

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602
 研究種目：若手研究
 研究期間：2019～2020
 課題番号：19K17852
 研究課題名(和文) 難治性白血病の活性化チロシンキナーゼ特異的ユビキチンプロテアソーム系と耐性化

 研究課題名(英文) Specific ubiquitination and degradation through the proteasome system and development of the therapy resistance induced by mutated tyrosine kinase FLT3-ITD in AML

 研究代表者
 野上 彩子 (Nogami, Ayako)

 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

 研究者番号：30754890
 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)：FLT3-ITD陽性急性骨髄性白血病(AML)で、プロテアソーム阻害薬はREDD1の発現亢進によりmTORC1経路を抑制し、STAT5およびPimの抑制によりMcl-1を介してアポトーシスを誘導した。さらに、脱ユビキチン化酵素阻害薬によるUSP9Xの抑制により、活性化型FLT3はK63を介したポリユビキチン化を受けてaggresomeへ移行し、下流のシグナル阻害、p38・JNK活性化、およびDNA損傷シグナル活性化が生じた。また、FLT3-ITD変異によりRSK1が活性化し、mTORC1とeIF4Bを強調、BADとBIMを抑制する事で治療抵抗性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性のAMLの発症と進展に関わる恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体を標的とした阻害薬は、治療抵抗性や耐性化が問題となる。特に、FLT3-ITD変異は全AMLの約30%を占め、標準的な治療には抵抗性かつ同種骨髄幹細胞移植を施しても予後不良であるが、他に手段が無く新たな治療戦略が待ち望まれる。本研究により解明した事実は、普遍的なタンパク分解機構を介した腫瘍の増殖機構という点では他分野にも外挿可能である点で学術的意義は高く、かつ、既存の化合物を用いた患者検体による評価により結論を導いており、治療戦略の実臨床への応用可能性が高い点で社会的に意義深い。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examine the responses of FLT3-ITD-transformed cells to proteasome inhibitors and the molecular mechanisms underlying the responses. The results obtained shed light on mechanisms involved in apoptosis induced by bortezomib in FLT3-ITD-positive AML cells and suggest that the STAT5/Pim pathway and the downstream mTORC1/Mcl-1 pathway would provide promising targets to enhance the effectiveness of therapies with proteasome inhibitors against this type of AML with poor prognosis. We also demonstrate that USP9x physically associates with FLT3-ITD and its inhibition leads to their downregulation by increasing K63-linked polyubiquitination and causing the aggresomal translocation to induce apoptosis efficiently in cells transformed by the mutants. It was further indicated that inhibition of USP9x may efficiently activate the mitochondrial apoptotic pathway cooperatively by inducing oxidative stress responses in addition to inhibition of FLT3-ITD signaling.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：FLT3 AML ITD proteasome REDD1 DUB Rsk

1. 研究開始当初の背景

難治性の造血器腫瘍の急性骨髄性白血病(AML)や急性リンパ性白血病(ALL)およびその前病変とも言うべき骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症と進展には、共通して見られるFMS-like tyrosinekinase 3 (FLT3)- internal tandem duplication (ITD), -point mutation within TKD2(TKD), JAK2V617FおよびBCR/ABL等の恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体による増殖シグナルの異常活性化が主要な役割を果たす。これらを標的としたチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)は画期的な臨床効果をもたらしたが、疾患により、治療抵抗性(自然耐性)や新たな変異による耐性化(獲得耐性)が問題となっている。特に、FLT3-ITDについては、AML全体の約30%を占める変異であるが、標準的な抗がん剤治療には抵抗性で、根本治療である同種骨髄幹細胞移植を施しても予後不良である。臨床現場ではやむなく標準的な抗がん剤治療や移植治療を施す他に手段が無い状況が続いており、新たな治療戦略が待ち望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性FLT3-ITD変異陽性急性骨髄性白血病(AML)の耐性化に特異的UPS系が関与することと、その制御により本疾患が克服可能であることを検証し、臨床試験に向けた基礎データを得ることである。

3. 研究の方法

本研究は、腫瘍細胞がタンパク分解系による制御により過剰なタンパク産生に順応し、シグナル伝達系をも調節する機構を明らかにする新規のアプローチである。

(1) 分子標的治療薬存在下でのFLT3-ITDの分解制御機構の解明(FLT3-ITDの分解機構の検討。

(2) ユビキチン化の検討: FLT3-ITD陽性細胞でPIやDUBi存在下での、FLT3-ITDのユビキチン化量の増減とアポトーシス誘導作用の相関を示す。

モデル動物での薬効確認とバイオマーカーの測定

4. 研究成果

申請者はこれまで、この治療抵抗性が活性化 STAT5, Pim-1 や、FLT3 の分解過程によることを解明し報告した。即ち、タンパク分解系であるユビキチンプロテオソーム系(UPS)が REDD1 を介して、生存シグナルを調節することを証明し、プロテオソーム阻害薬に対する ITD 陽性細胞の治療抵抗性においても、既報(で証明した STAT5 が、Pim kinase を介して Mcl-1 を維持するという機構が働くことを見出した(*Transl Oncol.* 12(2):336-349, 2019)。

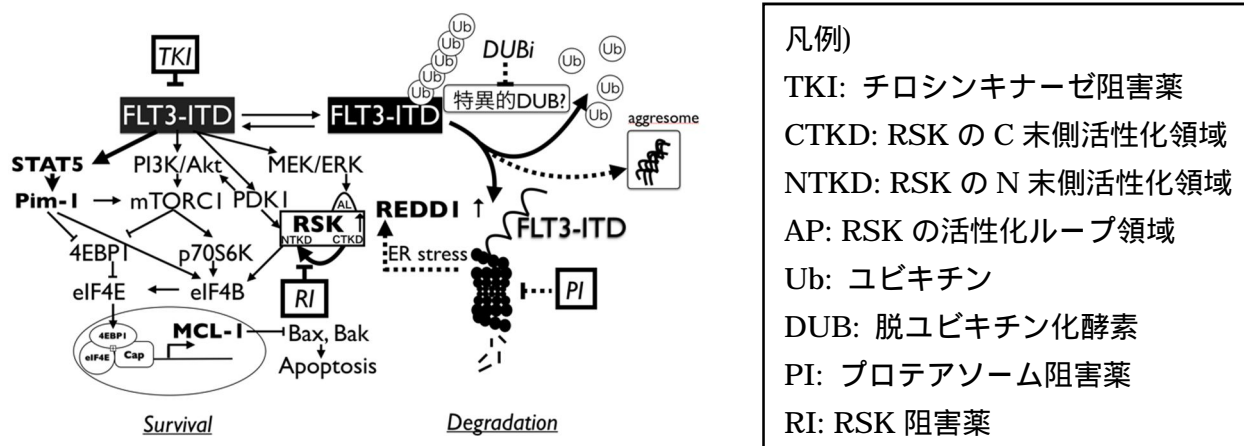


図 1 治療抵抗性克服のストラテジー (太字はこれまで解明した箇所)

また、研究室内では脱ユビキチン化酵素を阻害すると酸化ストレスを介して白血病細胞がアポトーシスするという基礎検討結果があった。脱ユビキチン化酵素に関する研究では、USP9X の阻害により、ITD で形質転換した MV4-11 や初代培養 AML 細胞でより優先的にアポトーシスを誘導した。阻害剤は変異キナーゼのアグリソームへの移行を誘導し、下流のイベントを、特に活性化された状態の ITD や自己リン酸化フォームにおいて阻害し、USP9X のノックダウンにより増悪した。さらに USP9X は、物理的に ITD と作用して、その K63 介在のポリユビキチン化を阻害し、さらに酸化ストレスを誘発して、ストレス関連の MAP キナーゼ経路と DNA 損傷を引き起こした、ITD シグナルの阻害と協調して相乗的に増強された内因性ミトコンドリア経路の活性化に反応して生じた(*Cancer Lett.* 2019; 453:84)。

これらの研究過程で、JAK2V617F および BCR/ABL 等の恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体との比較実験において、ITD 陽性 AML 細胞特異的に働く未報告の治療抵抗性因子として RSK を見出した。その活性化機構において疾患特異的な治療抵抗性を解明する鍵とも言える PDK1 の関与を示唆するデータを得た。即ち ITD 陽性 AML を、ドライバー変異の抑制のみでの制御を困難にしている機構と考えられ、本研究ではその詳細を明らかにした(*Cancers.* 2019 Nov 20;11(12).1827)。

RSK 阻害薬あるいはノックアウト細胞を用いた検討(図 2)では、RSK は疾患特異的に増殖を制御しており、ITD 陽性 AML 細胞の増殖と生存を司る鍵と思われた。

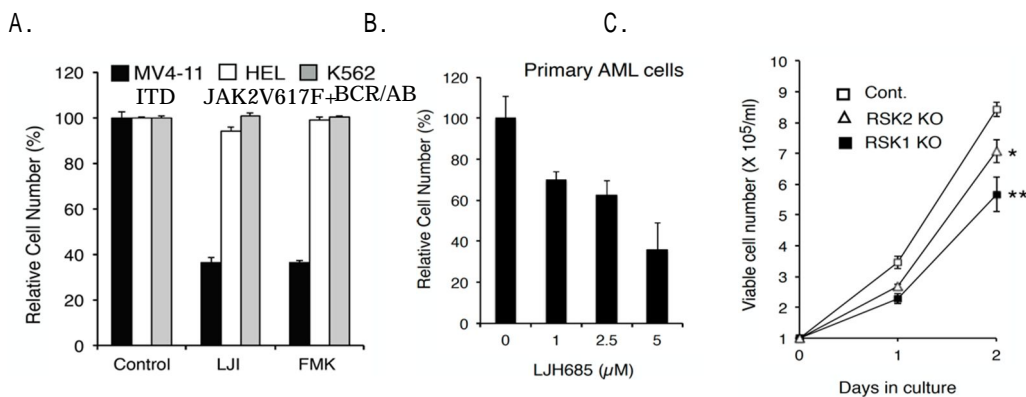
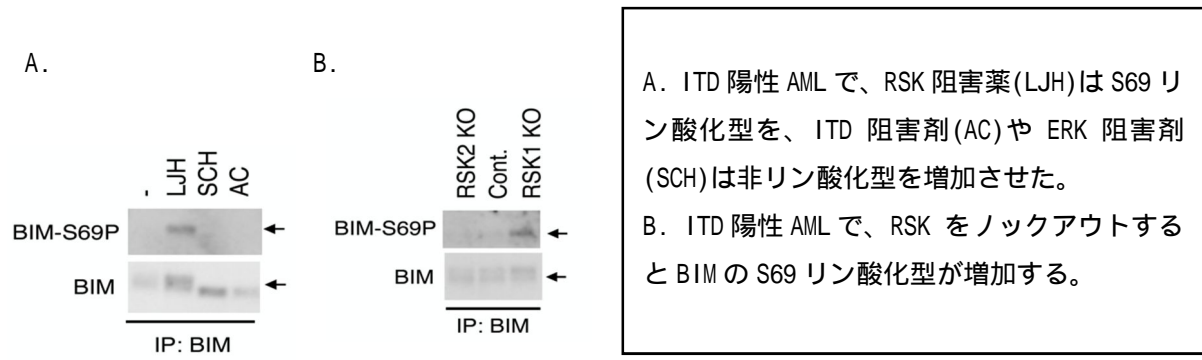


図 2 AML 細胞における RSK 阻害薬と RSK1/2 ノックアウト(KO)の増殖抑制効果)

- A. RSK阻害薬(LJI, FMK)はITD陽性AML細胞(MV4-11)特異的に増殖抑制作用を示す
- B. ITD陽性AML患者検体においてRSK阻害薬(LJH685)は増殖抑制効果を示す
- C. RSK1/2のノックアウト(KO)によりITD陽性AML細胞の増殖は抑制される

ITD 陽性 AML において、RSK による治療抵抗性機構の存在を証明する。AML 細胞での apoptosis 誘導、実行分子として BIM の介在を実証した(図 3)。



- A. ITD 陽性 AML で、RSK 阻害薬(LJH)は S69 リン酸化型を、ITD 阻害剤(AC)や ERK 阻害剤(SCH)は非リン酸化型を増加させた。
- B. ITD 陽性 AML で、RSK をノックアウトすると BIM の S69 リン酸化型が増加する。

図 3 ITD 陽性 AML 細胞での apoptosis 誘導、実行分子として BIM の介在

さらに、PDK1 を中心とした RSK 活性調節機構の解明として RSK 1 の活性化機構において PDK1 の関与を示唆するデータを得た (図 4)。

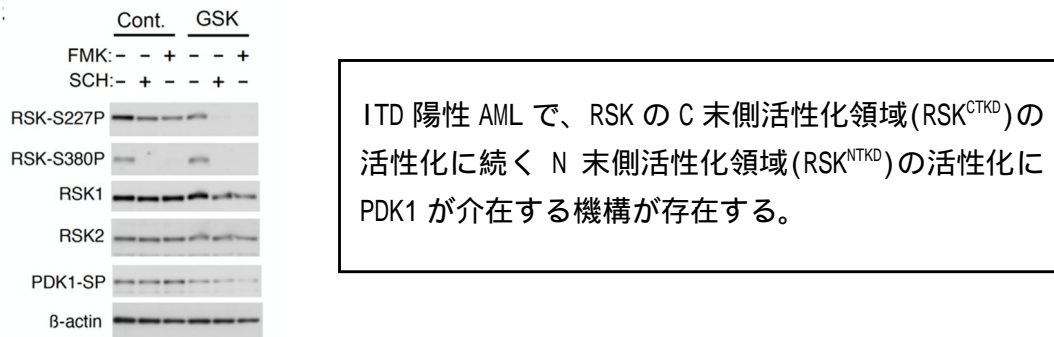


図 4 ITD 陽性 AML 細胞における RSK 活性化に対する PDK1 阻害薬 (GSK) の効果

以上よりこれまで、FLT3-ITD 変異陽性 AML の治療抵抗性機構において STAT5 が主たる生存シグナルを強固に活性化させる事を証明し、その実行分子 PIM1 を特定したが、本研究ではさらに、Ser/Thr キナーゼである RSK1/2 による調節機構を解明した。驚くべきことに、RSK1/2 は、別個に検討していた前述の PIM と協調して翻訳を制御していた。結果的に、RSK1 はその阻害により、近年臨床応用が開始された BH3 類似物 (Venetoclax) への感受性を高める極めて実用的な標的であることを示した。

以上より、ITD 変異の UPS 系への関与を検討するべく開始した本研究は、当初の計画を上回る成果を得て、さらなる治療抵抗性の分子基盤 PDK1 の検討へと計画を展開する運びとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nogami Ayako, Okada Keigo, Ishida Shinya, Akiyama Hiroki, Umezawa Yoshihiro, Miura Osamu | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Inhibition of the STAT5/Pim Kinase Axis Enhances Cytotoxic Effects of Proteasome Inhibitors on FLT3-ITD ⁺ Positive AML Cells by Cooperatively Inhibiting the mTORC1/4EBP1/S6K/Mcl-1 Pathway | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Translational Oncology | 6. 最初と最後の頁 336 ~ 349 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.11.001 | 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 Akiyama Hiroki, Umezawa Yoshihiro, Ishida Shinya, Okada Keigo, Nogami Ayako, Miura Osamu | 4. 巻 453 |
| 2. 論文標題 Inhibition of USP9X induces apoptosis in FLT3-ITD-positive AML cells cooperatively by inhibiting the mutant kinase through aggresomal translocation and inducing oxidative stress | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Letters | 6. 最初と最後の頁 84 ~ 94 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.03.046 | 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 Watanabe Daisuke, Nogami Ayako, Okada Keigo, Akiyama Hiroki, Umezawa Yoshihiro, Miura Osamu | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 1827-1851 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11121827. | 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 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ayako Nogami, Daisuke Watanabe, Keigo Okada, Hiroki Akiyama, Yoshihiro Umezawa, Toshikage Nagao, Shuji Tohda and Osamu Miura |
| 2. 発表標題 FLT3-ITD Enhances Proliferation and Survival of AML Cells through Activation of RSK1 to Upregulate the mTORC1/eIF4F Pathway Cooperatively with PIM or PI3K and to Inhibit Bad and Bim |
| 3. 学会等名 60th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡邊 大介、野上 彩子、岡田 啓五、秋山 弘樹、梅澤 佳央、長尾 俊景、三浦 修。 |
| 2. 発表標題 FLT3-ITDはRSK1を活性化し，mTORC1とeIF4Bを強調，BADとBIMを抑制する |
| 3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
| | |