

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08116

研究課題名(和文)慢性骨髄性白血病における分子標的治療薬耐性機序の解明とその耐性克服薬の開発

研究課題名(英文) Identification of imatinib resistance factor and the therapeutic strategies to overcome resistance in chronic myeloid leukemia

研究代表者

西田 升三 (NISHIDA, Shozo)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：40208187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト慢性骨髄性白血病細胞においてイマチニブ耐性株を樹立し、耐性獲得機序の解析を行い、MET活性化に基づくバイパスシグナル伝達経路が関与することを見出した。さらに、METを阻害する分子標的薬によりイマチニブ耐性を克服することを明らかにした。以上の結果は、臨床におけるイマチニブ耐性慢性骨髄性白血病出現時における治療に貢献できる可能性が考えられる。
なお、本研究成果は主な発表論文の項に全てまとめてある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the underlying mechanisms associated with resistance to imatinib, we established imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML) cell lines. The resistant cell lines activation of MET. In addition, MET inhibitor reversed the imatinib-resistance of the drug-resistant cell lines. These findings suggest that MET inhibitors are potentially useful as an imatinib-resistance CML agent for the treatment of CML cells.
As well, These results are summarized as section of presented paper.

研究分野：医療薬学

キーワード：慢性骨髄性白血病 イマチニブ BCR-ABL阻害薬

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病は 90%以上で Breakpoint cluster region-Abelson murine viral homolog 1 (BCR-ABL1) タンパクが認められ、この BCR-ABL1 により恒常的に細胞内シグナル伝達が活性化し、白血病細胞が増殖することが病因となっている。近年、BCR-ABL1 を標的としたイマチニブにより、5 年生存率が 89%と飛躍的に改善されたが、30~35%の患者でイマチニブに対して不応・耐性獲得が生じ、臨床で大きな問題となっている。

このイマチニブ耐性の原因には、BCR-ABL1 タンパク内のキナーゼドメインの点突然変異、代表的なものに T315I によるものがあり、この変異によりイマチニブが BCR-ABL1 に結合することを妨げ、有効性が低下する。この耐性変異に対してボナチニブや DCC-2036 などの治療薬が開発され、イマチニブ耐性患者の予後は改善されつつあるが、これらの薬剤に対しても耐性を持つ細胞が存在し、耐性克服には至っていない。一方、イマチニブ耐性患者の 50%には BCR-ABL1 の変異は認められておらず、その要因として BCR-ABL1 タンパクの過剰発現による BCR-ABL1 の異常活性化がある。また、イマチニブは Multidrug resistance protein 1 (MDR1) や Breast cancer resistance protein (BCRP) などの薬剤排泄トランスポーターの基質であることから、これらトランスポーターの過剰発現による細胞内のイマチニブ濃度の低下も考えられている。さらに、BCR-ABL1 活性に依存しない Src などの非受容体型チロシンキナーゼの活性化などが関与することが示されているものの、詳細は分かっておらず不明な点が多い。

つまり、イマチニブ耐性機序の解明及びその耐性克服には至っていないのが現状であり、耐性克服には耐性獲得因子の同定と耐性機序の全解明が重要である。

2. 研究の目的

本研究では慢性骨髄性白血病におけるイマチニブ耐性獲得機序の解明及び治療法の開発を目的として解析を行った。

3. 研究の方法

(1) イマチニブ耐性株の樹立

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株である K562 細胞を使用した。この細胞は、10% fetal bovine serum (FBS) および penicillin G 100U/mL + streptomycin 100µg/mL を添加した HEPES、L-グルタミンを含む RPMI1640 培地 (pH7.4) で、37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

耐性株を樹立するために、細胞死を誘導しない濃度から投薬を始め、K562 細胞を培養した。感受性株と同程度の生存・増殖が確認された後、薬剤投与濃度を増加して培養した。この過程を繰り返すことにより、イマチニブ耐性株 (K562/IR) を樹立した。

(2) 細胞死誘導の確認

K562 細胞及び K562/IR 細胞をプレートに播種し、培養した。その後、K562 細胞及び K562/IR 細胞に各種薬剤を投与した。72 時間培養した後の細胞数の変化をトリパンブルー色素排除染色試験法により算定し、この測定値を control に対する細胞生存率として評価した。

(3) Western Blotting

K562 細胞及び K562/IR 細胞を各種条件下で培養したものをタンパク質検出用サンプルとした。細胞浮遊液を回収し、洗浄後の細胞ペレットに cell lysis buffer を添加し、よく混和して細胞膜を破壊した後、遠心分離し、その上清をサンプル (細胞質分画) とした。

細胞質分画回収後のペレットを cell lysis buffer without NP-40 で洗浄した。洗浄後のペレットに nuclear lysis buffer を添加し、よく混和して細胞核膜を破壊した後、遠心分離し、その上清をサンプル (細胞核分画) とした。また、タンパク定量は BCA Protein Assay を用いて行った。

このサンプルを、SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (SDS-PAGE) し、PVDF 膜にタンパクを転写した。

PVDF 膜を TBS で洗浄した後、スキムミルク in TBS により blocking を行い、目的とするタンパクに特異的な一次抗体を反応させた。次に PVDF 膜を TBS で洗浄し、Horseradish peroxidase で標識した二次抗体と反応させた。再び PVDF 膜を TBS で洗浄し、試薬にて化学発光させ、cooled CCD camera system Light-Capture II により撮影し、解析を行った。

一次抗体には、phospho-Met、Met、phospho-BRAF BRAF、EZH2、β-catenin、に特異的に反応するラビットポリクローナル抗体 β-actin に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を用い、二次抗体には抗ラビット抗体及びおよび抗マウス抗体をそれぞれ用いた。

(4) 統計学的解析

上記の方法により得られた結果は平均値±標準偏差で示した。ANOVA with Dunnett により解析し、 $p < 0.05$ のとき有意差があるとした。

4. 研究成果

4-1. 樹立した耐性株のイマチニブ耐性の確認

樹立した K562/IR 細胞がイマチニブに対して耐性を獲得しているか確認するために、イマチニブ投与時における細胞増殖を検討した。K562 細胞のイマチニブ投与群において 1 日間培養後の結果は、コントロールと比較して、細胞数に有意な差は認められないが、2 日間培養した以降の結果でその差が顕著なものとなった (図 1)。この結果から、K562 細胞においては、イマチニブ投与により、細胞増殖が抑制されることが確認された。一方、

K562/IR 細胞のイマチニブ投与群においては、感受性株と比較して、細胞数に差は認められず、同様に増殖することが確認された。これらの結果より樹立した K562 細胞は、イマチニブに対して耐性を獲得したことが示唆される。

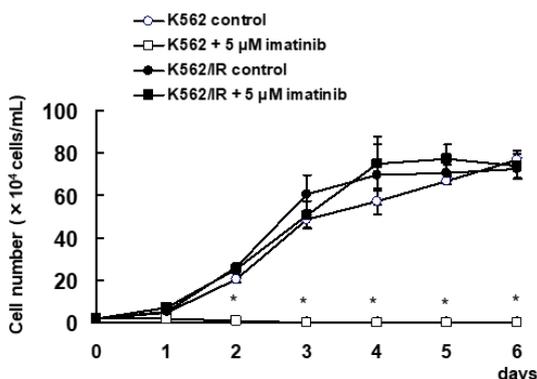


図 1 . イマチニブ耐性の確認

4 - 2 . イマチニブ耐性株における他の分子標的薬に対する耐性の確認

K562 細胞と K562/IR 細胞において、他の分子標的薬に対しても耐性を獲得しているか確認するために、K562/IR 細胞に第二世代のチロシンキナーゼ阻害剤であるニロチニブ・ダサチニブ投与時の細胞生存率を検討した。

その結果、第二世代のチロシンキナーゼ阻害剤に対しても耐性を獲得していることが認められた (図 2)。ゆえに、樹立したイマチニブ耐性株は、他のチロシンキナーゼ阻害剤への耐性を獲得していることが示唆される。

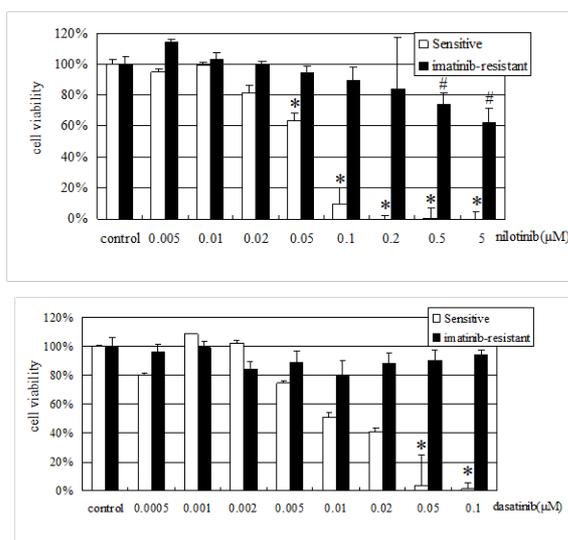


図 2 . 他の BCR-ABL 阻害薬耐性の確認

4 - 3 . array CGH による耐性獲得因子の検討

樹立したイマチニブ耐性株における耐性獲得因子を検討するため、array CGH により

解析を行った。今回は、K562 細胞では増幅が見られず、K562/IR 細胞でのみ増幅が確認された遺伝子であり、さらに、がんの増殖などに関与すると考えられる遺伝子をピックアップした (図 3)。これらの因子を中心に以後の検討を行った。

Gene name	Log ratio
MET	0.37
WNT2	0.37
EZH2	0.417
BRAF	0.391

図 3 . Array CGH による耐性因子の確認

4 - 4 . イマチニブ耐性株において遺伝子増幅が認められた因子のタンパク発現の検討

Array CGH の結果より、遺伝子発現が顕著に増加している因子についてタンパク発現を検討した。

その結果、K562 細胞と比較して K562/IR 細胞では、BRAF のタンパク発現に変化は認められなかったが、Phospho-Met (Tyr1234/1235)、Phospho-Met (Tyr1349)、β-catenin および EZH2 の発現増加が認められた (図 4)。

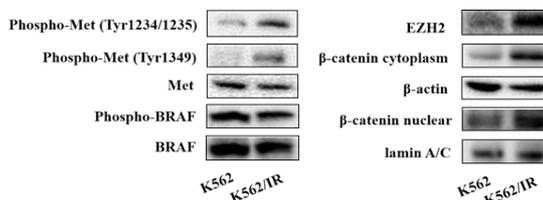


図 4 . 遺伝子増幅が認められたタンパク発現の確認

4 - 5 . イマチニブ耐性株における発現増加因子に対する阻害剤とイマチニブ併用による細胞死誘導の検討

遺伝子発現の増加が顕著である Met、Wnt2 および EZH2 に対する阻害剤と、K562 細胞では細胞死が誘導され K562/IR 細胞では細胞死が誘導されない濃度である 6 μM イマチニブを併用し検討を行った。

K562/IR 細胞に Met 阻害剤である PHA665752 を用いて検討を行うと、PHA665752 とイマチニブの併用においてイマチニブ単剤の生存率と比較し、有意な差が認められた。2.5 μM PHA665752 とイマチニブ併用時では生存率がほぼ 0% となった (図 5)。K562/IR 細胞に β-catenin 阻害剤である FH535 および EZH2 阻害剤である EPZ005687 を用いて同様に検討を行ったところ、イマチニブ併用時においてイマチニブ単剤の生存率と比較しても、有意な差は認められなかった (図 5)。これより、イマチニブ耐性獲得において Met の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

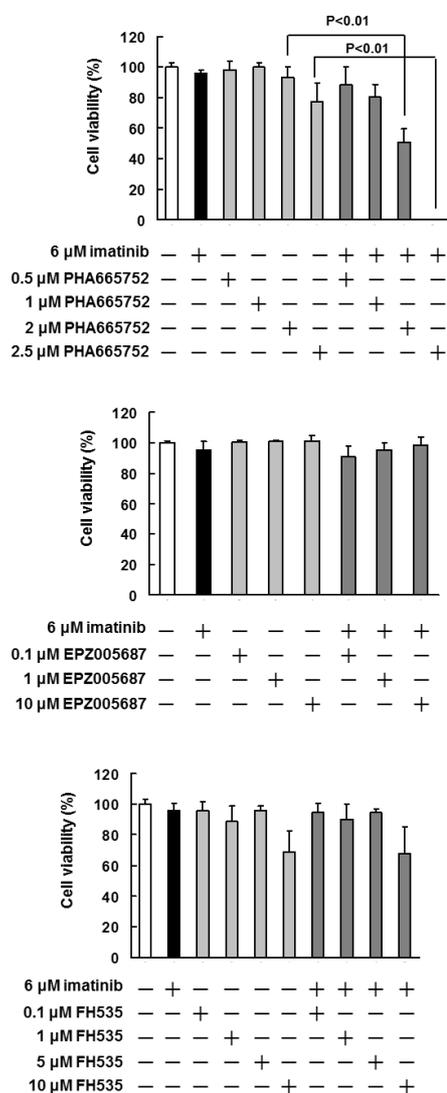


図5 . シグナル阻害剤におけるイマチニブ耐性克服の確認

4 - 6 . Xenograft モデルマウスにおける Met 阻害剤とイマチニブの腫瘍増殖抑制効果

先ほどの結果より、CML におけるイマチニブ耐性獲得には、Met の活性化が関与しており、Met 阻害剤とイマチニブの併用により耐性を克服できることを in vitro において明らかにした。そこで、in vivo においても Met 阻害剤とイマチニブの併用投与が有用であるか否かを確認するため、xenograft モデルマウスを作製し、Met 阻害剤とイマチニブによる腫瘍増殖抑制効果について検討を行った。

その結果、イマチニブを経口投与することにより、in vivo における K562 の腫瘍増殖を vehicle と比較して顕著に抑制した (図6)。一方、K562/IR の腫瘍増殖はイマチニブの投与により抑制されなかった。そこで、Met 阻害剤である PHA665752 を腹腔内投与、イマチニブを経口投与することにより、K562/IR の腫瘍増殖が抑制されるか否かについて検討を行った。その結果、PHA665752 単独投与群においては、vehicle と比較して若干の腫瘍

体積の減少が認められた。さらに、PHA665752 とイマチニブの併用投与群では顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図6)。

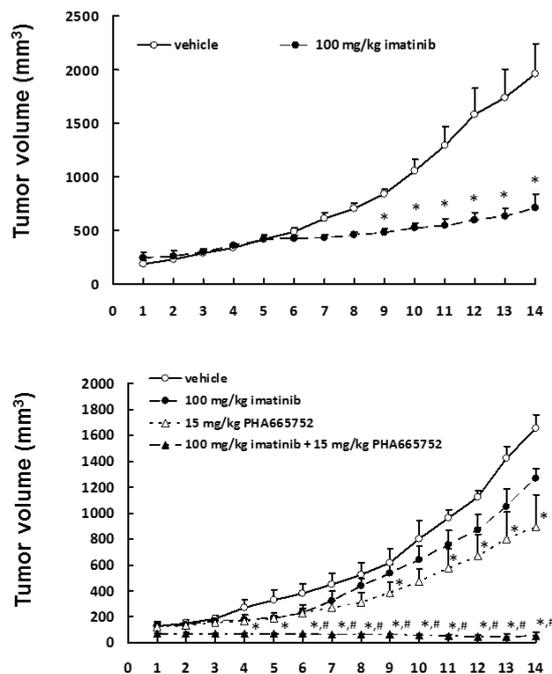


図6 . In vivo におけるイマチニブ耐性克服の確認

4 - 7 . 考察及び結論

本研究において、K562 細胞ではイマチニブの投与により細胞死が誘導されたのに対して、当研究室で樹立したイマチニブ耐性株 (K562/IR 細胞) では、親株で細胞死が誘導された濃度では細胞生存率に変化は認められなかった。また、イマチニブ耐性株は第二世代 BCR-ABL1 チロシンキナーゼ阻害剤であるニロチニブおよびダサチニブにも耐性を示した。これらの結果より、当研究室で樹立したイマチニブ耐性株は、BCR-ABL1 非依存的なシグナルの活性化により、耐性を獲得している可能性が示唆された。次に、耐性獲得機序について検討を行うため、Array CGH による遺伝子解析を行った。今回は K562 細胞で増幅が認められず、K562/IR 細胞でのみ増幅が認められる遺伝子に着目した。Array CGH の結果より、K562/IR 細胞で発現が増幅している因子として、Met、Wnt2、EZH2 および BRAF の4つをピックアップした。次に Array CGH の結果をもとより K562 細胞と比較して、耐性株で増幅が認められた Met、EZH2、BRAF および Wnt2 に関するタンパク発現を検討した。BRAF については K562 細胞と K562/IR 細胞で変化は認められなかったが、Phospho-Met、 β -catenin および EZH2 では、タンパク発現の増加が認められた。そこで、Met、 β -catenin および EZH2 に対するシグナル伝達因子阻害剤を用いて、阻害剤とイマチニブを併用することにより耐性を克服でき

るか否かについて検討を行った。Met 阻害剤である PHA665752 の終濃度 2.5 μ M において、阻害剤単剤では明らかな細胞死は認められなかったのに対して、イマチニブとの併用により細胞生存率がほぼ 0% となった。 β -catenin 阻害剤である FH535 および EZH2 阻害剤である EPZ005687 とイマチニブの併用では耐性克服効果は認められなかった。さらに、Met 阻害剤である PHA665752 とイマチニブの併用投与は、in vivo においても K562/IR 細胞の腫瘍増殖を顕著に抑制した。これより、Met が CML におけるイマチニブ耐性に関与していることが示唆された。

Met は受容体型チロシンキナーゼの一つであり、下流のシグナル伝達因子を活性化させることにより、細胞増殖および抗アポトーシス作用を発揮し、腫瘍形成に関与している。大腸癌におけるセツキシマブおよびパニツムマブ耐性に Met の活性化が関与していることが報告されている。また、EGFR(epidermal growth factor receptor)チロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を持つ非小細胞肺癌患者において、Met の発現増加および HGF の過剰発現が認められ、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤と Met 阻害剤の併用により耐性を克服できるという報告がある。Met 阻害剤により耐性が克服できるという点で、我々の結果と一致しており、PHA665752 が Met シグナルに対して依存度の高いがん細胞の耐性を克服できる可能性がある。

以上のことから、慢性骨髄性白血病のイマチニブ耐性株において、イマチニブの投与により BCR-ABL1 タンパクからのシグナルが阻害されたとしても、Met の活性化により下流のシグナル伝達因子が活性化されることが示唆された。これにより、イマチニブ耐性には Met の活性化が関与しており、イマチニブと Met 阻害剤を併用することにより耐性を克服できる事を明らかにした。このことから、Met をターゲットする分子標的薬が、イマチニブおよび BCR-ABL1 チロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を持つ患者に新たな治療法を提供できる可能性が示唆された。

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 15 件)

1) Takeda T, Tsubaki M, Tomonari Y, Kawashima K, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Bavachin induces the apoptosis of multiple myeloma cell lines by inhibiting the activation of nuclear factor kappa B and signal transducer and activator of transcription 3., *Biomed Pharmacother.*, 100, 486-494, 2018, 査読有. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.019.

2) Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Mashimo K, Koumoto YI, Hoshida S, Itoh T, Imano M,

Satou T, Sakaguchi K, Nishida S. The MIP-1 α autocrine loop contributes to decreased sensitivity to anticancer drugs., *J Cell Physiol.*, 233, 4258-4271, 2018. 査読有. DOI: 10.1002/jcp.26245.

3) Tsubaki M, Takeda T, Asano RT, Matsuda T, Fujimoto SI, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Rebamipide suppresses 5-fluorouracil-induced cell death via the activation of Akt/mTOR pathway and regulates the expression of Bcl-2 family proteins., *Toxicol In Vitro.*, 46, 284-293, 2018. 査読有. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.10.019.

4) Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Kawashima K, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Pioglitazone inhibits cancer cell growth through STAT3 inhibition and enhanced AIF expression via a PPAR γ -independent pathway., *J Cell Physiol.*, 233, 3638-3647, 2018. 査読有. DOI: 10.1002/jcp.26225.

5) Fujiwara D, Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Koumoto YI, Sakaguchi K, Nishida S. Statins induce apoptosis through inhibition of Ras signaling pathways and enhancement of Bim and p27 expression in human hematopoietic tumor cells., *Tumour Biol.*, 39, 1010428317734947, 2017. 査読有. DOI: 10.1177/1010428317734947.

6) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Sakai K, Itoh T, Imano M, Nakayama T, Nishio K, Satou T, Nishida S. Contributions of MET activation to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cells., *Oncotarget*, 8, 38717-38730, 2017. 査読有. doi: 10.18632/oncotarget.16314.

7) Tsubaki M, Fujiwara D, Takeda T, Kino T, Tomonari Y, Itoh T, Imano M, Satou T, Sakaguchi K, Nishida S. The sensitivity of head and neck carcinoma cells to statins is related to the expression of their Ras expression status, and statin-induced apoptosis is mediated via suppression of the Ras/ERK and Ras/mTOR pathways., *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 44, 222-234, 2017. 査読有. DOI: 10.1111/1440-1681.12690.

8) Takeda T, Tsubaki M, Sakamoto K, Ichimura E, Enomoto A, Suzuki Y, Itoh T, Imano M, Tanabe G, Muraoka O, Matsuda H, Satou T, Nishida S. Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model., *Toxicol Appl Pharmacol.*, 306, 105-112, 2016. 査読有. DOI: 10.1016/j.taap.2016.07.005.

9) Takeda T, Tsubaki M, Kino T, Kawamura A, Isoyama S, Itoh T, Imano M, Tanabe G, Muraoka O, Matsuda H, Satou T, Nishida S. Mangiferin enhances the sensitivity of human multiple myeloma cells to anticancer drugs through suppression of the nuclear factor κ B pathway., *Int J Oncol.*, 48, 2704-2712, 2016. 査読有. DOI:

10.3892/ijo.2016.3470.

10) Takeda T, Tsubaki M, Kino T, Yamagishi M, Iida M, Itoh T, Imano M, Tanabe G, Muraoka O, Satou T, Nishida S. Mangiferin induces apoptosis in multiple myeloma cell lines by suppressing the activation of nuclear factor kappa B-inducing kinase. *Chem Biol Interact.*, 251, 26-33, 2016. 査読有. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.018.

11) Tsubaki M, Mashimo K, Takeda T, Kino T, Fujita A, Itoh T, Imano M, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Statins inhibited the MIP-1 α expression via inhibition of Ras/ERK and Ras/Akt pathways in myeloma cells., *Biomed Pharmacother.*, 78, 23-29, 2016. 査読有. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.017.

12) Tsubaki M, Takeda T, Yoshizumi M, Ueda E, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. RANK-RANKL interactions are involved in cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cell lines., *Tumour Biol.*, 37, 9099-9110, 2016. 査読有. DOI: 10.1007/s13277-015-4761-8.

13) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Obata N, Itoh T, Imano M, Mashimo K, Fujiwara D, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Statins improve survival by inhibiting spontaneous metastasis and tumor growth in a mouse melanoma model., *Am J Cancer Res.*, 5, 3186-3197, 2015. 査読有.

14) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Itoh T, Imano M, Tanabe G, Muraoka O, Satou T, Nishida S. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and RANKL through inhibiting the activation of NF- κ B and ERK1/2., *Am J Transl Res.*, 7, 1371-1381, 2015. 査読有.

15) Tsubaki M, Takeda T, Ogawa N, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Ishizaka T, Satou T, Nishida S. Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- κ B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells., *Leuk Res.*, 39, 445-452, 2015. 査読有. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.01.016.

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 椿 正寛、武田 朋也、木野 稔己、友成 佳加、藤本 伸一郎、西田 升三. MET activation is involved with imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年 10 月 7 日パシフィコ横浜 神奈川

2) 椿 正寛、武田 朋也、木野 稔己、友成 佳加、眞下 恵次、藤原 大一郎、藤本 伸一郎、阪口 勝彦、山添 譲、西田 升三. 慢性骨髄性白血病におけるイマチニブ耐性に MET 活性化が関与する. 第 20 回日本がん分子標的治療学会. 2016 年 5 月 31 日別府国際コンベンションセンター 大分

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 升三 (NISHIDA, Shozo)

近畿大学 薬学部・教授

研究者番号 : 40208187

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

椿 正寛 (TSUBAKI, Masanobu)

近畿大学 薬学部・准教授

研究者番号 : 30434856

武田 朋也 (TAKEDA, Tomoya)

近畿大学 薬学部・助教

研究者番号 : 20734031