

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08719

研究課題名(和文) 急性骨髄性白血病の変異FLT3のオルガネラシグナルとその理解に基づく治療戦略構築

研究課題名(英文) Understanding the organelle signaling of mutant FLT3 in Acute Myeloid Leukemia (AML) to develop novel therapeutic tactics

研究代表者

安部 良 (Abe, Ryo)

帝京大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：20159453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) の約30%のケースで認められるFLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) の恒常的活性化変異体の局在異常と増殖シグナルの発信の関係について明らかにすることを目的としている。本課題では、AMLのFLT3変異体が、ゴルジ領域に特徴的な局在を示すこと、その停留の原因は、自身のキナーゼ活性であることを見出した。さらに、FLT3は、新規合成後の初期分泌の過程で、下流分子を活性化することを明らかにした。今後、本メカニズムの理解に基づいた治療薬の概念実証研究等の波及的展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMLのFLT3変異体の細胞内局在については、野生型と異なることは報告されていたが、詳細な位置はブラックボックスに包まれていた。本研究で、複数のAML細胞株で、FLT3変異体がゴルジ領域に局在することを示したことで、長らくの課題を解決できたものと考えられる。さらに、その局在と増殖シグナル発信がカップルしていることから、局在制御によるチロシンリン酸化シグナルの新規阻害戦略の開発が期待される。また、FLT3をターゲットとした既存分子標的薬が投与されている際のFLT3の細胞膜レベルの亢進も確認されたことから、それを応用した抗体医薬品とのコンビネーション治療も示唆された。

研究成果の概要(英文)：FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) in hematopoietic cells binds to its ligand at the plasma membrane (PM), then transduces proliferative signals. FLT3 gene alterations that lead the kinase to assume its permanently active form, such as internal tandem duplication (ITD), are found in 30% of acute myelogenous leukemia (AML) patients. Several groups have reported that compared with wild-type FLT3 (FLT3-wt), FLT3-ITD is retained in organelles, resulting in low levels of PM localization of the receptor. However, the precise localization of FLT3-ITD remains unclear. In cell lines established from AML patients, endogenous FLT3-ITD accumulates in the Golgi region. FLT3-ITD biosynthetically traffics to the Golgi and remains there in a manner dependent on its kinase activity. FLT3-ITD activates downstream in the endoplasmic reticulum and the Golgi area during its biosynthetic trafficking. We provide evidence that FLT3-ITD signals from the early secretory compartments in AML cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：急性骨髄性白血病 FLT3変異 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

FLT3 (Fms-Like Tyrosine kinase 3) は、KIT/PDGFR/FMS が属する III 型受容体チロシンキナーゼのメンバーであり、細胞膜でリガンドと結合して活性化し、骨髄前駆細胞の分化・増殖において重要な役割を果たす。一方、FLT3 の恒常的活性化変異 (Internal Tandem Duplication (ITD); D835Y 等) は、ホスト細胞を無限増殖に導き、急性骨髄性白血病 (Acute Myelogenous Leukemia: AML) の病勢進行の大きな原因の一つである。日本では、一年間に 3000 4000 人が AML を発症し、その 40% 程度の症例で FLT3 の恒常的活性化変異が認められ、それらは予後不良因子として知られている。そのため、近年、キザルチニブやギルテリチニブといった FLT3 阻害剤が開発・承認されている。これらの FLT3 活性化変異体を標的とした分子標的薬は、既存の化学療法に比較し、有意に AML 患者の全生存率 (Overall Survival: OS) を延長することが確認されたが (既存の化学療法, OS=4.2 カ月; キザルチニブ投与, OS=6.7 カ月, QuANTUM-R 試験)、いまだその効果は十分ではなく、改良の余地が残されている。また、そもそも「FLT3 変異体が AML 細胞内でいつ・どこで・何を活性化し、増殖シグナルを発信しているか」、「変異体のタイプにより局在・シグナルは異なるのか」は、ブラックボックスに包まれている。

2. 研究の目的

本研究は、AML の 30 40% の症例で認められる「FLT3 チロシンキナーゼの活性化変異体」の異常な細胞内局在と無限増殖シグナルの分子機構を解明し、その理解に基づいた新規治療法を開発することを目的としている。本研究代表者は、KIT キナーゼの活性化変異体が、マスト細胞腫・白血病においてはエンドソーム系に、消化管間質腫瘍ではゴルジ領域に停留し、オルガネラからシグナル伝達することを報告し、これまで細胞膜において起こると考えられていた「がんにおけるレセプターキナーゼ変異体の増殖シグナル」が、細胞内小器官から発せられることを見出した。これらの報告は、「AML の FLT3 変異体も異常局在し、そこからシグナルを発信するのか」、「FLT3 の細胞内移動のコントロールは新たな治療戦略となるか」、「異常局在の分子機構の解明」等の重要な疑問と課題を生じさせた。そこで、本研究では、患者由来の AML 細胞株を用いて、(a) 変異 FLT3 の局在・リン酸化のイメージング、(b) 動物実験に用いることができる細胞内輸送ブロッカーの AML 治療薬としての検討、(c) 複数阻害剤による FLT3 の異常局在の原因分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

ヒト FLT3 変異細胞株として、MOLM-14 (AML, $FLT3^{WT/ITD}$), MV4-11 (AML, $FLT3^{ITD/ITD}$), MV4-11 (AML, $FLT3^{ITD/ITD}$), FLT3 野生型細胞として THP1 (急性単球性白血病), RS4-11 (急性リンパ球性白血病) を用いた。細胞内局在の解析のために、パラホルムアルデヒド固定細胞を抗 FLT3 抗体およびオルガネラマーカー (小胞体, ゴルジ体, エンドソーム, リソソーム等をラベル) で共免疫蛍光染色し、共焦点レーザー

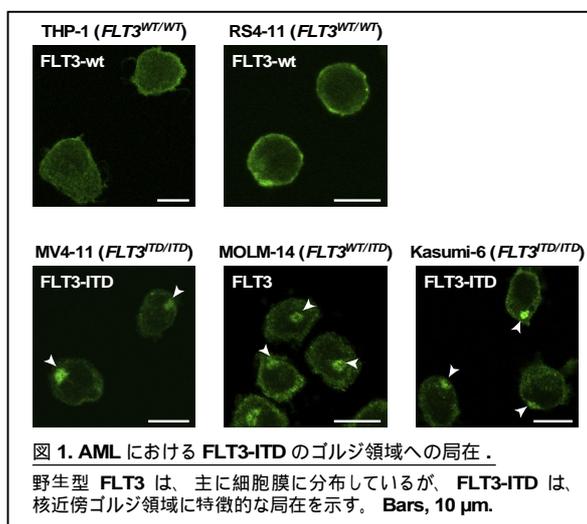


図 1. AML における FLT3-ITD のゴルジ領域への局在。
野生型 FLT3 は、主に細胞膜に分布しているが、FLT3-ITD は、核近傍ゴルジ領域に特徴的な局在を示す。Bars, 10 μ m.

顕微鏡を用いた測定によりデータ取得した。細胞内シグナル伝達の解析には、FLT3 チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI: キザルチニブ, ギルテリチニブ, ミドスタウリン, レスタ

ウルチニブ) や種々の細胞内輸送ブロッカー (プレフェルジン A (BFA), M-COPA, モネンシン等) を処理した細胞由来のライセートに対し、抗リン酸化抗体等によるイムノブロットをおこなった。

4. 研究成果

(1) FLT3-ITD のゴルジ領域への局在と、初期分泌プロセスでの増殖シグナル発信

はじめに、AML 細胞における FLT3 の細胞内局在を解析した。MOLM-14, MV4-11, Kasumi-6 の FLT3-ITD の局在を調べたところ、非常に特徴的な核近傍への集積が認められた (図 1)。この局在は、野生型 FLT3 を発現している白血病細胞である THP-1, RS4-11 では認められず、変異 FLT3 に特異的な局在である。共染色により、FLT3-ITD が停留する核近傍領域は、小胞体でもリソソームでもなく、ゴルジマーカと近い位置であることが明らかになった。興味深いことに、キザルチニブ、ミドスタウリン、レスタウルチニブ等の FLT3 TKI を処理すると、FLT3-ITD のゴルジ局在は有意に減少した (図 2)。すなわち、FLT3-ITD は、自身のチロシンキナーゼ活性に依存してゴルジ領域に停留することが示唆される。さらに、TKI 処理時に、FLT3 の細胞膜レベルが増加したことから、FLT3 活性は、自身のゴルジ領域から細胞膜への輸送を阻害していることが明らかになった。

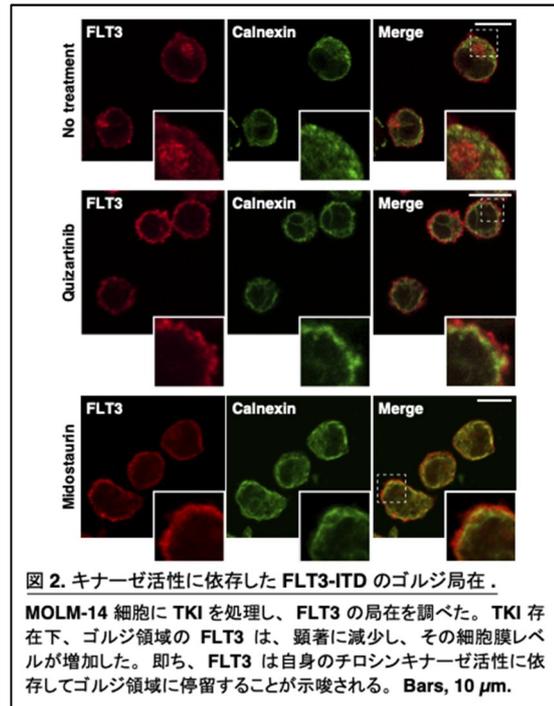


図 2. キナーゼ活性に依存した FLT3-ITD のゴルジ局在。MOLM-14 細胞に TKI を処理し、FLT3 の局在を調べた。TKI 存在下、ゴルジ領域の FLT3 は、顕著に減少し、その細胞膜レベルが増加した。即ち、FLT3 は自身のチロシンキナーゼ活性に依存してゴルジ領域に停留することが示唆される。Bars, 10 μ m.

次に、FLT3-ITD 依存的な ERK, AKT, STAT5 活性化が、ゴルジ領域で起きているかどうかを調べた。ゴルジ体からの排出を抑制するモネンシンを処理した際、いずれの分子の活性化も残存した。即ち、FLT3-ITD は、新規合成後、細胞膜に至る前に、それら下流分子を活性化することが示唆された。

(2) FLT3-ITD の細胞内移動のコントロールを介した新規チロシンリン酸化シグナル阻害戦略の構築

小胞体 ゴルジ体の輸送をブロックするとされている BFA や M-COPA が、AML 細胞の FLT3-ITD の増殖シグナル発信を抑制するかどうかを調べた。免疫蛍光染色により、これらブロッカー処理が、AML 細胞の FLT3-ITD の小胞体停留を引き起こすことを確認した後、FLT3 およびその下流の AKT, ERK, STAT5 のリン酸化を調べたところ、FLT3-ITD の自己リン酸化の減少に伴い、ERK, AKT の活性化が顕著に抑制された (図 3)。一方、STAT5 の活性化は抑制されなかった。ゴルジ排出阻害剤 (モネンシン) を処理した際、AKT, ERK の活性化は、維持された。すなわち、AML の FLT3-ITD は、ゴルジ領域で AKT, ERK を、小胞体で STAT5 を活性化していることが強く示唆された (Yamawaki et al., 2021, *Sci. Rep.*)。本成果を、輸送ブロックを機序とした AML 治療薬の開発の一助としたい。

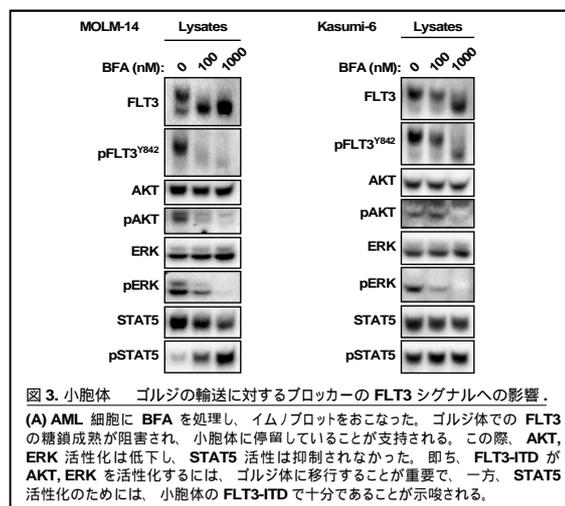


図 3. 小胞体 ゴルジの輸送に対するブロッカーの FLT3 シグナルへの影響。(A) AML 細胞に BFA を処理し、イムノブロットをおこなった。ゴルジ体での FLT3 の糖鎖成熟が阻害され、小胞体に停留していることが支持される。この際、AKT, ERK 活性化は低下し、STAT5 活性は抑制されなかった。即ち、FLT3-ITD が AKT, ERK を活性化するには、ゴルジ体に移行することが重要で、一方、STAT5 活性化のためには、小胞体の FLT3-ITD で十分であることが示唆される。

(3) FLT3-ITD の局在異常の原因となる分子メカニズムの解析

FLT3-ITD のゴルジ停留の原因となる分子メカニズムを明らかにするために、幾つかの化合物 (イン

ヒビターまたはアクチベーター)の中から、局在異常を解除するものを探索し、候補化合物の絞り込みをおこなった。今後、それら候補化合物のターゲットタンパク質について、イメージングによる細胞内局在解析, RNAi による機能喪失実験, 共免疫沈降・プルダウンによる相互作用解析をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamawaki K, Shiina I, Murata T, Tateyama S, Maekawa Y, Niwa M, Shimonaka M, Okamoto K, Suzuki T, Nishida T, Abe R, Obata Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 FLT3-ITD transduces autonomous growth signals during its biosynthetic trafficking in acute myelogenous leukemia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02221-2.	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 該当する

1. 著者名 Yamawaki Kouhei, Shiina Isamu, Murata Takatsugu, Tateyama Satoru, Maekawa Yutarou, Niwa Mariko, Shimonaka Motoyuki, Okamoto Koji, Suzuki Toshihiro, Nishida Toshiro, Abe Ryo, Obata Yuuki	4. 巻 -
2. 論文標題 FLT3-ITD transduces autonomous growth signals during its biosynthetic trafficking in acute myelogenous leukemia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.01.01.424454	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obata Yuuki, Kurokawa Kazuo, Tojima Takuro, Natsume Miyuki, Shiina Isamu, Takahashi Tsuyoshi, Abe Ryo, Nakano Akihiko, Nishida Toshiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Golgi retention and oncogenic KIT signaling via PLC 2-PKD2-PI4KIII activation in GIST cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.12.19.520889	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小幡 裕希 (Obata Yuki) (20609408)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長 (82606)	
研究分担者	鈴木 利宙 (Suzuki Toshihiro) (50530135)	帝京大学・医学部・助教 (32643)	

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