both regulate a protein synthesis axis in ATL cells. Taken together, our findings are further warranted on the effect of blockade of protein synthesis for the prevention of ATL disease onset and HTLV-1 transmission.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：成人T細胞白血病リンパ腫 NF- κ B PIM1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (ATL) は、HTLV-1 ウイルスが CD4 陽性 T 細胞に持続感染し腫瘍化することを病因とし、現在も治癒がもたらされず、極めて予後不良な造血器悪性疾患である。ATL 細胞では、NF- κ B 経路を中心に遺伝子変異と構成的活性化が起こり、治療抵抗性を獲得している。治療成績向上のためには、この治療抵抗性を克服する新規治療を開発する必要がある。

これまでの研究代表者らによる B 細胞性腫瘍である多発性骨髄腫細胞での検討では、TGF β -activated kinase-1 (TAK1) は、NF- κ B 経路や p38MAPK 経路の上流に位置するマスター調節因子として治療標的になり得ることを見出してきた。研究代表者の予備検討において、TAK1 は ATL 細胞で高発現していることから、TAK1 は骨髄腫細胞と同様に有望な治療標的と考えられた。

Proto-oncogene である PIM キナーゼは、PIM1/2/3 に分類されるが、とりわけ造血器腫瘍においては PIM1 と PIM2 が高発現している。ATL 細胞では、PIM2 に比べ PIM1 が高発現していることを確認している。PIM1/2 は、腫瘍細胞の生存増殖に関わる転写因子 c-MYC の活性化や Bcl-2 などのアポトーシス関連因子の機能制御を担うことが報告されているが、PIM1 と PIM2 の標的の相違については未だ不明な点が多い。

そこで、本研究では、NF- κ B 経路が構成的に活性する ATL 細胞において、TAK1 を中心とする NF- κ B 経路と PIM1 の生存増殖機構における役割を解明するための検討を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、多岐にわたる生存シグナル経路の枢軸的媒介因子で、ATL 細胞で高発現している TAK1 を中心とする NF- κ B 経路と PIM1 に着目し、ATL に対する新規治療標的としての有用性を明らかにすることを目的とした。そして、ATL 細胞の生存増殖を効率的に抑制、あるいはアポトーシスを誘導できる新規治療法を開発することで、HTLV-1 ウイルスの細胞間伝播と、感染細胞の増殖／不死化を阻止できる ATL/HTLV-1 感染に対する次世代の治療戦略を考案するための研究へ展開することをねらいとした。

3. 研究の方法

遺伝子発現抑制: shRNA レンチウイルスベクターシステムを用いて、遺伝子発現抑制を行った。レンチウイルスは、293T 細胞に pCMV-dvpr、VSV-G、pLKO.1 プラスミドをトランスフェクションすることで作製した。ATL 細胞株にウイルスベクターを導入し、puromycin による薬剤選択した後、各遺伝子の発現が抑制していることを確認しながら、それぞれの実験に使用した。

細胞生存増殖評価: 化合物による細胞傷害活性は CCK-8 アッセイを用い、アポトーシスの評価は、Annexin V-PI 染色によるフローサイトメトリーで評価を行った。

タンパク質合成／翻訳評価: ATL 細胞を PIM 阻害薬 PIM447 で 6 時間作用させた後、さらに puromycin で短時間処理し、タンパク質の抽出を行った。ウエスタンブロット (WB) 法で puromycin を検出することで、定性的にタンパク質合成／翻訳評価を行った。

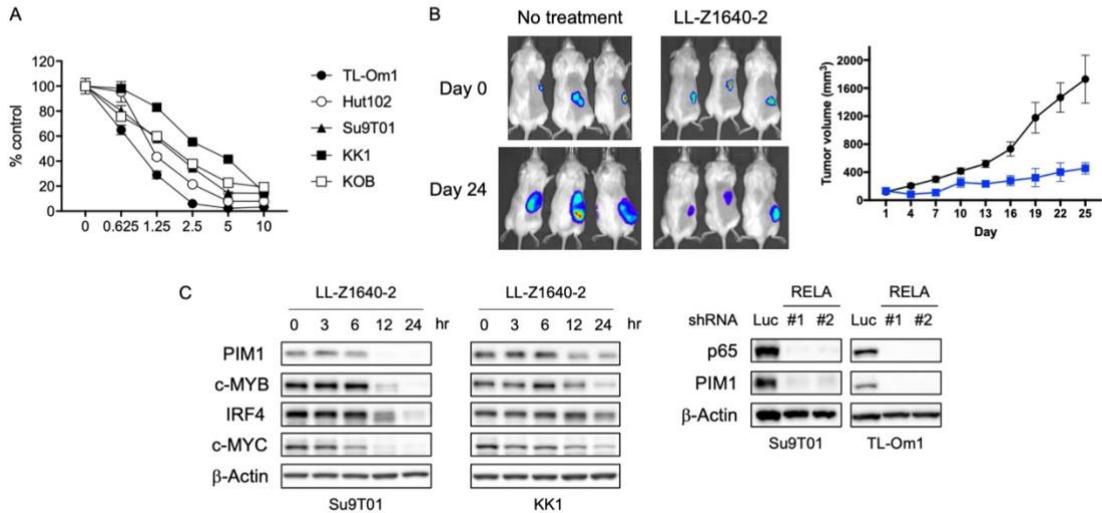
ATL 動物モデルを用いた実験: ルシフェラーゼ遺伝子を導入した ATL 細胞株 Su9T01 を NSG マウスに皮下移植し作成する ATL マウスモデルを用いた。Su9T01 移植後、腫瘍の生着を確認し、NF- κ B 経路阻害薬 LL-Z1640-2 や PIM 阻害薬 PIM447 をそれぞれ腹腔内および経口投与し、腫瘍径を測定しながら、IVIS を用いて腫瘍増殖抑制効果について評価した。

4. 研究成果

(1) ATL 細胞における NF- κ B 経路阻害による PIM1 発現低下

TAK1-NF- κ B 経路の構成的活性化による ATL 細胞の生存増殖における意義を検討するために、TAK1 と I κ k α を阻害できる LL-Z1640-2 処理による ATL 細胞の増殖抑制効果を CCK-8 アッセイで確認した。LL-Z1640-2 は、24 時間処理で濃度依存的に細胞傷害活性を発揮した (図 1A)。さらに、同様の処理条件で、Annexin V-PI アッセイによる、LL-Z1640-2 のアポトーシス誘導を確認した。また、ATL マウスモデルを用いて、LL-Z1640-2 の腫瘍増殖抑制効果を確認した (図 1B)。次に、TAK1 (MAP3K7) および RELA 発現抑制による ATL 細胞増殖抑制効果を確認したところ、MAP3K7 発現抑制では LL-Z1640-2 ほどの細胞増殖抑制を認めなかったが、RELA 発現抑制では強力な細胞傷害を認めた。NF- κ B 経路阻害での PIM キナーゼの発現変化を確認するために、ウエスタンブロット (WB) 法を用いて解析を行った。LL-Z1640-2 処理および RELA 発現抑制により、ATL 細胞の PIM1 の発現低下を認めた (図 1C)。以上の結果からは、ATL 細胞における NF- κ B 経路の構成的活性化は、TAK1 を中心に調整されるのではなく、様々な遺伝子変異も相まって活性化していること、PIM1 はこのような NF- κ B 経路で発現制御されている可能性が示唆された。

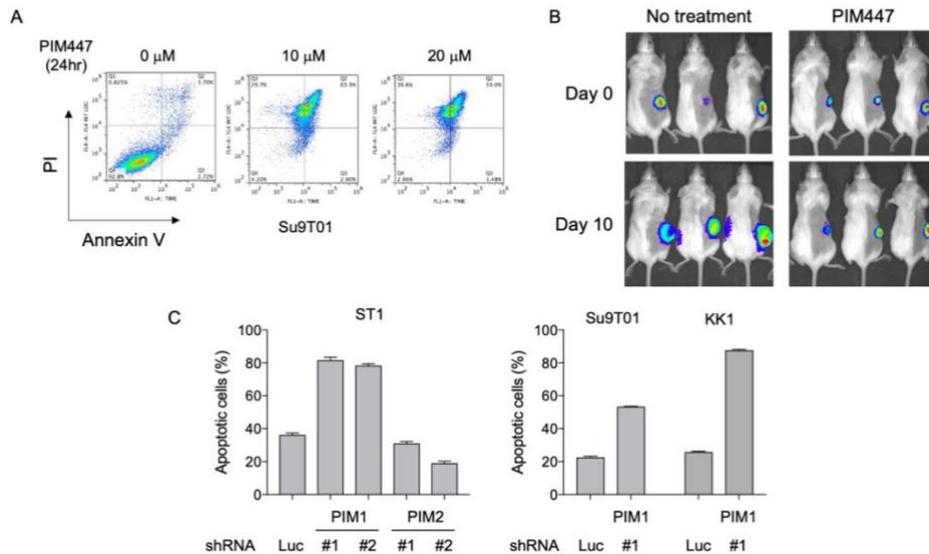
図1. ATL細胞での NF-κB経路阻害は、PIM1の発現を低下させる。



(2) PIM1/2 発現抑制による ATL 細胞の増殖抑制効果

PIM キナーゼの ATL 細胞の生存増殖における意義を検討するために、PIM 阻害薬による ATL 細胞の増殖抑制効果を CCK-8 アッセイで確認した。PIM 阻害薬は PIM447, SMI-4a, SMI-16a, AZD1208 で検討したが、PIM447 は、SMI-4a, SMI-16a, AZD1208 と比べ、比較的低濃度で細胞増殖抑制活性を発揮した。さらに、Annexin V-PI アッセイによる、ATL 細胞に対する PIM447 のアポトーシス誘導を確認した(図 2A)。また、ATL マウスモデルを用いて、PIM447 の腫瘍増殖抑制効果も確認できた(図 2B)。PIM キナーゼ群でのさらなる治療標的を明らかにする目的で、PIM1 または PIM2 発現抑制による細胞増殖への影響を検討したところ、PIM1 発現抑制では著明なアポトーシス誘導を認めた(図 2C)。ATL 細胞では、PIM キナーゼの中で、PIM1 が特に治療標的として有用であることが想定された。

図2. PIM1阻害/発現抑制は、ATL細胞にアポトーシスを誘導する。

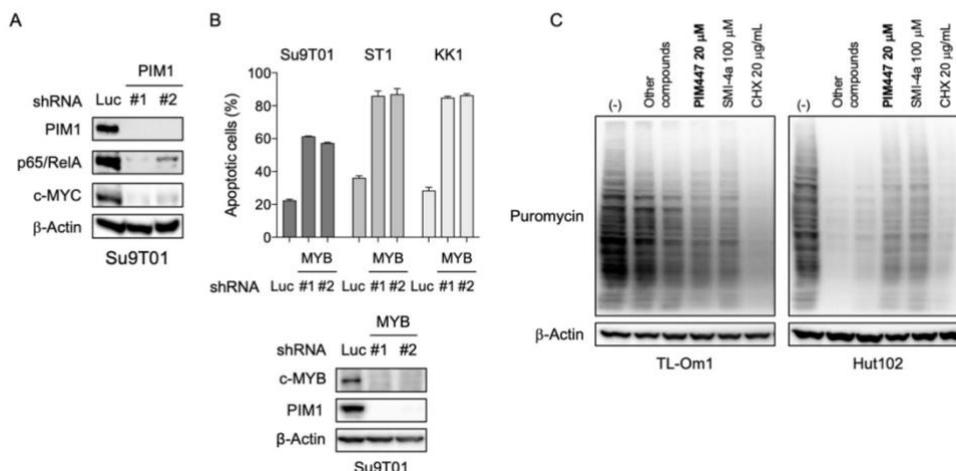


(3) PIM1 発現抑制による ATL 細胞の枢軸的転写因子の発現低下

PIM1 阻害による ATL 細胞での細胞傷害の誘導機序を検討するために、ATL 細胞の生存増殖において重要な転写因子群の発現変化を確認した。PIM1 発現抑制では、種々の転写因子の発現が低下していた(図 3A)。c-MYB は、c-MYC と双璧をなす T 細胞性腫瘍で重要な転写因子とされているが、MYB 発現抑制は、ATL 細胞にアポトーシスを誘導し、PIM1 の発現も低下した(図 3B)。IL-2 や IL-6, IL-10, TNF-α による PIM1 発現変化は認めなかったことから、PIM1 は NF-κB 経路による制御の他に、c-MYB による制御機構が示唆された。PIM1 阻害での種々の転写因子の発現低下機序を検討する目的で、PIM447 による遺伝子発現変化を定量 PCR 法で確認したところ、RELA や MYB の明らかな mRNA の発現低下は認めなかった。そこで、PIM447 による翻訳抑制の確認を、puromycin 取り込み評価を用いて行った。PIM447 20 μM を 6 時間処理後の puromycin 取り込み率を WB 法で確認したところ、PIM447 処理群では明らかな取り込み抑制を認めた(図 3C)。これらの結果は、PIM1 阻害は、転写ではなく翻訳抑制により、RelA や

c-MYB などの転写因子の発現を低下させることが示唆された。

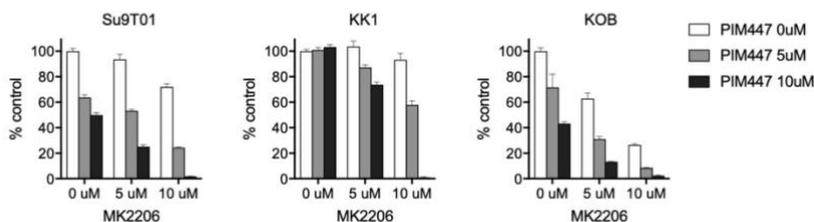
図3. PIM1発現抑制/PIMキナーゼ阻害によるATL細胞の変化



(4) PIM 阻害薬を中心とする新規治療法の開発

検討 (1 - 3) の結果から、LL-Z1640-2 と PIM447 は ATL に対する有効な治療薬となる可能性が示唆されたため、これらの薬剤のさらなる治療効果を高めるための併用療法について検討を進めた。LL-Z1640-2 と PIM447 の併用療法においては、明らかな相乗効果を認めなかったが、NF-κB 経路が PIM1 の発現を制御することから推測すると、これらの阻害薬が同様の作用機転で効果を発揮するためと考えられた。次に、PIM447 による翻訳抑制機構に着目し、PIM447 と Akt 阻害薬 MK-2206 との併用療法を検討した。それぞれ 5・10 μM と比較的低濃度での PIM447 と MK-2206 の組合せで、薬剤上乗せ効果を確認できた(図 4)。PI3K-Akt 経路と PIM1/2 が共に mTOR シグナル経路を制御することが示唆され、それぞれの薬剤を低濃度で使用することでも相乗効果の発揮に繋がると考えられた。また、これらの結果からは、ATL の治療標的としては、mTOR シグナル経路も有用であることが示唆された。

図4. PIM447とAkt阻害薬MK2206の併用は、ATL細胞に協調的に細胞傷害を発揮する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Takeshi, Hiasa Masahiro, Teramachi Jumpei, Abe Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Myeloma-Bone Interaction: A Vicious Cycle via TAK1-PIM2 Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4441 ~ 4441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13174441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Oura M, Harada T, Teramachi J, Oda A, Inoue Y, Sogabe K, Sumitani R, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Hasegawa H, Fujiwara H, Abe M
2. 発表標題 Critical roles of the TAK1-c-Myc loop as a novel therapeutic target for ATL
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oura M, Harada T, Teramachi J, Nakayama A, Oda A, Inoue Y, Sogabe K, Sumitani R, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Hasegawa H, Fujiwara H, Abe M
2. 発表標題 Efficacious therapeutic potential of targeting PIM kinases in ATL
3. 学会等名 The 83rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------