

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591198

研究課題名（和文）FLT3分子の糖鎖修飾と細胞内局在に基づく標的阻害効果増強法の検討

研究課題名（英文）Increase of the target inhibition effects on FLT3 based on the glycosylation and cellular localization status

研究代表者

清井 仁 (KIYOI HITOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90314004

研究成果の概要（和文）：FLT3分子の糖鎖修飾機構の阻害により、正常FLT3分子の細胞表面発現量は著明に低下し、STAT分子の活性化抑制と高度の細胞死誘導が認められた。一方、変異FLT3発現細胞においては、その細胞死誘導効果は軽度であった。正常FLT3分子においては、糖鎖修飾が細胞内外からのFL刺激に対しての自己リン酸化に重要であること、変異FLT3分子においては、糖鎖修飾を受ける前にすでに細胞内で自己リン酸化しており、STAT分子のリン酸化を介して細胞増殖に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified that the inhibition of glycosylation machinery reduced the cell surface expression of wild type FLT3 and induced cell death through the inhibition of activated STATs in wild type FLT3-expressing cells, but not in mutant FLT3-expressing cells. We demonstrated that the glycosylation is essential for auto-phosphorylation via FL-stimulation in wild type FLT3, and that mutant FLT3 is auto-phosphorylated within the cytoplasm before the glycosylation resulting in the cell proliferation via STATs phosphorylations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：血液・腫瘍内科学

科研費の分科・細目：医歯薬学・血液内科学

キーワード：FLT3・チロシンキナーゼ・糖鎖修飾・阻害剤・細胞内局在・併用療法・白血病

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼであるFLT3の活性化型遺伝子変異はAMLの約30%と一部のALLに認められる予後不良因子であるとともに、白血病の発症・進展の分子機構に関与していることから、変異FLT3分子は有力な治療標的分子と認識され、キナーゼ活性阻害化合物や特異抗体の開発が進められている。今後、FLT3キナーゼの恒常的活性化を示す

白血病に対しては標的治療薬を含む治療戦略の立案が必要であるが、優れた治療効果を得るためには、標的効果の予測のみならず、標的方法の選択（キナーゼ阻害剤または抗体）においても有用な分子マーカーの確立が不可欠であり、白血病細胞内でのFLT3分子の詳細な活性化機構の解明が必要である。更に、活性化FLT3に対する標的効果を高める上で、キナーゼ阻害剤と抗体との併用療法の

可能性や、FLT3 分子の活性化に関わる分子群に対する標的治療薬との併用についても検討が必要である。我々は、細胞内局在と糖鎖修飾機構が変異 FLT3 分子の活性化に関与していること、FLT3 キナーゼ阻害剤は細胞質内に存在する糖鎖修飾を受けていない変異 FLT3 分子をより高感度に阻害することを見いだした。この結果は、正常 FLT3 分子を発現する造血前駆細胞への影響を軽減できる利点がある反面、細胞表面に発現している変異 FLT3 分子からの活性化シグナルを充分抑制できないことで白血病細胞の残存を招来する可能性も危惧され、抗体療法との併用や糖鎖修飾機構の阻害などによって治療効果の増強を図ることが必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、正常及び変異 FLT3 分子が小胞体 (ER) からゴルジネットワーク (GN) を経て糖鎖修飾を受け、細胞表面へ発現される分子機構の相違と、その結果生じている変異 FLT3 分子の細胞内局在部位の同定をリン酸化状態と活性化シグナル伝達機構との関連性を考慮する中で明らかにし、糖鎖修飾、細胞内局在の相違に基づき、変異 FLT3 分子に対するキナーゼ阻害剤の標的効果を増強する併用療法のコンセプトを確立することを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

- (1) 正常及び変異 FLT3 (FLT3/ITD および FLT3/KDM) 分子ならびに細胞外領域欠失変異 FLT3 分子発現細胞株を樹立する。
- (2) 膜結合型 FL 発現 Cos7 細胞を樹立する。
- (3) 可溶性 FL 存在下および FL 発現 Cos7 細胞との共培養下で FLT3 阻害剤による正常ならびに変異 FLT3 発現細胞の増殖抑制効果を比較検討する。
- (4) 上記検討下における FLT3 下流シグナル伝達分子の活性化状態の相違をウェスタンブロットで比較検討する。
- (5) 正常及び変異 FLT3 (FLT3/ITD および FLT3/KDM) 分子ならびに細胞外領域欠失変異 FLT3 分子発現細胞株における糖鎖修飾阻害剤添加時の膜表面発現 FLT3 分子量の変化、細胞増殖阻害効果、FLT3 阻害剤添加による FLT3 分子の脱リン酸化効果に及ぼす影響、FLT3 下流のシグナル伝達分子の活性化抑制効果に及ぼす影響について比較検討する。
- (6) 正常及び変異 NPM1、IDH2 と FLT3 発現 32D 細胞を樹立し、FLT3 阻害剤による増殖抑制効果につき評価する。

4. 研究成果

- (1) 正常及び変異 FLT3 分子を細胞内で区別するために、それぞれの C 末端に MYC または FLAG タグを付加した発現ベクターを構築し、

正常 FLT3、変異 FLT3 分子単独および正常・変異 FLT3 分子共発現 32D 細胞を樹立した。更に細胞外領域を欠失させた変異 FLT3 分子単独および、正常 FLT3 分子と細胞外領域欠失変異 FLT3 分子の共発現 32D 細胞を樹立した。

(2) 骨髄ニッチにおける細胞外からの持続的なリガンド (FL) 刺激による影響を評価するために、膜結合型 FL 発現 Cos7 細胞を樹立した。

(3) 可溶性の FL 存在下では、正常および変異 FLT3 共発現細胞に対する FLT3 阻害剤による増殖抑制効果は減弱されるが、膜結合型 FL 発現 Cos7 細胞上での共培養系では、この阻害抑制効果がより顕著にみとめられるとともに、FLT3 に対して選択性の高い阻害剤ほどその抑制が強いことが明らかとなった。また、この FL 依存性の増殖抑制阻害効果は FL 中和抗体により解除されることを明らかにした (図 1)。

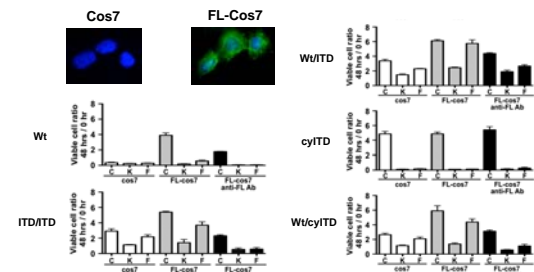


図1. 膜結合FLによるFLT3阻害効果の減弱作用

(4) FL 刺激による阻害剤の増殖阻害抑制効果は、正常 FLT3 分子を介しており、その際には正常 FLT3 分子と変異 FLT3 分子の hetero-dimer は形成されていないことを明らかにした。

(5) タンパクの ER から Golgi への移動を阻害し、Golgi から ER への移動は阻害しない Brefeldin A (BFA) 処理により、FLT3 分子の細胞表面発現量をフローサイトメーターで定量した。正常 FLT3 発現細胞では、細胞表面発現量が著明に低下したが、変異 FLT3 分子の減少量は僅かであった (図 2)。

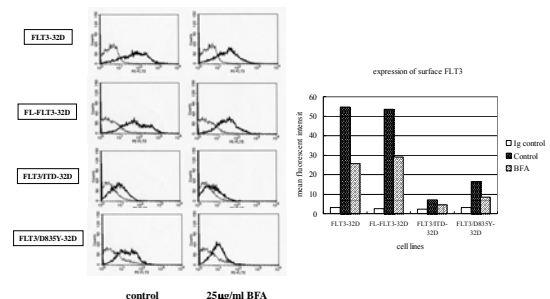


図2. BFA 処理後の細胞表面発現量

- (6) BFA 処理後、正常 FLT3 発現細胞では、FLT3 下流の標的分子である STAT1, STAT3, STAT5

の活性化抑制が認められたが、変異FLT3発現細胞においてはこれら分子の活性化抑制は認められなかった。一方、AKTおよびERKの活性化は、正常FLT3発現細胞においてもBFAによる抑制を受けなかった(図3)。

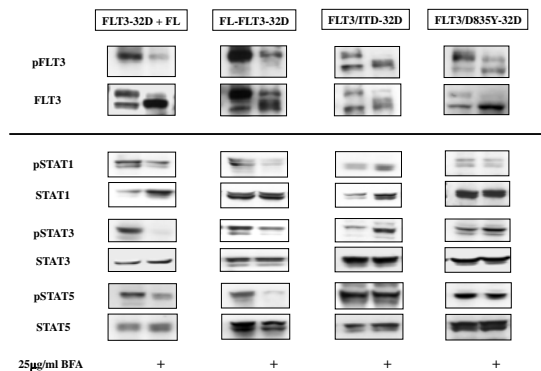


図3. BFA処理が及ぼすSTATの脱リン酸化効果

(7) BFAの正常および変異FLT3発現細胞に対する増殖抑制効果をMTT法にて評価した。正常FLT3発現細胞においては、FLによる細胞死抑制効果をBFAは著明に阻害し、高度に細胞死を誘導した。一方、変異FLT3発現細胞においては、BFAによる細胞死誘導は軽度であった(図4)。

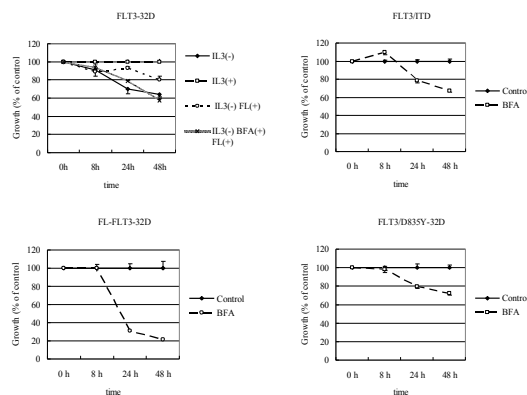


図4. BFA処理が及ぼす増殖抑制効果

(8) FLT3遺伝子変異と高頻度で重複するNPM1、IDH2遺伝子変異が、FLT3阻害剤による増殖抑制機構へ及ぼす影響を評価するために、正常及び変異NPM1、IDH2との共発現細胞を樹立した。

(9) 変異IDH発現細胞では、citrateから α KGへの変換酵素活性が著明に低下していることが確認され、これにより、細胞内2HGの増加が生じていると考えられた。

(10) FLT3-ITD/Mt-NPM1/Mt-IDH2発現細胞では、FLT3阻害剤による増殖抑制効果の減弱が

認められた。

(11) FLT3-ITD/Mt-NPM1/Mt-IDH2発現細胞においては、FLT3阻害剤添加後、MAPKの脱リン酸化が抑制されており、このことが細胞増殖抑制効果の減弱に関与していると考えられた。

以上の結果により、正常FLT3分子においては、その複合糖鎖修飾が細胞内外からのFL刺激に対しての自己リン酸化に重要であること、変異FLT3分子においては、複合糖鎖修飾を受ける前にすでに自己リン酸化しており、STAT分子のリン酸化を介して細胞増殖に寄与していることが明らかとなった。また、変異FLT3分子は主として細胞内で活性化し、FL刺激の影響が少なく、正常FLT3分子のリガンド刺激に基づく活性化シグナルが阻害剤の効果減弱に関与しており、この活性化シグナルは糖鎖修飾の阻害により回避されることが明らかとなった。更に、本来核小体に存在するNPM1分子に対し、変異NPM1分子は細胞質内に局在変異が生じているため、細胞質内で糖鎖修飾を受けずに活性化しているFLT3-ITD分子と変異NPM1分子の相互作用と変異IDH分子によるクエン酸回路代謝異常によってMAPKの脱リン酸化機構への影響が示唆された。これらの現象は、糖鎖修飾を受けない変異FLT3分子の存在が誘因と考えられ、糖鎖修飾阻害のみならず、新たな治療標的との併用により阻害剤活性を増強させることが可能であると考えられた。

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28件)

- ① Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Kiyoi H, Naoe T. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012 in press. (査読有)
- ② Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, Fujisawa S, Nagai T, Yamazaki H, Tauchi T, Imai K, Mori N, Yagasaki F, Maeda Y, Usui N, Miyazaki Y, Miyamura K, Kiyoi H, Ohtake S, Naoe T. Long-term outcome of imatinib therapy, with assessment of its dosage and blood levels, for chronic myelogenous leukemia. **Cancer Sci**. 2012 in press. (査読有)

- ③ Kajiguchi T, Katsumi A, Tanizaki R, Kiyoi H, Naoe T. Y654 of β -catenin is essential for FLT3/ITD-related tyrosine phosphorylation and nuclear localization of β -catenin *Eur J Haematol*. 2012 in press. (査読有)
- ④ Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;156:316-325. (査読有)
- ⑤ Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood* 2011; 118: 1600-1609. (査読有)
- ⑥ Usui N, Takeshita A, Nakaseko C, Dobashi N, Fujita H, Kiyoi H, Kobayashi Y, Sakura T, Yahagi Y, Shigeno K, Ohwada C, Miyazaki Y, Ohtake S, Miyawaki S, Naoe T, Ohnishi K; Japan Adult Leukemia Study Group. Phase I trial of gemtuzumab ozogamicin in intensive combination chemotherapy for relapsed or refractory adult acute myeloid leukemia (AML): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-AML206 study. *Cancer Sci* 2011; 102: 1358-1365. (査読有)
- ⑦ Sakai K, Ishikawa Y, Mori Y, Kobayashi M, Iriyama C, Ozawa Y, Suzuki T, Minami Y, Ishikawa K, Kaneda N, Naoe T, Kiyoi H. A novel insertion mutation of K294RGG within *BCR-ABL* kinase domain confers imatinib-resistance: sequential analysis of the clonal evolution in a patient with chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Int J Hematol* 2011; 93: 237-242. (査読有)
- ⑧ Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T. Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011; 35: 685-688. (査読有)
- ⑨ Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Sakura T, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. A randomized comparison of four courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus three courses of high-dose cytarabine alone in post-remission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 study. *Blood* 2011; 117: 2366-2372. (査読有)
- ⑩ Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: JALSG AML201 Study. *Blood* 2011; 117: 2358-2365. (査読有)
- ⑪ Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Tanizaki R, Iwasaki T, Kobayashi M, Matsushita T, Senga T, Kohno T, Kojima T, Kaibuchi K, Hamaguchi M, Naoe T. FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4\beta 1$ integrin and Pyk2 signaling. *Eur J Haematol* 2011; 86: 191-198. (査読有)
- ⑫ Tsujimura A, Kiyoi H, Shiotsu Y, Ishikawa Y, Mori Y, Ishida H, Toki T, Ito E, Naoe T. Selective KIT inhibitor KI-328 and HSP90 inhibitor show different potency against the type of KIT mutations recurrently identified in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2010; 92: 624-633. (査読有)
- ⑬ Ishikawa Y, Kiyoi H, Watanabe K, Miyamura K, Nakano Y, Kitamura K, Kohno A, Sugiura I, Yokozawa T, Hanamura A, Yamamoto K, Iida H, Emi N, Suzuki R, Ohnishi K, Naoe T. Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a report from the BINGO study. *Cancer Sci* 2010; 101: 2186-2192. (査読有)
- ⑭ Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia.

Oncogene 2010; 29: 3723-3731. (査読有)

- ⑮ Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2010; 28: 1591-8. (査読有)
- ⑯ Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R γ mice. **Cancer Sci** 2010; 101: 631-638. (査読有)
- ⑰ Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, Shimada K, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 390: 48-53. (査読有)
- ⑱ Shiotsu Y*, Kiyoi H*, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. **Blood** 2009; 114: 1607-1617. *equal contribute. (査読有)
- ⑲ Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. **Eur J Haematol** 2009; 83: 90-98. (査読有)
- ⑳ Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination

chemotherapies: its prevalence and clinical significance. **Blood** 2009; 113: 4885-4893. (査読有)

[学会発表] (計28件)

- ① 清井 仁 急性骨髄性白血病における分子病態に基づく予後層別化と個別化治療 第49回日本癌治療学会総会 (招待講演) 2011.10.27 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ② 清井 仁 AML病態研究の進展と最近の治療エビデンス 第73回日本血液学会学術総会 (招待講演) 2011.10.16 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ③ 清井 仁 急性白血病の分子標的治療 第48回日本癌治療学会 (招待講演) 2010.10.30 京都国際会議場 (京都府)
- ④ Hitoshi Kiyoi. Prognostic classification and the development of individual therapy based on the genetic alterations in AML. 第69回日本癌学会総会 2010.9.22 大阪国際会議場 (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清井 仁 (KIYOI HITOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90314004

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし

