

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08410

研究課題名(和文) 難治性白血病の幹細胞に存在する抗アポトーシス分子を標的とする治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular targeted therapy against leukemia stem cells via inhibition of anti-apoptotic proteins

研究代表者

吉田 明 (Yoshida, Akira)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：80252005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗アポトーシス分子Bcl-2、Mcl-1は難治性白血病の幹細胞において発現が亢進していることが報告されている。これらの分子の発現量を低下させ休止期にある幹細胞を死滅させることが可能な薬剤を同定することが本研究の目的である。Bcl-2に対する特異的な阻害剤であるVenetoclaxおよびMcl-1阻害剤S63845を用いて検討した。白血病細胞をG0/G1期に誘導して検討を行ったところ、VenetoclaxおよびS63845は静止期の白血病細胞に対して殺細胞効果を発揮することが判明した。また両薬剤を併用して検討したところ相乗的な殺細胞効果が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の急性白血病患者を治癒に導くためには、幹細胞レベルで白血病細胞を死滅させることが重要であると考えられる。従来型の抗がん薬の多くのものがDNA合成阻害剤として作用するものが多く、このため休止期にある幹細胞に対しては十分な効果を発揮できないと考えられる。抗アポトーシス分子Bcl-2およびMcl-1は難治性白血病の幹細胞において発現が亢進していることが報告されている。今回、我々はBcl-2阻害剤VenetoclaxおよびMcl-1阻害剤S63845が休止期にある白血病細胞に対して殺細胞作用を発揮することを見出した。これらの知見は新規治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute leukemia is characterized by the abnormal growth of blastic cells in the bone marrow. Leukemia stem cells display relative quiescence, similar to other cancer stem cell populations. Quiescent cells are generally insensitive to conventional anticancer agents. In the present research project, we searched the novel drugs which can eliminate cytokinetically quiescent (G0/G1) leukemia cells. We examined the cytotoxic activity of Bcl-2 inhibitor Venetoclax and Mcl-1 inhibitor S63845 against leukemia cells including cytokinetically quiescent (G0/G1) cells. Both Venetoclax and S63845 efficiently killed the quiescent leukemia cells via inhibition of Bcl-2 and Mcl-1 protein function. We observed synergistic killing action on leukemia cells when these drugs were simultaneously used as combination therapy. These unique features of these drugs may be beneficial for the development of new therapeutic strategies to eliminate quiescent leukemia cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：アポトーシス Bcl-2 Mcl-1 幹細胞 白血病 静止期 Survivin

## 1. 研究開始当初の背景

成人の急性骨髄性白血病 Acute myelogenous leukemia (AML)の近年の治療成績は全体の約40%に完全な治癒が見込める一方で約60%の患者が化学療法に対して抵抗性を示して、最終的に死亡する転帰をとるのが現状である。また、骨髄異形成症候群 Myelodysplastic syndromes (MDS)から移行した白血病では、化学療法が基本的に無効であり、ほとんどの症例が死の転帰をとる。これらの難治性の白血病患者グループに対する有効な治療法を開発することは喫緊の課題である。

近年のアポトーシスの分子機構に関する研究の進歩により幾つもの重要な分子が同定された。抗アポトーシス分子 Bcl-2、Mcl-1、Survivin は、その発現が亢進すると生理的な細胞死の過程が阻害され、その結果、正常細胞を癌化に導くことが知られている。臨床的には、これらの抗アポトーシス分子が高発現している白血病症例は予後不良であり治療抵抗性を示すことが報告されている。

新規の難治性白血病に対する有効な治療法を創出する際に、大きな問題になるのが白血病性幹細胞の存在である。白血病性幹細胞の際立った特徴として、その多くが休止期にあり DNA 合成および RNA 合成を停止させている状態にある点である。従来型の抗がん薬の多くのものが、DNA 合成阻害、RNA 合成阻害をその主たる作用としており、休止期にある幹細胞に対しては十分な効果を発揮できない。そのため、難治性症例の場合、以前から存在する通常の抗がん薬による化学療法を繰り返し実施しても、白血病性幹細胞が残存して最終的には再発すると考えられる。

## 2. 研究の目的

難治性の白血病患者を治癒に導くためには、幹細胞レベルで白血病細胞を死滅させることが重要であると考えられる。抗アポトーシス分子 Survivin、Bcl-2 および Mcl-1 は難治性白血病の幹細胞において発現が亢進している。これらの分子の発現量を低下させ、細胞回転の立場からは休止期にある幹細胞を死滅させることが可能な薬剤を同定、発見することが本研究の目的である。申請者の事前検討より Heat shock protein 90 (HSP90) 阻害薬を候補の一つと考えており、HSP90 阻害薬を含む数種類の分子標的薬に焦点を当て検討を実施する。

① Mcl-1 阻害剤および Survivin 阻害剤の白血病性幹細胞に対する殺細胞効果の検討。  
Mcl-1 阻害剤として S63845、Bcl-2 阻害剤 Venetoclax、Survivin 阻害剤として YM155 が存在しているが、これらの薬剤が、どの程度、休止期 (G0/G1) にある白血病性幹細胞に対して殺細胞効果を発揮するのかに関しては、未だに報告されていない。我々は G0/G1 期に誘導した培養白血病細胞を用いて検討を実施する。

HSP90 阻害剤による白血病性幹細胞に対する殺細胞効果とメカニズムについての検討。  
我々が、事前に積み重ねてきた実験データでは、HSP90 阻害剤は興味深いことに、Mcl-1 および Survivin の両分子を分解することが可能である。特に Mcl-1 を急速に分解することができる。こういった所見を踏まえ、本研究では、HSP90 阻害剤による殺細胞効果のメカニズムについて検討を実施する。HSP90 阻害剤としては Geldanamycin および NVP-AYU922 を使用する。

本研究の独創的な点及び予想される結果と意義、新しい原理の発見についてであるが、抗アポトーシス分子 Survivin、Bcl-2 および Mcl-1 が高発現している点は、難治性白血病の幹細胞の特徴と考えられる。これらの分子は重要な治療標的と考えられるが、特筆すべき本研究の知見は、HSP90 阻害剤はこれらの分子を分解し、休止期にある幹細胞を効率的に死滅させる点である。休止期にある幹細胞に対する HSP90 阻害剤の作用を報告した論文は、我々が検索した限り存在しない。

## 3. 研究の方法

① Survivin 阻害剤、Bcl-2 阻害剤および Mcl-1 阻害剤の G0/G1 期白血病細胞に対する殺細胞効果の検討。白血病細胞株を 0.1%FBS 存在下に培養を実施して G0/G1 期 (休止期) に誘導した。この休止期の細胞に対して Survivin 阻害剤 YM155、Bcl-2 阻害剤 Venetoclax および Mcl-1 阻害剤 S63845 がどの程度、殺細胞作用を発揮するか検討を行った。

1) 休止期にある細胞に対する各薬剤による Survivin、Bcl-2、Mcl-1 蛋白の発現抑制効果について Western Blot を用いて検討した。この結果と通常培養条件下でおこなった実験結果と比較した。

2) 休止期の細胞に対して各薬剤を加え、細胞死を測定した。方法としては Flow cytometry での Annexin-V/PI assay を使用した。

HSP90 阻害剤による白血病性幹細胞に対する殺細胞効果とメカニズムについての検討。  
我々が、事前に積み重ねてきた実験データでは、HSP90 阻害剤は興味深いことに Mcl-1 および Survivin の両分子を分解することが可能である。特に Mcl-1 を急速に分解することができる。ただし上記のデータは主として通常の培養条件下での細胞を用いた結果であるので、本実験計画では休止期の幹細胞モデルで同様の検討を詳細に行った。HSP90 阻害剤としては Geldanamycin を使用した。

1) 休止期にある細胞に対して各薬剤を添加し、どの程度 Survivin および Mcl-1 蛋白の発現抑

制効果が認められるか Western Blot を用いて検討した。この結果と通常培養条件下でおこなった実験結果とを比較した。

2) 休止期の細胞に対して各薬剤を加え、細胞死を測定した。方法としては Flow cytometry での Annexin-V/PI assay を使用した。

#### 4 . 研究成果

我々は G0/G1 期に誘導した培養白血病細胞を用いて検討を実施したところ、Survivin 阻害剤 YM155、HSP90 阻害剤ゲルダナマイシン、Bcl-2 阻害剤 Venetoclax、Mcl-1 阻害剤 S63845 は、いずれも強い殺細胞効果を発揮することがわかった。その細胞死の過程で、これらの薬剤はいずれも強くミトコンドリア膜電位の低下を惹起することが判明した。Bcl-2 阻害剤 Venetoclax に対して感受性を示さない白血病細胞株も存在した。この原因として、Western Blot のデータでは、感受性を示さない細胞株では Mcl-1 蛋白の高発現が認められた。そこで、これらの細胞に対して Mcl-1 阻害剤 S63845 を添加して検討を実施したところ良好な殺細胞効果が得られた。また、Bcl-2 阻害剤 Venetoclax と Mcl-1 阻害剤 S63845 の併用療法について検討を実施したところ相乗効果が得られた。Bcl-2 阻害剤と Mcl-1 阻害剤の併用は有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ookura M, Fujii T, Yagi H, Ogawa T, Kishi S, Hosono N, Shigemi H, Yamauchi T, Ueda T, Yoshida A.	4. 巻 8(67)
2. 論文標題 YM155 exerts potent cytotoxic activity against quiescent (G0/G1) multiple myeloma and bortezomib resistant cells via inhibition of survivin and Mcl-1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 111535-111550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.22871	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 -

1. 著者名 Matsuda Y, Yamauchi T, Hosono N, Uzui K, Negoro E, Morinaga K, Nishi R, Yoshida A, Kimura S, Maekawa T, Ueda T.	4. 巻 107(7)
2. 論文標題 Combination of panobinostat with ponatinib synergistically overcomes imatinib-resistant CML cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1029-1038.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.12965.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田明
2. 発表標題 ベネトクラックスとMcl-1阻害剤の併用は多発性骨髄腫に対して優れた細胞障害効果を発揮する。
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyuki Ookura, Shinji Kishi, Takahiro Yamauchi, Takanori Ueda, Akira Yoshida
2. 発表標題 Survivin inhibitor YM155 exerts potent cytotoxicity against quiescent (G0/G1) myeloma cells.
3. 学会等名 第78回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kana Oiwa, Shinji Kishi, Rena Matsumoto, Hikaru Tsukasaki, Miyuki Ookura, Akira Yoshida, Takanori Ueda, Takahiro Yamauchi
2. 発表標題 Prediction for poor mobilization of PBSC in patients with hematological malignancy.
3. 学会等名 第78回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----