

令和元年6月6日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10019

研究課題名(和文) T細胞型急性リンパ性白血病におけるTYK2を対象とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy targeting TYK2 for T-cell acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

赤羽 弘資 (AKAHANE, KOSHI)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90377531

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)：本研究の目的は、T細胞型急性リンパ性白血病(T-ALL)細胞の生存が細胞内シグナル伝達を担うリン酸化酵素であるTYK2の活性に依存しているという知見をもとに、T-ALL細胞においてTYK2の阻害が細胞死を誘導する機序を解明し、この疾患におけるTYK2を標的とした治療法を開発・発展させることである。私達は、TYK2選択的阻害剤であるNDI-031301が複数のヒトT-ALL細胞株においてその増殖を強力に抑制し、細胞死を誘導することを確認した。また、NDI-031301による細胞死誘導の機序として、p38 MAPKの活性化が関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞型急性リンパ性白血病(T-ALL)の治療成績は近年の強化された化学療法によって大幅に改善されたが、初期治療に不応な症例や再発した症例の予後は依存として不良である。本研究の成果は、TYK2を対象とした分子標的療法がT-ALLに対する有効な治療戦略になる可能性を示している。また、本研究から、TYK2阻害によるT-ALL細胞の細胞死誘導の機序としてp38 MAPKの活性化が関与している可能性が示唆されたが、この知見はTYK2阻害剤を含めた薬剤併用療法の開発に寄与することが期待される。こうした研究の成果は、T-ALLの将来的な治療成績の向上に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Activation of the tyrosine kinase 2 (TYK2) contributes to the aberrant survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of T-ALL cell death induced by TYK2 inhibition and develop therapeutic strategies targeting TYK2 for treatment of T-ALL. We found that a novel selective inhibitor of TYK2, NDI-031301, induced robust growth inhibition and cell death in human T-ALL cell lines. Our results demonstrated that activation of p38 MAPK is involved in NDI-031301-induced cell death in T-ALL cells. These results support selective inhibition of TYK2 as a promising potential therapeutic strategy for T-ALL.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：T細胞性急性リンパ性白血病 TYK2 p38 MAPK

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞型急性リンパ性白血病 (T-ALL) の予後は、近年の強化された化学療法レジメンの導入によって大幅に改善されたが、初期治療に不応の症例や再発した症例の予後は依存として不良である。また、集中的な化学療法や造血幹細胞移植に伴う合併症の出現も大きな問題となっており、より有効でかつ毒性の少ない分子標的療法の出現が望まれている。

2012年、三田らは、T-ALL細胞の生存が JAK tyrosine kinase family の一員である TYK2 (Tyrosine kinase 2) の活性に依存していることを報告した (Sanda T et al. Cancer Discov 2013)。また、本研究の研究責任者は、分子シャペロン蛋白である HSP90 (Heat shock protein 90) の薬理的阻害が、T-ALL細胞において TYK2 の分解と細胞死 (アポトーシス) を誘導することを報告した (Akahane K et al. Leukemia 2015)。これらの知見は、TYK2 を対象とした分子標的療法が、T-ALL に対して有効な治療戦略になる可能性を示している。一方で、近年乾癬やクローン病などの炎症性疾患に対する実用化を目的として、TYK2 を選択的に阻害する薬剤の開発が進んでおり、TYK2 を標的とした分子標的治療は、近い将来に実際の臨床の場でも実践できる可能性が示唆されている。しかし、TYK2 が T-ALL 細胞の異常な生存にどのように関与するのか、TYK2 を阻害した場合にどのような機序でアポトーシスが誘導されるのかについては不明な点が多かった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、T-ALL細胞において TYK2 の阻害が細胞死 (アポトーシス) を誘導するメカニズムを解明し、この疾患における TYK2 を対象とした治療法を開発・発展させることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) TYK2 選択的阻害剤のヒト T-ALL 細胞株に対する抗腫瘍効果の検討

米国 Nimbus Therapeutics 社の新規 TYK2 選択的阻害剤である NDI-031301 のヒト T-ALL 細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。具体的には、NDI-031301 のヒト T-ALL 細胞株の細胞増殖に対する影響を Cell Titer Glo assay で解析した。また、NDI-031301 添加で誘導されるヒト T-ALL 細胞株のアポトーシスを TUNEL assay で解析した。

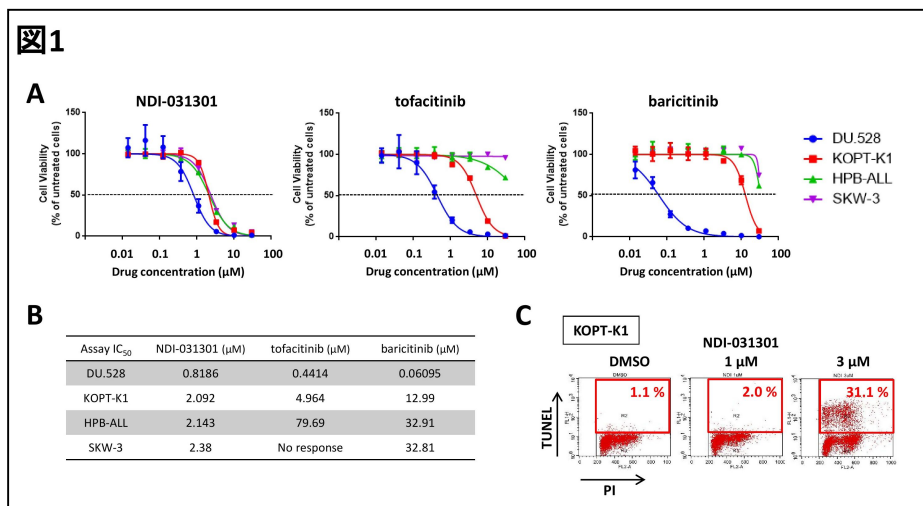
#### (2) ヒト T-ALL 細胞株における TYK2 阻害によるアポトーシス誘導の機序の解析

ヒト T-ALL 細胞株における TYK2 阻害によるアポトーシス誘導の機序を解明するために、ヒト T-ALL 細胞株に NDI-031301 を添加した後、細胞増殖・生存シグナルに関連した蛋白の発現とそのリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した。また、NDI-031301 で誘導されるシグナル伝達経路の変化とアポトーシスが TYK2 阻害以外の off-target 効果でないことを確認するために、ヒト T-ALL 細胞株を用いて干渉 RNA による TYK2 のノックダウン実験を行った。

### 4. 研究成果

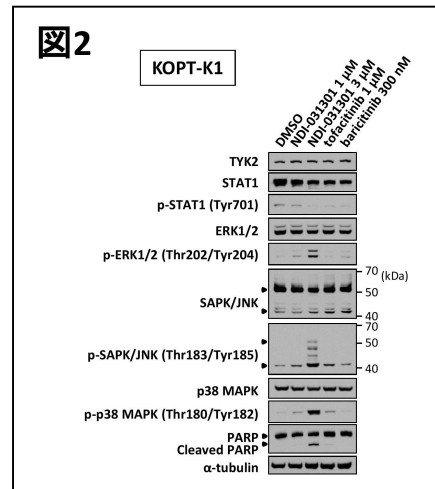
#### (1) TYK2 選択的阻害剤 NDI-031301 の抗腫瘍効果

NDI-031301 のヒト T-ALL 細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。NDI-031301 は解析したヒト T-ALL 細胞株 4 株 (DU.528、KOPT-K1、HPB-ALL、SKW-3) すべての増殖を強力に抑制し、添加 72 時間での IC<sub>50</sub> 値は 0.82 - 2.38 μM であった (図 1A, B)。この増殖抑制効果は、他の JAK 選択的阻害剤である tofacitinib や baricitinib のそれよりも強力であった (図 1A, B)。また、NDI-031301 (3 μM) は、ヒト T-ALL 細胞株の KOPT-K1 株においてアポトーシスを誘導した (図 1C)。



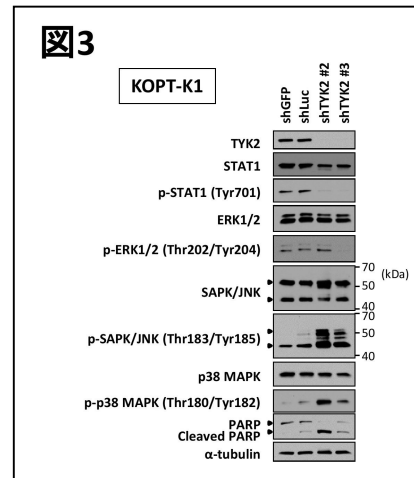
## (2) NDI-031301 がヒト T-ALL 細胞株のシグナル伝達経路に与える影響

NDI-031301 によるアポトーシス誘導の機序を解明するために、NDI-031301 がヒト T-ALL 細胞株のシグナル伝達経路に与える影響を解析した。KOPT-K1 株に 1  $\mu$ M および 3  $\mu$ M の NDI-031301、tofacitinib、baricitinib をそれぞれ添加し、24 時間後に蛋白を抽出して、細胞増殖・生存シグナルに関連した蛋白の発現とそのリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した (図 2)。その結果、3  $\mu$ M の NDI-031301 によって STAT1 のリン酸化が阻害されたが、この変化は tofacitinib と baricitinib の添加後にも認められた。アポトーシスの誘導を示唆する活性化カスパーゼによる PARP 蛋白の切断は 3  $\mu$ M の NDI-031301 添加後にのみ認められたことから、NDI-031301 によるアポトーシスの誘導にはリン酸化 STAT1 の低下以外の機序が関与すると考えられた。一方、3 つの異なった MAPK シグナルの活性化を示す ERK, SAPK/JNK および p38 MAPK のリン酸化レベルの上昇が 3  $\mu$ M の NDI-031301 添加後にのみ特異的に確認された。



## (3) TYK2 のノックダウンがヒト T-ALL 細胞株のシグナル伝達経路に与える影響

(2) で示された NDI-031301 添加後のシグナル伝達経路の変化が TYK2 阻害以外の off-target 効果でないことを確認するために、KOPT-K1 株を用いて干渉 RNA による TYK2 のノックダウンを行い、シグナル伝達経路の蛋白発現とそのリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した (図 3)。その結果、TYK2 を干渉 RNA でノックダウンした細胞 (shTYK2 #2 と shTYK2 #3) では、3  $\mu$ M の NDI-031301 の添加後と同様に、STAT1 のリン酸化が阻害されただけでなく、SAPK/JNK および p38 MAPK のリン酸化レベルの著明な上昇が確認された。これらの結果から、NDI-031301 による TYK2 の薬理的阻害は、STAT1 のリン酸化を抑制するだけでなく、MAPK シグナル伝達経路の活性化を誘導することが明らかになった。

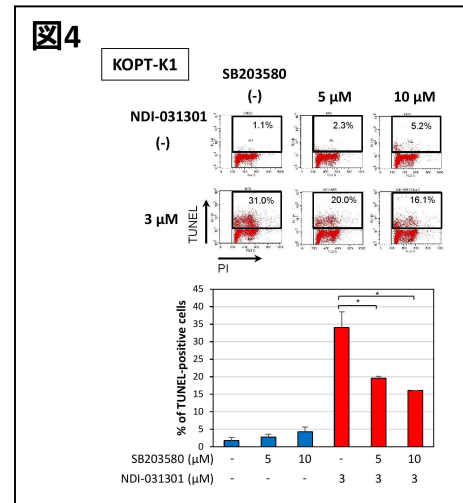


## (4) NDI-031301 が T-ALL 細胞株のシグナル伝達経路に与える影響の経時的検討

NDI-031301 で誘導されるシグナル伝達経路の変化とアポトーシスの時間的關係を確認するために、KOPT-K1 株に 3  $\mu$ M の NDI-031301 を添加して、シグナル伝達経路のリン酸化状態とアポトーシスの誘導をウェスタンブロットで経時的に検討した。その結果、p38 MAPK のリン酸化レベルの上昇は NDI-031301 添加 1 時間後から、SAPK/JNK のリン酸化レベルの上昇は 8 時間後から確認され、いずれもその後は高レベルで維持されたのに対し、アポトーシス誘導を示唆する PARP 蛋白の切断は NDI-031301 添加 12 時間後から検出され始めた。このように、NDI-031301 で誘導される MAPK シグナルの活性化はアポトーシスの誘導に先立つことが確認された。

#### (5) NDI-031301 誘導性アポトーシスにおける MAPK シグナル活性化の関与

NDI-031301 で誘導される T-ALL 細胞のアポトーシスに MAPK シグナルの活性化が関与する可能性を検討した。図 4 に示すように、3  $\mu$ M の NDI-031301 で誘導される KOPT-K1 株の TUNEL 陽性アポトーシスの割合は p38 MAPK の選択的阻害剤である SB203580 の共添加で部分的に抑制された。この救済効果は MEK 阻害剤 ( trametinib ) や SAPK/JNK 阻害剤 ( SP600125 ) の共添加では認められなかった。この結果から、NDI-031301 で誘導されるヒト T-ALL 細胞株のアポトーシスには p38 MAPK の活性化が関与している可能性が示唆された。



#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Anti-leukemic activity of the TYK2 selective inhibitor NDI-031301 in T-cell acute lymphoblastic leukemia

Akahane K, Li Z, Etchin J, Berezovskaya A, Gjini E, Masse CE, Miao W, Rocnik J, Kapeller R, Greenwood JR, Tiv H, Sanda T, Weinstock DM and Look AT

Br J Haematol 177(2): 271-282, 2017

DOI: [10.1111/bjh.14563](https://doi.org/10.1111/bjh.14563)

査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

第 78 回日本血液学会、平成 28 年 10 月、横浜

“ Activity of the TYK2 selective inhibitor NDI-031301 in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia ”

Koshi Akahane, Julia Etchin, Zhaodong Li, Alla Berezovskaya, Craig E. Masse, Wenyan Miao, Jennifer Rocnik, Rosana Kapeller, Takaomi Sanda, David M. Weinstock and A. Thomas Look

58<sup>th</sup> ASH、平成 28 年 12 月、San Diego

“ Anti-leukemic Activity of the TYK2 selective inhibitor NDI-031301 in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia ”

Koshi Akahane, Zhaodong Li, Julia Etchin, Alla Berezovskaya, Evisa Gjini, Craig E. Masse, Wenyan Miao, Jennifer Rocnik, Rosana Kapeller, Jeremy R. Greenwood, Hong Tiv, Takaomi Sanda, David M. Weinstock and A. Thomas Look

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。