

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790966

研究課題名(和文) 抗癌剤による造血器腫瘍の活性化チロシンキナーゼ変異体分解誘導機構と治療応用

研究課題名(英文) Mechanisms involved in degradation of activated tyrosine kinase mutants induced by anti-cancer drugs and its clinical application

研究代表者

長尾 俊景 (Nagao, Toshikage)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10622798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄球系腫瘍の病態に深く関与する活性化型Jak2変異体Jak2-V617Fによる生存維持や細胞増殖誘導の機序を明らかにするため、新規樹立Jak2-V617F発現白血病細胞株PVTL-1を用いて、細胞内シグナルの解析を行い、Jak2-V617FはSTAT5を活性化する以外に、恒常的に活性化されたLynと共にGSK3抑制とmTOR/4EBP1経路の活性化をもたらすことで生存と増殖に寄与することを示した。また難治性悪性リンパ腫患者検体から細胞内アダプター因子MYD88の未報告の変異を新規に同定し、導入実験によりこの変異がNF-κB系の恒常的な活性化とアポトーシス抵抗性をもたらすことを示した。

研究成果の概要(英文)：To explore the mechanisms that are involved in the enhanced cell survival and proliferation induced by the activated Jak2 mutant Jak2-V617F, known to be deeply linked to pathogenesis of some myeloid malignancies, we examined newly established Jak2-V617F bearing leukemic cell line PVTL-1. Consequently, not only Jak2-V617F but also the Src family kinase Lyn was constitutively activated and phosphorylated various kinds of intracellular signaling molecules. Additionally, it was suggested that apoptosis may be suppressed in PVTL-1 cells through inactivation of GSK3 by Lyn as well as Jak2-V617F and that activation of the mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway may mediate proliferation signaling from Jak2-V617F and Lyn. On the other hand, we identified a novel mutation of TLRs/IL-1R associated adaptor protein MYD88, MYD88-L265-RPP, from the clinical sample of a Waldenstrom's macroglobulinemia case. Cells expressing this mutant showed significant activation of the NF-κB pathway.

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：造血器腫瘍 Jak2-V617F MYD88

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究代表者はこれまでに造血器腫瘍の病態形成に深く関与する **Jak2-V617F**、**BCR/ABL**、**Flt3-ITD** 等の活性化型チロシンキナーゼ変異体下流のシグナル伝達経路の解析、及びチロシンキナーゼ阻害薬と抗癌剤の相乗効果によって誘導される異常チロシンキナーゼ蛋白のユビキチン化とプロテアソーム分解機構、これに引き続くアポトーシス誘導について研究を進めてきた。特に **Jak2-V617F** 強発現白血病細胞株を用いて、エトポシドなどの抗癌剤による DNA 損傷ストレスが **Jak** キナーゼ阻害薬と相乗的に作用し、**Jak2-V617F** 変異体のプロテアソーム系を介した分解とアポトーシスをもたらすこと、さらに細胞内多機能セリンスレオニンキナーゼ **GSK3** の活性化がこの機序に深く関与していることを明らかにしてきた。これらの知見の臨床応用へ向けて、より臨床に近いモデルにおけるデータの蓄積が必要と考えられていた。

(2) 近年、造血器腫瘍の難治性・治療抵抗性の形成に深く関与する要素として **NF-kB** 経路および **STAT3** の構成的活性化が報告されている。またごく最近、通常は自然免疫反応において **NF-kB** 経路の活性化をもたらす経路の一つである **TLR/IL-1R** 下流のアダプター因子 **MYD88** の変異 **MYD88-L265P** が一部の中高悪性度 B 細胞リンパ腫、さらに難治性緩徐進行性リンパ腫の一種原発性マクログロブリン血症症例の大半においても陽性であることが報告されていた。本研究代表者所属施設経験症例の臨床検体の解析の結果、**MYD88-L265P** とは異なる未報告の **MYD88** 変異 **MYD88-L265-RPP** を同定した。**Jak2-STAT** 系と **NF-kB** 系は相互に影響を及ぼしながら、造血器腫瘍の悪性化や形質転換に関与することが知られており、この変異の解析は本研究の随伴研究として重要と考えられた。

2. 研究の目的

(1) 造血器腫瘍における活性化型チロシンキナーゼ変異体とその下流シグナル伝達経路、特にその活性化や制御に関わり、腫瘍細胞の生存や増殖の調節に深く関与する分子や経路を明らかにし、難治性造血器腫瘍に対する新規分子標的治療の開発を念頭に、より臨床に近い実験モデルを用いてチロシンキナーゼ阻害薬の作用と影響、アポトーシス誘導機構について評価すること。

(2) 新規 **MYD88** 変異による **NF-kB** 経路の活性化、とりわけ細胞の生存維持やアポトーシス抵抗性因子発現への影響を明らかにし、難治性造血器腫瘍における **NF-kB** 系活性化の重要性を評価し、さらに将来的には **Jak2-STAT** 経路との相互作用を解析することにより、チロシンキナーゼ阻害薬を含めた **Jak** 以下のシグナル伝達因子の阻害が、これらの病態に対する新たな分子標的治療戦略

となりうるか探索すること。

またこれら (1) (2) 両者のテーマの進行を通じて、難治性造血器腫瘍に共通、あるいは潜在的に関連し合う治療抵抗性形成の機序や特異的な活性化経路を同定することにより、長期的には化学療法のみでの根治が困難な病態に対する治療のブレイクスルーとなる戦略の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 活性化型チロシンキナーゼ変異体のうち特に **Jak2-V617F** 変異に焦点を当て、同時期に骨髓増殖性腫瘍から急性骨髄性白血病へ進展した症例の臨床検体から樹立した **Jak2-V617F** 発現白血病細胞株 **PVTL-1** 及び他の **Jak2-V617F** 陽性株細胞 (**HEL**) を用いて、ウエスタンブロット法および免疫沈降法による関連シグナル伝達分子の解析、**XTT** アッセイ法による生存率の解析、フローサイトメトリー法による細胞周期・アポトーシス解析等を行い、特異的に活性化する経路やチロシンキナーゼ阻害薬の影響を評価した。

(2) 原発性マクログロブリン血症症例の臨床検体から RNA を抽出し、**RT-PCR** 法により新規 **MYD88** 変異として 3 塩基の欠失および 9 塩基の挿入を伴う **MYD88-L265-RPP** を同定しクローニングを行った。これをベクターコントロール、野生型 **MYD88** および **MYD88-L265P** と共にレトロウイルス用発現ベクターに導入し、**MYD88** 変異陰性細胞株 **BJAB** に感染、各々の **MYD88** の発現を確認した。これらの細胞を用い、導入した **MYD88** 変異の影響について、**NF-kB** 系のゲートキーパー分子である **I κ -B** の活性化や細胞生存の維持に重要な抗アポトーシス因子 **Bcl-XL** の発現をウエスタンブロット法で解析した。また各々の **MYD88** 分子の安定性の差異及び分解機序について評価した。

4. 研究成果

(1) 新規白血病細胞株 **PVTL-1** の解析

① これまでに **Jak2-V617F** 変異陽性細胞株の報告は比較的まれであり、今回樹立した **PVTL-1** は報告ベースで 6 番目の **Jak2-V617F** 発現白血病細胞株である。また変異 **Jak2** アレル量の解析により、**PVTL-1** は **homozygous** に変異を有することが示された。

② **PVTL-1** はサイトカイン非依存性に増殖し、**Jak** キナーゼ阻害薬のみならず、**Src** ファミリーキナーゼ (**SFK**) の阻害作用を有するダサチニブ処理でもその増殖は用量依存性に著明に抑制され、アポトーシスが誘導されたことから、**PVTL-1** 細胞では **Jak2-V617F** と共に **SFK** の活性化がアポトーシス抑制と細胞増殖誘導に必須の役割を果たしていることが示唆された。

③ ウエスタンブロット法による細胞内シグ

ナル伝達因子の解析により PVTL-1 では、Lyn の強発現と共に活性特異部位の恒常的リン酸化が示され、また Lyn は Jak2-V617F と比較してより多くの細胞内質をリン酸化し、かつ Jak2-V617F 自体の活性の調節にも関与している可能性が示唆された。

④同じ Jak2-V617F 変異陽性細胞株である HEL との比較では、どちらの細胞も mTOR/4EBP1 経路の構成的な活性化を認めたが、この活性化は HEL では Jak2-V617F 依存性であるのに対して、PVTL-1 では Jak2-V617F と Lyn の両者に依存性であることが示された。さらに種々の阻害薬を用いた検討により、PVTL-1 では PI3K 下流かつ Akt 非依存性に GSK3 が抑制性のリン酸化を受けており、この細胞のアポトーシスの制御に関与していることが明らかにされた。

⑤以上の結果について、すでに学会および論文で発表した。これらの解析結果は Jak2-V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍の病態解明や、骨髄形成症候群・急性骨髄性白血病への進展機構の解明のみならず、BCR/ABL や Flt3-ITD など他の異常チロシンキナーゼ変異体発現がもたらす異常シグナル伝達経路を制御することを目指した、新たな分子標的治療・戦略の開発につながることを期待される。

(2) 新規 MYD88 変異 L265-RPP の解析

①これまでに *MYD88-L265P* 以外の独立した *MYD88* 変異の報告はなく、今回の欠失および挿入を伴う *MYD88* 変異の報告は世界初であり貴重と考えられた。

②既知の *MYD88-L265P* および新規変異体 *MYD88-L265-RPP* を導入した細胞は、陰性コントロールおよび野生型 *MYD88* 導入細胞と比較して、増殖の有意性は認めないものの、血清除去によるアポトーシス誘導に対して抵抗性を示した。またリポーターアッセイ法により、これら *MYD88* 変異体導入細胞では野生型 *MYD88* 導入細胞と比較して NF- κ B 経路がより活性化している傾向を認めた。

③さらにウエスタンブロット法による、細胞内シグナル伝達因子解析の結果、特に *MYD88-L265-RPP* 導入細胞では、Ik-B の著明なリン酸化、すなわち NF- κ B 経路の活性化と共に、この経路により調節を受ける抗アポトーシス因子 Bcl-XL の発現の明らかな増強を認めた。これらの結果は上記の血清除去によるアポトーシス抵抗性を裏付けるものと考えられた。

④また興味深いことに、これら *MYD88* 変異体は野生型 *MYD88* と比較し半減期が短く不安定であること、かつプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ処理により発現が安定化すること

から、*MYD88* 変異体は野生型と比較してユビキチン化およびプロテアソームを介した分解を受けやすい可能性が示された。さらに免疫沈降法による解析において、ボルテゾミブ処理下で変異型 *MYD88* は下流のシグナル伝達因子 IRAK1 とより強く結合していることが示され、*MYD88* 変異体による NF- κ B 経路の構成的な活性化、すなわち病態形成への深い関与が示唆される結果であった。

⑤以上の内容について、すでに概略を学会発表し、近い将来の論文投稿を予定している。なお近年の報告によれば *MYD88-L265P* 陽性 B 細胞リンパ腫細胞においては、比較的高頻度に構成的な STAT3 の活性化が認められており、IL-6 や IL-10 の分泌を介した NF- κ B 経路と Jak-STAT3 経路との相乗的な病態形成への関与が示唆されている。今回の変異を導入した系が、*MYD88-NF κ B-STAT3* の構成的な活性化の有用なモデルとなる可能性もあり、難治性悪性リンパ腫に対する分子標的治療開発の観点からも重要な知見と考えられた。

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 3 件)

- ① 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*, 査読あり, 9 巻, 2014, e84746, DOI: 10.1371/journal.pone.0084746
- ② 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*, 査読あり, 8 巻, 2013, e79478, DOI: 10.1371/journal.pone.0079478
- ③ 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 Leukemic Cells, *International Journal of Oncology*, 査読あり, 42 巻, 2013, 419-428, DOI: 10.3892/ijo.2012.1729

[学会発表] (計 5 件)

- ① 野上 彩子、押川 学、福武 周作、長尾 俊景、梅澤 佳央、黒須 哲也、三浦 修、Molecular basis for differential response of Flt3-ITD and TKD to PI3K/Akt and proteasome inhibitors、第75回日本血液学会、2013年10月11日～2013年10月13日、札幌
- ② 長尾 俊景、梅澤 佳央、野上 彩子、黒須 哲也、三浦 修、Molecular biological analysis of a novel MYD88 mutation, L265-RPP, in Waldenstrom macroglobulinemia、第75回日本血液学会、2013年10月11日～2013年10月13日、札幌
- ③ 長尾 俊景、山本 正英、押川 学、野上 彩子、呉 楠、黒須 哲也、東田 修二、三浦 修、新規樹立 Jak2-V617F 発現白血病細胞株 PV-T1 での Lyn 活性化を伴う細胞増殖シグナル伝達機構、第74回日本血液学会、2012年10月19日～2012年10月21日、京都
- ④ 押川 学、長尾 俊景、野上 彩子、呉 楠、黒須 哲也、三浦 修、Flt3-ITD 及び Flt3-TKD 発現細胞の分子標的薬への感受性の差異とその分子基盤、第74回日本血液学会、2012年10月19日～2012年10月21日、京都
- ⑤ 黒須 哲也、呉 楠、野上 彩子、押川 学、長尾 俊景、三浦 修、BCR/ABL 発現細胞における Chk1 と p53 を介した細胞周期チェックポイント活性化の相互調節機構、第74回日本血液学会、2012年10月19日～2012年10月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 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〕

BioMed サーカス、研究論文ハイライト、執筆者自身による研究論文レビュー、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』、2014年2月21日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 俊景 (NAGAO, Toshikage)
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10622798

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：