

## 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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591030

研究課題名（和文） Ph陽性白血病の低分子量G蛋白質を介したシグナル伝達機構の治療標的としての検討

研究課題名（英文） Therapeutic target of small GTPase for Ph positive leukemias

研究代表者

黒須 哲也（KUROSU TETSUYA）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40361696

研究成果の概要（和文）：PECAM-1はCD31とも呼ばれる130kDのimmunoglobulin superfamilyの接着分子で、内皮細胞と造血細胞に広範に発現する。2つのチロシンリン酸化部位ITIM領域を有し、細胞シグナル伝達を制御することが報告されている。慢性骨髄性白血病やPh陽性急性リンパ芽球性白血病を引き起こす融合型チロシンキナーゼBCR/ABL発現細胞において、BCR/ABLおよびSrcファミリーキナーゼがPECAM-1のITIM領域をリン酸化することを見いだした。ITIMのチロシンリン酸化によりSHP2が結合し脱リン酸化するとともに、Gab2とも複合体を形成し、細胞内シグナル伝達の制御に関与することが推察された。BCR/ABLチロシンキナーゼ阻害薬imatinib耐性変異E255KやT315Iはより強くPECAM-1をリン酸化した。BCR/ABL発現細胞にPECAM-1を過剰発現することにより、Rap1/MEK経路の活性化と細胞接着を亢進し、imatinibやBCR/ABLチロシンキナーゼ第二世代阻害薬dasatinibによるmitochondria障害とcaspaseの活性化を介したアポトーシス誘導を抑制した。これらの結果よりPECAM-1はBCR/ABL陽性白血病において、薬剤耐性や白血病化の進展に関与していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：PECAM-1 (CD31) is an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-containing surface glycoprotein expressed in various hematopoietic cells and plays roles in regulation of adhesion and migration of hematopoietic progenitor cells. PECAM-1 has also been implicated in activation of the Ras family GTPase Rap1 and in regulation of apoptosis. We previously reported that BCR/ABL activates the Rap1/B-Raf signaling pathway to regulate proliferation and integrin-mediated adhesion of Ph+ leukemic cells. In the present study, we demonstrate that PECAM-1 was tyrosine phosphorylated in ITIM in various BCR/ABL-expressing cells including primary CML and Ph+ ALL cells, which was inhibited by imatinib or dasatinib and was more prominently observed in cells expressing the imatinib-resistant E255K or T315I mutant. Transient expression experiments further revealed that ITIM in PECAM-1 was tyrosine phosphorylated by BCR/ABL or Lyn and was dephosphorylated by SHP2. Overexpression of PECAM-1 augmented BCR/ABL-mediated activation of Rap1/MEK/Erk pathway and enhanced chemotaxis induced by SDF-1, which also induced tyrosine phosphorylation of PECAM-1. Finally, PECAM-1 specifically inhibited apoptosis induced in K562 cells by imatinib or dasatinib but not that by the Bcl2 family antagonist ABT-737. These data suggest that PECAM-1 may play a role in regulation of apoptosis and migration of BCR/ABL-expressing cells to modulate their imatinib sensitivity and would be a possible candidate for therapeutic target in Ph+ leukemias.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学

#### 1. 研究開始当初の背景

BCR/ABLはPh染色体転座により生じる融合チロシンキナーゼで、骨髄性白血病（CML）や約30%の成人急性リンパ球性白血病（ALL）の発症原因となっている。BCR/ABLに対して特異的阻害剤 imatinib が開発されて分子標的薬として臨床応用され、特にCML慢性期では著明な治療効果が得られている。しかし、多くの例では残存白血病細胞が認められ、またチロシンキナーゼ領域のアミノ酸変異による imatinib 耐性の発生も臨床的に問題となっている。更に、CML 進行期や ALL では imatinib 単独治療ではほぼ全例に再発が認められ、抗癌剤治療にも抵抗性であることから有効な治療法は確立しておらず、新たな治療方法の開発が急務と考えられる。

#### 2. 研究の目的

申請者は、BCR/ABL が Rap1/B-Raf 経路を活性化し増殖誘導とアポトーシス抑制に重要な役割を果たすことを見だし報告してきた。そこで、本研究では Ph 白血病に対する imatinib 治療法の改善を目指し、BCR/ABL による低分子量G蛋白質 Rap1 や Rac および B-Raf キナーゼの活性化機構と、治療抵抗性 Ph 陽性白血病の治療標的としての意義を明らかにし、現在臨床開発が行われている低分子量G蛋白質および Raf に対する阻害薬と imatinib との併用療法の有効性を検討する。

#### 3. 研究の方法

(1) BCR/ABL による Rac 活性化の意義の解明 BCR/ABL により活性化された Rac が Raf-1 活性化や活性酸素種 (ROS) 産生と細胞増殖誘導およびアポトーシス抑制に果たす役割を、それぞれに対する dominant negative 変異体および knock down 法を用いて in vitro および in vivo で検討し、治療標的としての意義を明らかにする。

(2) Rap1 による B-Raf 活性化の意義の解明 上記と同様にして、BCR/ABL で活性化された Rap1/B-Raf 経路の役割を明らかにする。

(3) 低分子量G蛋白質および Raf/MEK キナーゼ阻害剤と imatinib による統合的治療法の検討 低分子量G蛋白質阻害効果を有する farnesyl transferase 阻害薬 (FTI) や statin および bisphosphonate 等と、低分子

量G蛋白質より下流の Raf や MEK の阻害剤として開発された sorafenib や AZD6244 等について、Rap1 や Rac および B-Raf/MEK 活性の抑制効果と imatinib との相乗的 apoptosis 誘導効果につき、Ph 陽性白血病臨床検体を含めて明らかにする。

#### 4. 研究成果

PECAM-1はCD31とも呼ばれる130kDのimmunoglobulin superfamilyの接着分子で、内皮細胞と造血細胞に広範に発現する。2つのチロシンリン酸化部位ITIM領域を有し、細胞シグナル伝達を制御することが報告されている。慢性骨髄性白血病やPh陽性急性リンパ芽球性白血病を引き起こす融合型チロシンキナーゼBCR/ABL発現細胞において、BCR/ABL およびSrcファミリーキナーゼがPECAM-1のITIM領域をリン酸化することを見出した。ITIMのチロシンリン酸化によりSHP2が結合し脱リン酸化するとともに、Gab2とも複合体を形成し、細胞内シグナル伝達の制御に関与することが推察された。BCR/ABLチロシンキナーゼ阻害薬imatinib耐性変異E255KやT315Iはより強くPECAM-1をリン酸化した。BCR/ABL発現細胞にPECAM-1を過剰発現することにより、Rap1/MEK経路の活性化と細胞接着を亢進し、imatinibやBCR/ABLチロシンキナーゼ第二世代阻害薬dasatinibによるmitochondria障害とcaspaseの活性化を介したアポトーシス誘導を抑制した。これらの結果より PECAM-1はBCR/ABL陽性白血病において、薬剤耐性や白血病化の進展に関与していることが推察された。

#### 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 6件)

(1) Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Kagechika H, Miura O: Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. Apoptosis 15:608-620, 2010 査読あり doi: 10.1007/s10495-010-0457-0

(2) Oshikawa G, Kurosu T, Arai A,

Murakami N, Miura O: Clonal evolution with double Ph followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 199:56-61, 2010 査読あり doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.01.018

(3) Oshikawa G, Nagao T, Wu N, Kurosu T, Miura O: c-Cbl and Cbl-b ligases mediate 17-allylaminodemethoxygeldanamycin-induced degradation of autophosphorylated Flt3 kinase with internal tandem duplication through the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 286:30263-30273, 2011 査読あり doi: 10.1074/jbc.M111.232348

(4) Nagao T, Oshikawa G, Wu N, Kurosu T, Miura O: DNA damage stress and inhibition of Jak2-V617F cause its degradation and synergistically induce apoptosis through activation of GSK3beta. *PLoS ONE* 6:e27397, 2011 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0027397

(5) Arai A, Imadome K, Wang L, Wu N, Kurosu T, Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara S, Miura O: Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation *Intern Med* 51(7):777-82 2012 査読あり <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.51.6769>

(6) Wu N, Kurosu T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O: PECAM-1 is involved in BCR/ABL signaling and may downregulate imatinib-induced apoptosis of Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Int J Oncol* 42(2):419-28 2013 査読あり doi: 10.3892/ijo.2012.1729

[学会発表] (計 11件)

(1) Kurosu T, Wu N, Suzuki T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Chemotherapy resistance through enhanced Chk1 activation by BCR/ABL, Flt-ITD and Jak2-V67F. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜

(2) Oshikawa G, Wu N, Nagao T, Suzuki T, Kurosu T, Miura O.: c-Cbl-mediated ubiquitination of Flt3-ITD and cellular mechanisms regulating its degradation. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜

(3) Wu N, Kurosu T, Suzuki T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Roles for PECAM-1 (CD31) in signaling from and

leukemogenesis by BCR/ABL. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜

(4) Nagao T, Wu N, Oshikawa G, Suzuki T, Kurosu T, Miura O.: Molecular mechanisms regulating DNA damage-induced degradation of Jak2-V617F and apoptosis. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜

(5) Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Inhibition of BCR/ABL downregulates Chk1 to induce apoptosis synergistically with chemotherapeutics. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14-16日, 名古屋

(6) Wu N, Kurosu T, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: PECAM-1 possibly mediates BCR/ABL signaling and modulates imatinib sensitivity of Ph+ leukemic cells. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14-16日, 名古屋

(7) Oshikawa G, Nagao T, Wu N, Kurosu T, Miura O.: c-Cbl and Cbl-b mediate 17-AAG-induced Flt3-ITD degradation through the ubiquitin proteasome pathway. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14-16日, 名古屋

(8) Nagao T, Oshikawa G, Wu N, Kurosu T, Miura O.: Inhibition of Jak2-V617F under DNA-damage stress induces its degradation and synergistic apoptosis. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14-16日, 名古屋

(9) Kurosu T, Wu N, Nogami A, Oshikawa G, Nagao T, Miura O.: Interplay between Chk1 and p53-mediated checkpoint signaling in BCR/ABL-expressing cells. 第74回日本血液学会総会, 2012年10月19-21日, 京都.

(10) Oshikawa G, Nagao T, Nogami A, Wu N, Kurosu T, Miura O.: Molecular mechanisms for differential responses of Flt3-ITD and -TKD to molecular targeted therapy. 第74回日本血液学会総会, 2012年10月19-21日, 京都.

(11) Nagao T, Yamamoto M, Oshikawa G, Nogami A, Wu N, Kurosu T, Tohda S, Miura O.: Aberrant signaling that involves Jak2-V617F and Lyn in a newly established leukemia cell line, PV-T1. 第74回日本血液学会総会, 2012年10月19-21日, 京都

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/hema/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒須 哲也 (KUROSU TETSUYA)

東京医科歯科大学・医学部・附属病院・血液内科

研究者番号：40361696

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：