

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461416

研究課題名(和文)細胞周期チェックポイントによる抗癌剤耐性の機序と制御による造血器腫瘍の新規治療法

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy against chemotherapy-resistant hematological malignancies by targeting cell cycle checkpoint mechanisms

研究代表者

黒須 哲也 (Kurosu, Tetsuya)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40361696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血器腫瘍細胞の発症や進展に重要な恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体であるBCR/ABLやJak2-V617Fが、Chk1を介した抗癌剤誘導性チェックポイント活性化を促進する機構におけるp53の役割を検討し、p53の優勢抑制型変異体の発現によりChk1活性化が促進され、異常チロシンキナーゼの阻害薬と抗癌剤との併用によるアポトーシス誘導が阻害される事を明らかにした。一方、Mdm2阻害薬であるnutlin-3によるp53活性化の誘導により、チロシンキナーゼ耐性変異T315I変異陽性のBCR/ABL発現細胞でも、有効な治療効果が期待される事を見出した。

研究成果の概要(英文)：A dominant negative mutant of p53, p53-DD, increases Chk1-mediated G2/M checkpoint activation induced by chemotherapeutics and protects it from down regulation by inhibition of Jak2, BCR/ABL, or the PI3K/Akt pathway in hematopoietic model cell lines 32D and BaF3 or their transformants by BCR/ABL. Furthermore, the p53 activator nutlin-3 synergistically induced apoptosis with chemotherapeutics by inhibiting Chk1-mediated G2/M arrest in these cells, including cells transformed by the T315I mutant of BCR/ABL resistant to various kinase inhibitors in clinical use. Further studies suggest that p53 may inhibit the Chk1 pathway by its transcription-dependent function and through mechanisms involving the proteasomal system. The present study may shed a new light on molecular mechanisms for the therapy resistance of p53-mutated hematological malignancies and would provide valuable information for the development of novel therapeutic strategies against these diseases with dismal prognosis.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液腫瘍学 白血病

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤は、主にDNA損傷を生じp53の誘導等を介して腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するが同時にChk1キナーゼを介した細胞周期チェックポイントを活性化し、主にG2期での細胞周期停止を誘導することで治療抵抗性を生じる。一方、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チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)が臨床応用されている。しかし、TKIのみでは十分な効果が得られなかったり、白血病幹細胞の残存や新たな変異による耐性の獲得で根治は困難である。

申請者らは、造血サイトカインによるPI3K/Akt経路の活性化時にはGSK3の抑制を介して、抗癌剤によるChk1の活性化が亢進し、アポトーシスが回避されることを以前に見出し報告した。さらにその後、BCR/ABLが低分子量G蛋白Rap1を介してB-Raf/MEK/Erk系と共にAkt経路の活性化を増強し、やはりChk1の活性化を亢進することや、この機構を抑制することでimatinib等のTKと種々の抗癌剤が相乗的にアポトーシスを誘導することを報告してきた。また申請者らは、Cyclin D2がGSK3βによりT280のリン酸化されることでユビキチン化/proteasome依存性経路(UPS)により分解され、造血細胞のG0/G1期細胞周期停止を生じる事を見だしているが、抗癌剤処理とTKIによるGSK3β活性化でもChk1のUPSを介した分解を認め、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UPSでの分解を受けたり、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も明らかにしてきた。TKIの効果に関しても、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耐性を克服しうることや、第二世代TKIに完全耐性を示すBCR/ABLのT315I変異体が、腎癌等に対する治療薬sorafenibによって阻害を受けることを明らかにしている)。また、Chk1以外のチェックポイント機構に関しても、p38を介したCdc2抑制によるG2/M期停止による化学療法耐性機構や、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、またp53の発現誘導がChk1活性化を抑制することを見出している。さらには、びまん性大型B細胞リンパ腫(DLBCL)等で染色体転座等により高頻度に高発現を認めるBCL6が、抗癌剤刺激によりUPSを介して分解を受けると共に、リンパ腫細胞の抗癌剤耐性機構に重要な役割

を果たすことも世界に先駆け明らかにしてきた。これらの研究成果の蓄積に基づき、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した根治的な造血器腫瘍治療法の開発を目指すべく本研究の着想に至った。

チェックポイント機構が異常増殖シグナル伝達機構により制御され、抗癌剤耐性をもち腫瘍の難治化に至る過程に関しては、他にほとんど研究が見られず、その分子機構の詳細は不明である。また、Mdm2阻害薬やHSP90阻害薬等は分子標的薬として臨床応用も間近に期待され研究開発が行われているが、TKIや抗癌剤との有効な併用法およびその基礎となる相乗効果の分子機構に関しては、世界的にほとんど研究成果が得られていない。また、最近BCL6によるp53の抑制とそのBCR/ABLによる制御がPh陽性白血病細胞の発症機構との関連で注目されているが、DNA損傷シグナルとの関連での治療応用へ向けての検討はなされていない。

2. 研究の目的

細胞周期チェックポイント機構は、秩序立った細胞周期の進行とDNAを安定的に維持するため重要な役割を果たしている。一方腫瘍細胞の化学療法薬耐性獲得においても、特にChk1を介したチェックポイント機構によるG2/M期細胞周期停止とアポトーシ回避機構が、極めて重要な役割を果たしている。本研究は申請者らの研究成果を基に、造血器腫瘍の発症と進展に重要なBCR/ABL、Flt3-ITD、Jak2-V617F等の恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体とChk1活性化機構との関連、p53とChk1活性化とのクロストーク機構、悪性リンパ腫で高頻度に発現異常を認めるBCL6によるチェックポイント活性化の抑制機構を明らかにし、分子標的薬によるこれらの調節機構の制御法を検討することで、難治性造血器腫瘍の根治を目指す新規の統合的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

マウス造血前駆細胞株32DC13やBaF3およびこれらに由来する細胞株は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。BCR/ABLをテトラサイクリン依存性に発現するBaF3細胞株Ton.B210はG.Daley博士より供与され、また、BCR/ABLのT315I変異体を発現する細胞株は以前の研究により樹立されたものを用いた。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。

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

血細胞モデル株に、p53の優勢抑制型変異体 p53-DDを発現させたり、Mdm2阻害薬nutlin-3によりp53を活性化させ、チロシンキナーゼ変異体に対する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。

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。pRevTRE-p53-DDはpBABE-hygro-p53-DDからBamHI/SalI断片を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で一晚攪拌し、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、DiO6c6試薬で染色した後、FACS-Caliburで検出した。

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。

4. 研究成果

(1)造血器腫瘍細胞の発症や進展に重要な役割を果たす恒常的活性化チロシンキナーゼ変異体であるBCR/ABL, Jak2-V617FおよびFLT3-ITDを発現した白血病細胞およびモデル造血細胞株を用いて検討を行った。これらのチロシンキナーゼ変異体を抑制することで、抗癌剤誘導性のChk1活性化を介したG2/M期での細胞周期停止機構は抑制され、アポトーシスの誘導が相乗的に誘導されたが、p53の優勢抑制型変異体p53-DDの発現により、この抗癌剤耐性機構を阻止することが出来る事を見出した。また、Mdm2阻害薬であるnutlin-3によるp53活性化の誘導により、チロシンキナーゼ耐性変異T315I変異陽性のBCR/ABL発現細胞を含めてこれらの細胞において、抗癌剤誘導性のChk1活性化を介したG2/M期での細胞周期

停止機構は抑制され、アポトーシスの誘導が相乗的に誘導された。更に、p53による抗癌剤誘導性Chk1活性化の抑制は、p53の転写活性化能に依存し、PI3K/Akt/GSK経路非依存性にproteasomeを介した経路により生じる事を見出すことが出来た。これらの結果はChk1とp53とを介したDNA損傷誘導性チェックポイント活性化調節の分子機構解明へ向けて重要な意義を有するのみでなく、BCR/ABLのT315I変異を含めた治療抵抗性造血器腫瘍に対する化学療法薬とp53活性化をもたらすMdm2阻害薬などを併用した統合的分子標的療法の新規開発に直結しうる臨床的にも極めて重要な意義を有する(Oncotarget, 7:44448-44461, 2016)。

(2) 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得る事を報告した (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、予後にも極めて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。

(3) 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する。

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6件)

1. Umezawa Y, Kurosu T, Akiyama H, Wu N, Nogami A, Nagao T, Miura O: Down regulation of Chk1 by p53 plays a role in synergistic induction of apoptosis by chemotherapeutics and inhibitors for Jak2 or BCR/ABL in hematopoietic cells. *Oncotarget* 7:44448-44461, 2016. (査読あり)(10.18632/oncotarget.9844)
2. 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)
3. Nagao T, Oshikawa G, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Nogami A, Kurosu T, Miura O: A novel MYD88 mutation, L265RPP, in Waldenström 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)
4. 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)

[学会発表](計6件)

1. 野上 彩子、岡田 啓五、押川 学、石田 信也、秋山 弘樹、梅澤 佳央、黒須 哲也、三浦 修. Pim キナーゼによる mTOR 経路促進を介した FLT3-ITD による Bortezomib 抵抗性獲得機構. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.13、神奈川県・横浜市
2. 梅澤 佳央、秋山 弘樹、岡田 啓吾、石田 信也、野上 彩子、押川 学、黒須 哲也、三浦 修. PECAM-1 による PI3K/Akt/mTORC1 経路を介した SDF-1 誘導性走化能の亢進機構. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.14、神奈川県・横浜市
3. 野上 彩子、岡田 啓五、押川 学、石田 信也、秋山 弘樹、梅澤 佳央、黒須 哲也、三浦 修. FLT3-ITD による STAT5、Pim-1 と mTOR 経路を介した Bortezomib 耐性誘導機構. 第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10.16、石川県・金沢市
4. Yoshihiro Umezawa, Hiroki Akiyama, Keigo Okada, Shinya Ishida, Ayako Nogami, Gaku Oshikawa, Tetsuya Kurosu, Osamu Miura. PECAM - 1 enhances SDF-1-induced chemotaxis mediated through activation of the PI3K/Akt/mTORC1 pathway. 第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10.16、石川県・金沢市
5. 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 大阪府・大阪市
6. 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 大阪府・大阪市

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・非常勤講師
研究者番号：40361696