

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591407

研究課題名(和文) PP2A-FOXO3Aの活性化を利用したATRA耐性APLの新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of the new treatment strategy of ATRA-resistant APL using PP2A-FOXO3A activation pathway

研究代表者

小松 則夫 (KOMATSU, NORIO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50186798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：急性前骨髄球性白血病(APL)患者は全トランスレチノイン酸(ATRA)に反応するが、一部の患者は、ATRAに耐性である。PP2A-FOXO3Aの活性化に關与するFTY720はATRA感受性APL細胞株NB4だけでなくATRA耐性APL細胞株NB4/ARに細胞死を誘導した。この効果は抗酸化剤であるNACによって抑制されたことから、FTY720は活性酸素種の産生を介してAPL細胞株の細胞死を誘導することがわかった。さらにはATRA耐性APL細胞株から形成された腫瘍がFTY720投与によって明らかに縮小した。以上の結果はFTY720がAPLに対する抗白血病薬として有望であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Acute promyelotic leukemia (APL) patients usually respond to all-trans retinoic acid (ATRA) treatment, however, some patients are refractory and resistant to ATRA. Therefore, an alternative strategy to treat APL patients is demanded. Here, we showed that FTY720, an immunosuppressive drug, is capable of inducing apoptosis in both ATRA-sensitive and -resistant APL cells in vitro and regresses tumor mass generated from ATRA-resistant APL cells in vivo. This demonstrates its capability as a potential therapeutic compound in APL treatment. In addition, we have shown that N-acetylcysteine (NAC) rescues FTY720-dependent apoptosis induction in NB4 cells, implying that FTY720 cytotoxic effect to NB4 cells are due at least partly if not all, to a generation of reactive oxygen species (ROS). These observations demonstrate a potential of FTY720 as a therapeutic compound against APL irrespective of whether it is resistant to ATRA.

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：FOXO3A プロテインホスファターゼ2A 急性前骨髄球性白血病(APL) 全トランスレチノイン酸(ATRA) ATRA耐性 FTY720 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

FOXO3A (FKHRL1) は FOXO1、FOXO4、FOXO6 とともに Forkhead ファミリー転写因子に属し、線虫が高温や栄養欠乏などの生存に適さない環境に適応するために機能する転写因子 DAF16 のヒトオルソログである。FOXO3A は細胞周期停止、ストレス耐性、細胞分化、代謝、オートファジーなどの様々な生命現象を制御する重要な分子で、造血系における役割については遺伝子破壊マウスを用いた解析から、細胞内の活性酸素種 (以下 ROS と略す) を低いレベルに保つことで造血幹細胞の維持に重要な役割を果たす (Tothova Z, et al. Cell 2007; 128: 325-39; Miyamoto K, et al. Cell Stem Cell 2007; 1: 101-12)。また p27/Kip1 やサイクリン D などの発現を制御することで細胞周期チェックポイントの制御にも関与する (Komatsu N, et al. JBC 2003; 278; 6411-9; Schmidt M, et al. MCB 2002; 22: 7842-52)。重要なことに FOXO3A はリン酸化の状態によって細胞内局在や転写因子としての機能が大きく変化する。即ち、セリン・スレオニンキナーゼである AKT や SGK によって 3 カ所のセリン/スレオニン残基 (T32, S253, S315) がリン酸化を受けると、14-3-3 蛋白と結合して細胞質内に留まり、ユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される。一方、これらのセリン/スレオニン残基が脱リン酸化されると FOXO3A は核内へと移行し、転写因子としての機能を発揮し、標的遺伝子の転写を制御する。すなわち「脱リン酸化 = 転写因子としての機能を発揮」という考えが成立する。

FOXO3A は多くの造血器腫瘍で恒常的なリン酸化を受け、核内への移行が阻止され、転写因子としての機能が失われた状態にある。我々は世界に先駆けて慢性骨髄性白血病 (CML) において、FOXO3A が CML の原因分子である BCR-ABL チロシンキナーゼの下流に存在し、常にリン酸化された状態 (= 細胞質内に存在し、やがて分解されるため、転写因

子としての機能が発揮できない状態) にあること、イマチニブ刺激で BCR-ABL のキナーゼ活性を抑制すると、FOXO3A は脱リン酸化されて活性型となり核内へと移行し、転写因子としての機能を発揮し、CML 細胞の細胞周期を G0/G1 期に停止させ、細胞増殖を抑制すること、活性型 FOXO3A を核内に強制的に発現させることによって TRAIL などの標的遺伝子の誘導を介してアポトーシスを惹起すること (Komatsu N, et al. JBC 2003; 278; 6411-9; Stem Cells 2004; 22: 609-16)。さらにはイマチニブに耐性となった CML 細胞株に FOXO3A を核内に強制的に発現させることによってアポトーシスを惹起することを明らかにし、FOXO3A が CML 細胞の新たな分子標的になるのではないかと発表した (Kikuchi S, et al. Cancer Sci 2007; 98: 1949-58)。この論文は掲載された雑誌の「issue highlights」に取り上げられ、表紙を飾った。現在多くの抗癌剤が FOXO3A を分子標的として抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされている。

さらに我々は急性前骨髄球性白血病 (APL) における FOXO3A の新たな機能を発見し、2010 年 5 月号の Blood に発表した。APL は 90% 以上の症例に t(15;17) 染色体異常を有し、その結果、PML-RAR キメラ遺伝子が形成される。このキメラ遺伝子がコードする PML-RAR 融合タンパクは PML や RAR に対する dominant negative 変異体と考えられており、PML や RAR の機能を阻害することでアポトーシス抑制および好中球系細胞の分化・成熟を阻害し、APL を発症する。

PML-RAR はオールトランスレチノイン酸 (ATRA) 結合ドメインを有し、薬理的濃度の ATRA に応答して PML-RAR がユビキチン化分解を受け、dominant negative 作用が減弱する。その結果、PML や RAR の機能が回復し、分化障害が解除され、APL 細胞は成熟し、アポトーシスが引き起こされる。我々は ATRA による APL 細胞のアポトーシス・分化誘導に

は FOXO3A の活性化が必須であることを明らかにした (Sakoe Y, et al. Blood 2010; 115: 3787-95)。即ち、 APL 細胞において FOXO3A が PML-RAR の下流にあり、リン酸化された状態 (= 転写因子としての機能を喪失した状態) で存在すること、 ATRA によって脱リン酸化された FOXO3A は核内へと移行すること、

FOXO3A の発現を RNA 干渉法でノックダウンすると ATRA による APL 細胞の好中球への分化・アポトーシス誘導がみられなくなることから、FOXO3A の活性化が ATRA によるこれらの一連の反応に必須であること、さらには ATRA に耐性を獲得した APL 細胞株 NB4/AR に活性型 FOXO3A を核内に強制発現させることによってアポトーシスを誘導できることを証明した。以上の結果は『FOXO3A の活性化を誘導すれば APL 細胞を死滅できる』ことを意味しており、FOXO3A の活性化を直接誘導できる薬剤が発見できれば新規 APL 治療薬の開発につながることを期待される。

2 . 研究目的

FOXO3A の活性化を直接誘導する酵素としてセリン/スレオニン脱リン酸化酵素 (リン酸化を受けた FOXO3A の脱リン酸化を誘導する酵素) である protein phosphatase 2A (PP2A) を同定した (2010 年 12 月第 52 回米国血液学会で発表)。その根拠として、 ATRA 処理後の NB4 細胞内で PP2A 活性が上昇すること、

PP2A が恒常的に FOXO3A と会合している (免疫沈降法と共焦点レーザー顕微鏡にて確認)

ATRA 処理後に NB4 細胞から抽出した PP2A がリン酸化 T32 (32 番目のスレオインで AKT によってリン酸化される部位のひとつ) を含む合成ペプチドを用いた実験で直接 T32 の脱リン酸化を誘導することが挙げられる。そこで本研究では PP2A の活性化作用を有する FTY720 に注目し、この薬剤が実際に抗 APL 白血病作用を発揮するか否かについて *in vitro* と *in vivo* の両方の系を用いて検討することにした。

3 . 研究の方法

In vitro の系では FTY720 が NB4 や ATRA 耐性の NB4/AR 細胞にアポトーシスを誘導できるかどうかを Annexin V によるアポトーシス検出系を用いて検討した。さらにこのアポトーシス誘導作用に活性酸素種の産生が関与しているかどうかを検討するために抗酸化剤であるアセチルシステイン (NAC) を用いて検討した。 *in vivo* の系では免疫不全マウスに NB4 や NB4/AR 細胞を皮下に移植して作製した担癌マウスを用い、FTY720 の腫瘍縮小効果を解析した。

4 . 研究成果

(1) *in vitro* の系において FTY720 が PP2A の活性化を介して NB4 や ATRA 耐性の NB4/AR 細胞のアポトーシスを誘導できるか否かの検討

APL 細胞では ATRA 添加によって PP2A が活性化され、FOXO3A の脱リン酸化・活性化によりアポトーシスが生じるとすれば、PP2A の活性化物質である FTY720 も同様の機序で APL 由来の白血病細胞株 NB4 (ATRA 感受性) とその亜株である ATRA 耐性 NB4/AR のアポトーシスを誘導するのではないかと考え、実験を行い、以下の結果を得た。 1) PP2A 活性化作用を有する FTY720 は ATRA 感受性 NB4 だけでなく、ATRA 耐性 NB4/AR 細胞株の細胞増殖の抑制 (図 1) とアポトーシスを誘導した (図 2)。

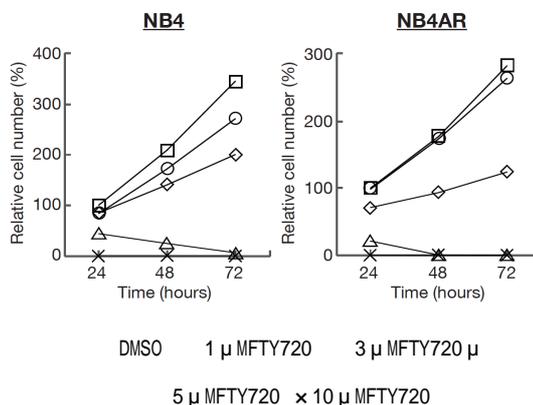


図 1

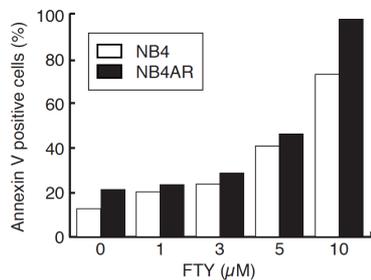


図 2

このアポトーシス誘導作用はNACの用量依存的に抑制されたことから(図3)、FTY720は活性酸素種の産生を介してAPL細胞株のアポトーシスを誘導していることが示唆された。さらにFTY720は4例のAPL患者から採取した新鮮白血病細胞に対しても殺細胞効果を発揮した。

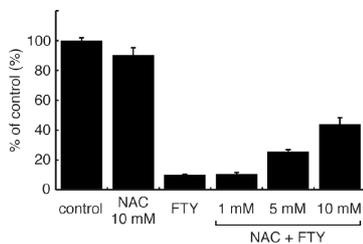


図 3

(2) APL 白血病モデルマウスの作製とFTY720の *in vivo* 効果の検討

NOG マウスにNB4とNB4/AR細胞を皮下に接種し、腫瘍を形成させ、FTY720を5 mg/kg/day または10 mg/kg/dayを腹腔内に連日投与し、腫瘍縮小効果を検討した。その結果、FTY720は用量依存性に腫瘍縮小効果を示した(図4)。

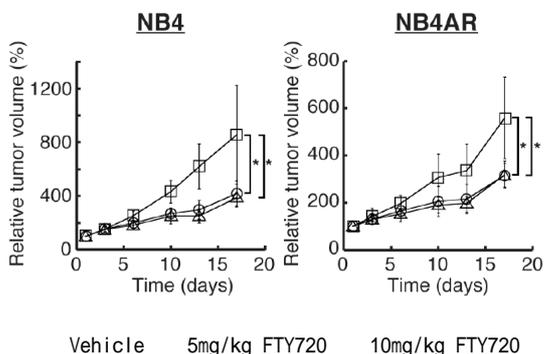


図 4

以上の結果はFTY720がATRA感受性APLだ

けでなく ATRA 耐性 APL に対しても抗白血病薬として使用可能な薬剤であることを示唆すると同時に、我々が提唱している『FOXO3Aの活性化を誘導すれば APL 細胞を死滅できる』という仮説をさらに裏付ける結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- Mitumori T, Nozaki Y, Yamamoto T, Kawashima I, Shobu Y, Nakajima K, Komatsu N, Kirito K. Hypoxia inhibits JAK2V617F activation via suppression of SHP-2 function in MPN cells. *Exp Hematol.* in press 査読有
- Eda Hiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, Shirane S, Tsutsui M, Noguchi M, Koike M, Imai K, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N. JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan *Int J Hematol.* 2014 99(5): 625-634 doi: 10.1007/s12185-014-1567-1 査読有
- Sunami Y, Araki M, Hironaka Y, Morishita S, Kobayashi M, Liew EL, Eda Hiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Komatsu N. Inhibition of the NAD-Dependent Protein Deacetylase SIRT2 Induces Granulocytic Differentiation in Human Leukemia Cells. *PLoS One* 2013 8(2): e57633 doi: 10.1371/journal.pone.0057633 査読有
- Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, Kazuki Y, Komatsu N, Okada Y, Doi T, Takeya H, Oshimura M. An induced pluripotent stem cell-mediated and

- integration- free factor VIII expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 431(2): 336-341 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.096 査読有
5. Nozaki Y, Mitsumori T, Yamamoto T, Kawashima I, Shobu Y, Hamanaka S, Nakajima K, Komatsu N, Kirito K. Rituximab activates Syk and AKT in CD20-positive B cell lymphoma cells dependent on cell membrane cholesterol levels. *Exp Hematol.* 2013 41(8): 687-696 doi: 10.1016/j.exphem.2013.04.006 査読有
 6. Isobe Y, Hamano Y, Ito Y, Kimura H, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol.* 2013 56(2): 150-152 doi: 10.1016/j.jcv.2012.11.004 査読有
 7. Baba T, Naka K, Morishita S, Komatsu N, Hirao A, Mukaida N. MIP-1 /CCL3-mediated maintenance of leukemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2013 210(12): 2661-2673 doi: 10.1084/jem.20130112 査読有
 8. Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK cell type chronic active Epstein-Barr virus disease in adults: an underlying condition for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol.* 2012 65(3): 278-282 doi: 10.1136/jclinpath-2011-200523 査読有
 9. Kanemitsu N, Isobe Y, Masuda A, Momose S, Higashi M, Tamaru J, Sugimoto K, Komatsu N. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in extranodal NK/T-cell Lymphoma, nasal type (ENKL): differences in biologic and clinical behaviors of LMP1-positive and -negative ENKL. *Clin Cancer Res.* 2012 18(8): 2164-2172 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2395 査読有
- 〔学会発表〕(計3件)
1. Kobayashi M, Araki M, Hironaka Y, Ohsaka A, Komatsu N. Identification of FOXO3A as a key downstream target for the oncogenic JAK2V617F. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 7-10, 2013, New Orleans, USA
 2. Tsukune Y, Edahiro Y, Komatsu N. Management of adult chronic immune thrombocytopenia in JAPAN: Patient and hematologist perspective. The 18th Congress of the European Hematology Association, June 13-16, 2013, Stockholm, Sweden
 3. Sunami Y, Araki M, Morishita S, Hironaka Y, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N. The Sirtuin inhibitor induces APL cell differentiation. The 3rd JSH International Symposium 2012, May 2012, Kawagoe, Japan
- 〔図書〕(計8件)
1. 小松則夫、中外医学社、Annual Review 血液、真性赤血球増加症の心血管イベントと治療強度 2014、67-75
 2. 小松則夫、日本内科学会雑誌、骨髄増殖性腫瘍の病態と治療 2014、440-449

3. 小松則夫、中外医学社、カラーテキスト血液病学第2版、骨髓増殖性腫瘍 2013、465-481
4. 小松則夫、中山書店、改訂第8版内科学書6血液・造血器疾患・神経疾患、本態性血小板血症・先天性家族性血小板血症・二次性(反応性)血小板増加症 2013、172-176
5. 小松則夫、朝倉書店、内科学第10版 赤血球増加症の原因と分類・相対的赤血球増加症・真性多血症・本態性血小板血症 2013
6. 小松則夫、中山書店、ここまで来た白血病/MDS治療 本態性血小板血症 2013、286-289
7. 小松則夫、日本臨床、別冊：血液症候群—その他の血液疾患を含めて—真性赤血球増加症 2013、83-90
8. 小松則夫、西村書店、骨髓増殖性腫瘍、カラー版内科学 2012、1394-1397

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

1. 名称：リンパ節腫脹病変の評価方法
 発明者：森下総司、荒木真理人、小松則夫
 権利者：順天堂大学
 種類：特許
 番号：特願 2014-003192
 取得年月日：2014年1月10日
 国内外の別：国内
2. 名称：JAK2 変異遺伝子の検出方法
 発明者：森下 総司，小松 則夫
 権利者：順天堂大学
 種類：特許
 番号：特願 2013-207818
 取得年月日：2013年10月3日
 国内外の別：国内
3. 名称：急性白血病における分化誘導薬の診断薬
 発明者：荒木真理人、小松則夫、角南義孝

権利者：順天堂大学

種類：特許

番号：特願 2013-212611

取得年月日：2013年10月10日

国内外の別：国内

4. 名称：急性前骨髄球性白血病治療薬のスクリーニング方法

発明者：荒木真理人、小松則夫、角南義孝

権利者：順天堂大学

種類：特許

番号：特願 2012-181369

出願年月日：2012年8月20日

国内外の別：国内

取得状況(計1件)

1. 名称：JAK2 遺伝子の変異解析法
 発明者：野田 尚宏，関口 勇地，森下 総司，常田 聡，小松 則夫，蓮沼 彩，桐戸 敬太

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所・早稲田大学・順天堂大学

種類：特許

番号：特開 2012-034580

取得年月日：2010年8月3日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 則夫 (KOMATSU, Norio)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50186798

(2)研究分担者

高久 智生 (TAKAKU, Tomoiku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20408256