

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591384

研究課題名(和文) 恒常的活性化チロシンキナーゼを発現した造血器腫瘍に対する統合的分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of combined molecular target therapy against hematopoietic malignancies expressing constitutively activated tyrosine kinases

研究代表者

三浦 修 (Miura, Osamu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10209710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病や慢性骨髄性白血病等の骨髄増殖性腫瘍で高頻度に認められる恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体であるFLT3-ITD, BCR/ABL, Jak2-V617Fが、抗癌剤や種々の分子標的薬に対して治療抵抗性を付与する分子機構を検討し、これらの変異体が抗癌剤処理時にChk1を介した細胞周期チェックポイント活性化を亢進したり、STAT5の高度の活性化を介してPI3K/Akt経路の阻害から下流のmTORC経路の抑制を阻止する機構を見出し、またこれらの機構を制御することにより相乗的な腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することで、極めて有効な治療効果が期待出来る事を示した。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms for resistance of acute myeloid leukemia and myeloproliferative neoplasms, such as chronic myeloid leukemia, against chemotherapy and molecular target therapy conferred by constitutively activated tyrosine kinases, such as FLT3-ITD, BCR/ABL and Jak2-V617 were analyzed. These aberrant tyrosine kinases were found to enhance Chk1-mediated cell cycle checkpoint mechanisms induced by chemotherapeutics to confer resistance to chemotherapy or protect the downstream mTOR pathway from inhibition of the PI3K/Akt pathway by robustly activating STAT5 to confer resistance to the PI3K/Akt inhibitors. Combined therapeutic strategies to control these resistance mechanisms have shown to induce apoptosis of leukemic cells synergistically and very effectively.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 骨髄増殖性腫瘍 チロシンキナーゼ阻害薬 分子標的療法 FLT3 Jak2 STAT5 PE CAM-1

1. 研究開始当初の背景

白血病の発症と進展にはBCR/ABLやFlt3-ITD等の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重要な役割を果たし、これらを分子標的とした薬剤が開発され臨床応用されつつある。しかし、これらの変異体の抑制のみでは、Flt3-ITD陽性AML細胞では十分な治療効果が得られず、またCMLでは白血病幹細胞の残存や新たな変異の出現などにより容易に耐性を生じうる。申請者は、これらの恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体におよぼすTKIの効果に関して、dasatinibやnilotinib等の第二世代TKIにも完全体制を示すBCR/ABLのT315I変異体が、腎癌等に対し臨床応用されているsorafenibによって阻害を受けること(Cancer Res 69:3927-3936, 2009.)、rottlerin等の薬剤がミトコンドリアのリン酸化脱共役機序によりimatinibの効果を相乗的に亢進しimatinib耐性を克服すること(Oncogene 26:2975-2987, 2007)、Mdm2阻害作用によりp53の発現誘導をもたらすnutlin-3がimatinibと相乗的に臨床検体を含めた種々のPh陽性白血病細胞のアポトーシスをもちたこと(Apoptosis 15:608-620, 2010)、17-AAGによるHSP90の阻害によりFlt3-ITDが主にc-CblやCbl-bなどのE3ユビキチンリガーゼによりユビキチン化されプロテアソーム依存性に分解されること(J Biol Chem 286:30263-30273, 2011)、TKIによる活性抑制下に抗癌剤によるDNA損傷ストレスがJak2-V617FのUPSおよびCaspaseによる分解を誘導すること(PLoS ONE 6:e27397, 2011)等を見だし報告してきた。

一方、白血病の治療に中心的役割を果たす抗癌剤治療は、主にDNA損傷を生じ腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するが、細胞周期停止チェックポイント機構の活性化等の機序により治療抵抗性を生じる。申請者は以前に、造血サイトカインによる増殖シグナル活性化時にはPI3K/Akt経路の活性化によるGSK3の抑制を介して、種々の抗癌剤によるチェックポイントキナーゼChk1の活性化が亢進することで、G2期での細胞周期停止によりアポトーシスが回避されることを見出し報告している(Oncogene 24:1973-1981, 2005)。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、活性化チロシンキナーゼ変異体からの異常増殖シグナルと抗癌剤によるDNA損傷反応シグナルとの主にChk1活性化や変異体発現制御を介したクロストークの分子機構をより詳細に解明することで、アポトーシスとチェックポイント誘導制御のシグナル伝達ネットワークを統合的に標的とすることで、より効率的かつ根治的な白血病治

療法の開発に結びつける事を目的とする。

3. 研究の方法

マウス造血前駆細胞株32DC13は10%FCS含有RPMI1640にWEHI (IL-3含有培養上清)を添加した培地で、PLAT-Aは10%FCS含有DMEMで培養した。FLT3-ITD陽性白血病患者の末梢血の単核球層をFicoll法にて分取し、cDNAを分離してRT-PCRによりITD陽性を確認した。PCR産物をTA-cloningして塩基配列を決定した。細胞の生存率および増殖の検討では、Trypan blueで分染して細胞数を計測する方法と、XTT法を用いた。相乗効果はCompu Synで解析した。細胞周期の解析はKrishan's 試薬を用い、FACS-caliburで検出した。細胞の作製では、PLAT-Aにリポフェクタミン法にてレトロウイルスベクターを導入し、目的の細胞に感染させた。plasmidの作製では、レトロウイルスベクターのpRevTRE-FLT3-ITDはpRevTRE(Clontech社)にpcDNA3-FLT3-ITD(Dr. F. Böhmerより供与)を、pRevTRE-FLT3-D835YはFLT3-D835Y陽性患者検体から得た配列をpRevTRE-FLT3-ITDにサブクローニングした。免疫沈降では、細胞のLysateに特異的抗体とProtein-A sepharoseを混合、Cap結合の検討はm7GTP-sepharoseを混合した後に4で一晩攪拌し、1XLaemmli's bufferで溶出してImmunoblotに供した。Baxとcaspaseの活性化は、特異的抗体で細胞内を染色し、FACS-caliburで検出した。ミトコンドリア膜電位は、DiO6試薬で染色した後、FACS-Caliburで検出した。

骨髄増殖腫瘍から急性骨髄性白血病へ進展した症例から細胞株を樹立して、細胞内シグナルをWestern blot法などにより解析すると共に、Jakキナーゼに対するチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)への感受性を検討した。

BCR/ABL、Flt3-ITDやJak2-V617F等のチロシンキナーゼ変異体によりtransformした造血細胞モデル株や造血器腫瘍細胞を、これらに対するTKIとetoposide等の抗癌剤とで処理し、Chk1活性化を介した細胞周期チェックポイント活性化機構やアポトーシス誘導機構を解析した。

Waldenströmマクログロブリン血症患者骨髄の腫瘍細胞のMYD88遺伝子の塩基配列を解析し、見出された変異体の発現ウイルスベクターを作成し、リンパ腫細胞株BJABに感染させMYD88変異体の発現動態や種々の細胞内シグナル活性化経路に及ぼす影響を解析した。種々のPh陽性白血病患者の白血病細胞や白血病細胞株を用いて、PECAM-1の発現やチロシンリン酸化および細胞内シグナル機構に及ぼす影響を解析し、またimatinib等のTKIに対する感受性に与える影響を上記の種々

の手法で解析した。

4. 研究成果

(1) マウス造血前駆細胞32D細胞に変異遺伝子、FLT3-ITDとFLT3-TKDを導入して32D/ITDおよび32D/TKD細胞を作製し以下の検討を行った。即ち、PI3K阻害薬のGDC-0941 (GDC)およびAkt阻害薬のMK-2206 (MK)は内因性経路によるアポトーシスを誘導し、その効果は32D/ITDに比べ、32D/TKDで強かった。また、32D/TKDにSTAT5の活性化型変異体STAT5A1*6を導入した細胞 (DY/STAT5*)では、阻害薬に抵抗性となり、32D/ITDにSTAT5阻害薬であるpimozide (PZD)を処理すると抵抗性が解除された。同様の効果をFLT3-ITD陽性ヒト白血病細胞株MV4-11で認めた。これらの薬剤は4EBP-1の脱リン酸化を32D/ITDに比して32D/TKDで強く誘導し、その効果はSTAT5A1*6導入で減弱し、PZD処理で増大した。これに伴って、翻訳開始複合体形成におけるeIF4E-eIF4G会合や抗アポトーシス因子Mcl-1の発現の抑制を認めた。このMcl-1の発現抑制は転写活性の抑制やタンパク質の不安定化とは独立した機構で生じ、外因性にMcl-1遺伝子を導入した32D/TKDではこれらの薬剤に抵抗性を示した。FLT3-ITD陽性のAML患者より得た初代培養細胞では、GDCによる4EBP-1の脱リン酸化とMcl-1の発現抑制、ひいては細胞死を、PZD処理でより強力に誘導することを確認した。本研究結果より、FLT3-ITDの強いSTAT5活性化がmTORC1/4EBP1経路を通じてeIF4E会合に影響を与え、PI3K/Akt阻害薬に対し、主にMcl-1のcap依存性の翻訳活性を維持することでアポトーシスを回避することが明らかとなり、予後不良のFLT3-ITD陽性AMLに対する統合的分子標的療法開発に役立つ事を報告した (Oncotarget 6:9189-9205, 2015)。急性骨髄性白血病において最も頻度の高い遺伝子異常であり、予後にも極め重大な影響を及ぼすFLT3-ITDに関して、臨床応用が始まりつつあるPI3K阻害薬に対する耐性発症機構を世界的にいち早く明らかにし、その克服法を見出した本研究は今後の急性骨髄性白血病治療の進展にも重要な意義を有するものと評価出来る。

(2) BCR/ABL、FLT3-ITD、Jak2-V617F等の恒常的活性化型チロシンキナーゼ変異体がGSK3抑制を介してChk1の活性化を促進することで抗癌剤耐性をもたらす、これを解除することによりTKIと種々の抗癌剤が相乗的にアポトーシスを誘導する事を見出し報告した (PLoS One 8:e79478, 2013)。造血器腫瘍を含めて悪性腫瘍において恒常的活性化型チロシンキナーゼ変異体からのシグナルと、抗癌剤誘導性細胞周期チェックポイント機構とのクロストークの分子機序を明らかにしたこと

で、今後の新規治療法開発へも大きく貢献することが期待される。

(3) MPNからAMLに移行した症例からJak2-V617F陽性の白血病細胞株PVTL-1を樹立して細胞内シグナル経路の解析を行い(1)、STAT5の活性化とともにPI3K/Akt経路の活性化活性化を介さずにmTOR/4EBP1経路が活性化し細胞生存シグナルを伝達することを見出し報告した (PLoS One 9:e84746, 2014)。本研究結果と樹立された細胞株は、今後Jak2-V617F陽性白血病の病態解明と、臨床応用が進んでいるJakキナーゼTKIを用いた新規治療法開発へ貢献することが期待される。

(4) Waldenströmマクログロブリン血症の症例から、新規MYD88変異体MYD-88-L695RPPを発見し、この変異体がNFκB経路の活性化を介してBcl-xLの発現を上昇させる事でアポトーシスを抑制することで、造血器腫瘍の進展や治療抵抗性へも関与している事を見出し報告した (Blood Cancer J 5:e314, 2015)。本研究はWaldenströmマクログロブリン血症とその類縁疾患の分子生物学的鑑別診断法の確立に貢献するのみでなく、MYD88変異を有する種々のB細胞腫瘍の病態解析と新規分子標的療法の開発にも寄与するものと考えられる。

(5) PECAM-1(CD31)はBCR/ABL等の異常活性化チロシンキナーゼにてチロシンリン酸化を受けると共にTKIに対する耐性獲得にも関与している事を見出し報告した (Int J Oncol 42:419-428, 2013)。PECAM-1は種々の造血器腫瘍で発現し、細胞内シグナル伝達機構の制御に重要な役割を果たしており、今後治療標的としても更なる検討が必要である。

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 19 件)

1. Nogami A, Oshikawa G, Okada K, Fukutake S, Umezawa Y, Nagao T, Kurosu T, Miura O: FLT3-ITD confers resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors by protecting the mTOR/4EBP1/Mcl-1 pathway through STAT5 activation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 6:9189-9205, 2015. (査読あり) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826077>)
2. Nagao T, Oshikawa G, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Nogami A, Kurosu T, Miura O: A novel MYD88 mutation, L265RPP, in

Waldenstrom macroglobulinemia activates the NF-kappaB pathway to upregulate Bcl-xL expression and enhances cell survival. *Blood Cancer J* 5:e314, 2015. (査読あり) (10.1038/bcj.2015.36)

3. Nagao T, Kurosu T, Umezawa Y, Nogami A, Oshikawa G, Tohda S, Yamamoto M, Miura O: Proliferation and survival signaling from both Jak2-V617F and Lyn involving GSK3 and mTOR/p70S6K/4EBP1 in PVTL-1 cell line newly established from acute myeloid leukemia transformed from polycythemia vera. *PLoS One* 9:e84746, 2014. (査読あり) (10.1371/journal.pone.0084746)

4. Kurosu T, Nagao T, Wu N, Oshikawa G, Miura O: Inhibition of the PI3K/Akt/GSK3 Pathway Downstream of BCR/ABL, Jak2-V617F, or FLT3-ITD Downregulates DNA Damage-Induced Chk1 Activation as Well as G2/M Arrest and Prominently Enhances Induction of Apoptosis. *PLoS One* 8:e79478, 2013. (査読あり) (10.1371/journal.pone.0079478)

5. 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* 42:419-428, 2013. (査読あり) (10.3892/ijo.2012.1729)

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 梅澤 佳央、秋山 弘樹、石田 信也、野上 彩子、押川 学、長尾 俊景、黒須 哲也、三浦 修. PECAM-1 による PI3K/Akt/mTORC1 経路を介した SDF-1 走化性刺激活性化の亢進. 第 76 回日本血液学会 2014.10.31 大阪 □

2. Ayako Nogami, Gaku Oshikawa, Shinya Ishida, Hiroki Akiyama, Yoshihiro Umezawa, Toshikage Nagao, Tetsuya Kurosu, Osamu Miura. FLT3-ITD confers resistance to PI3K/Akt inhibitors by protecting mTOR/eIF4F/Mcl-1

pathway via STAT5. 第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10.31 大阪 □

3. Nogami A, Oshikawa G, Fukutake S, Nagao T, Umezawa Y, Kurosu T, Miura O. Molecular basis for differential responses of FIT3-ITD and TKD to P13K/Akt and proteasome inhibitors. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 11 ~ 13 日, 札幌

4. Nagao T, Umezawa Y, Nogami A, Kurosu T, Miura O. Molecular biological analysis of a novel MYD88 mutation, L265-RPP, in Waldenstrom macroglobulinemia. 第 75 回日本血液学会総会, 2013 年 10 月 11 ~ 13 日, 札幌

5. 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.

6. 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.

7. 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.

〔その他〕

長尾 俊景、三浦 修: Jak2-V617F と Lyn からの GSK3 および mTOR 経路を介した生存と増殖のシグナル伝達機構の新規樹立 Jak2-V617F 陽性 AML 細胞株 PVTL-1 における解析 BioMed サークル (biomedcircus.com/paper_03_24.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 修 (MIURA, Osamu)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究

科・教授
研究者番号：10209710