

氏名	うちらは ゆうき 内原 脩貴
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2020年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	融合型チロシンキナーゼによる形質転換誘導の分子機構の解析 および関連疾患に対する新規治療法の開発
論文審査委員	(主査) 田村 悦臣 教授(薬学博士) (副査) 服部 豊 教授(医学博士) 長谷 耕二 教授(博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 序論

チロシンキナーゼは、サイトカインや増殖因子によって活性化され、細胞の増殖や分化、運動を制御する重要なシグナル伝達分子である。遺伝子融合などのゲノム変異が生じ、活性制御機構が破綻した恒常的活性型チロシンキナーゼが発現すると、様々ながんの発生を誘導する。t(9;22)(q34;q11) 染色体転座により生じるセリン/スレオニンキナーゼ BCR と非受容体型チロシンキナーゼ ABL から成る融合型チロシンキナーゼ BCR-ABL は、慢性骨髄性白血病 (CML) の原因となる。BCR-ABL は、BCR 領域に存在するコイルドコイルドメインを介して多量体を形成し、恒常的に活性化し、下流シグナル分子である STAT5 や PI3K/Akt 経路を介して細胞の形質転換を誘導する。また、t(2;5)(p23;q35) 染色体転座により生じる核小体に局在する多機能タンパク質 NPM と受容体型チロシンキナーゼ ALK から成る融合型チロシンキナーゼ NPM-ALK は、未分化大細胞リンパ種 (ALCL) の原因となる。NPM-ALK は、NPM 領域のオリゴマー化ドメインを介して二量体を形成し、恒常的に活性化し、STAT3 や PI3K/Akt 経路、MEK/ERK 経路を介して細胞の形質転換を誘導する。

現在、CML では BCR-ABL を標的とした分子標的薬を用いた治療が行われているが、薬剤耐性の出現が問題となっている。また、ALCL では高用量メトトレキサートを含む多剤併用療法が適用されているが、副作用の低減が重要な課題である。そのため、薬剤耐性を克服した新規 CML 治療薬の開発や NPM-ALK 融合型チロシンキナーゼによる発がん誘導機構の理解に基づいた既存治療法の改善や新規治療法の開発が必要である。

### BCR-ABL 発現細胞におけるタキソジオンによるアポトーシス誘導機構の解析

#### 【目的】

BCR-ABL 陽性 CML の治療は、イマチニブなどの ATP に競合して作用する BCR-ABL 阻害薬が用いられており、高い奏効率を示している。しかしながら、イマチニブの長期

投与により、*bcr-abl* 遺伝子の突然変異による BCR-ABL 阻害薬耐性が生じることが問題となっている。そのため、薬剤耐性を克服した BCR-ABL 阻害薬の開発が望まれるとともに、これまでの BCR-ABL 阻害薬と異なる作用機序を持つ CML の治療薬の開発が重要だと考えられる。

ヒノキ科の針葉樹であるラクウショウの球果に含まれるタキソジオンは、キノンメチド構造を持つアビエタンジテルペン化合物である。これまでに、タキソジオンが、CML 患者由来の BCR-ABL 陽性細胞である K562 細胞に対して、細胞毒性を示すことが報告されていたが、その分子機構は不明であった。そこで、本研究では、タキソジオンが BCR-ABL 陽性細胞の細胞死を誘導する分子機構を解明することにより、タキソジアンの CML の新規治療薬としての可能性を検討した。

#### 【結果および考察】

K562 細胞において、タキソジオンは、sub-G<sub>1</sub> 期の細胞割合を増加させ、DNA の断片化を誘導したことから、アポトーシスを誘導することが明らかになった。蛍光プローブ DCFH-DA を用いた解析により、K562 細胞において、タキソジオンが活性酸素種 (ROS) の産生を誘導することを見出した。ROS の主要な産生源であるミトコンドリア呼吸鎖 (MRC) 複合体に及ぼすタキソジアンの影響を検討した結果、タキソジオンは、MRC 複合体 III と複合体 V の活性を抑制した。抗酸化剤である *N-acetylcysteine* (NAC) を用いて、タキソジオンによる ROS の増加を抑制すると、K562 細胞のアポトーシス誘導は抑制された。また、NAC は、タキソジオンによる MRC 複合体 V の阻害作用を抑制したが、複合体 III の阻害作用を抑制しなかった。この結果から、タキソジオンは複合体 III の活性を直接阻害することにより ROS 産生を誘導し、産生した ROS を介して複合体 V の活性を抑制すると考えられた。K562 細胞において、MRC 複合体 III 阻害剤であるアンチマイシン A は ROS 産生および細胞死を誘導したが、MRC 複合体 V 阻害剤であるオリゴマイシンは ROS 産生や細胞死を誘導しなかった。以上より、タキソジオンは MRC 複合体 III の活性を阻害し、ROS 産生を誘導することにより、K562 細胞のアポトーシスを引き起こすと推測された。

さらに、K562 細胞において、タキソジオンは BCR-ABL や STAT5、Akt をミトコンドリアに集積させることを見出した。タキソジオンは、STAT5 標的遺伝子である *c-myc* の発現を減少させ、Akt により活性が阻害される転写因子 FOXO3 の標的遺伝子である *Bim* の発現を増加させた。また、タキソジオンによる BCR-ABL や STAT5、Akt のミトコンドリアへの集積や *c-myc* mRNA の発現低下、*Bim* mRNA の発現誘導は NAC により抑制された。したがって、タキソジオンは、ROS を介して BCR-ABL や STAT5、Akt のミトコンドリアへの集積を誘導し、これらの分子の活性を阻害することによりアポトーシスを誘導することが示唆された。さらに、タキソジオンは、野生型 p190<sup>BCR-ABL</sup> 発現 Ba/F3 細胞だけでなく、BCR-ABL 阻害薬に耐性を示す p190<sup>BCR-ABL T315I</sup> 変異体を発現した Ba/F3 細胞においても、ROS の産生を介してアポトーシスを誘導した。本研究を通して、タ

キソジンによる ROS を介した BCR-ABL 陽性細胞のアポトーシス誘導機序を解明し、タキソジンが BCR-ABL 阻害薬に耐性を示す CML の治療に有効な薬剤として応用できる可能性を示した。

## NPM-ALK 発現細胞におけるメトトレキサートによるアポトーシス誘導機構の解析

### 【目的】

現在、ALCL は、高用量のジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 阻害剤であるメトトレキサートを含む多剤併用療法により治療されている。しかしながら、メトトレキサートによる副作用が問題となっており、副作用の回避を目的に、THF の枯渇を解除するロイコボリン (フォリン酸) 救援療法が行われている。近年、42 種類の細胞株を用いた解析により、メトトレキサートが NPM-ALK 陽性 ALCL 患者由来の細胞株に対して高い感受性を示すことが報告されているが、その分子機構は不明である。本研究ではメトトレキサートが、NPM-ALK 発現細胞に対して細胞死を誘導する分子機構を解明し、メトトレキサートを用いた ALCL 治療の有用性を実証することを目的とした。

### 【結果および考察】

NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞および NPM-ALK 陽性 ALCL 患者由来細胞株である Ki-JK 細胞において、メトトレキサートは、臨床で用いられる濃度より非常に低い濃度で、sub-G<sub>1</sub> 期の細胞割合の増加および DNA の断片化を誘導し、アポトーシスを誘導した。これまでに、ALK 陽性 ALCL では、アポトーシス抑制因子である MCL-1 が高発現しており、また、がん抑制因子である p53 が野生型であることが報告されている。メトトレキサートは、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞において、MCL-1 の発現低下および p53 タンパク質や p53 標的遺伝子である p21 mRNA、BAX mRNA の発現を誘導した。さらに、メトトレキサートは、STAT3 のリン酸化や核内移行、STAT3 標的遺伝子である c-myc mRNA の発現を抑制した。STAT3 阻害剤である LLL12 が、MCL-1 の発現低下や p53 の活性化を引き起こし、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞のアポトーシスを誘導したことから、メトトレキサートは STAT3 の活性を抑制することにより、MCL-1 の発現低下と p53 の活性化を介して、アポトーシスを誘導すると考えられた。さらに、フォリン酸により THF の枯渇を抑制すると、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞におけるメトトレキサートによる STAT3 の活性阻害作用や MCL-1 の発現低下、p53 の活性化およびアポトーシス誘導は抑制された。したがって、メトトレキサートは THF の枯渇を介して、NPM-ALK の下流で STAT3 の活性を阻害することによりアポトーシスを誘導することが示唆された。

これまでに、NPM-ALK は、直接 STAT3 をリン酸化することが報告されているが、メトトレキサートは、NPM-ALK のキナーゼ活性に影響を及ぼさなかった。また、メトトレキサートを結合させたビーズを用いて、メトトレキサートと NPM-ALK や STAT3 との結合を検討した結果、メトトレキサートは DHFR とは結合したが、NPM-ALK や STAT3 とは結合しなかった。STAT3 の特異的なホスファターゼとして PTPRT が知られており、

メトトレキサートは、PTPRT の活性を制御することにより、STAT3 のリン酸化を抑制する可能性が考えられた。

本研究により、低濃度のメトトレキサートが NPM-ALK の重要なシグナル伝達分子である STAT3 のリン酸化を阻害し、顕著なアポトーシスを誘導するという分子機構が明らかとなったことにより、NPM-ALK 陽性 ALCL 治療に用いるメトトレキサートの投与量を低減できる可能性を提唱した。

## NPM-ALK の核小体への局在制御機構および核小体における NPM-ALK の機能解析

### 【目的】

NPM-ALK は細胞質だけでなく、核小体にも局在する。TPR-ALK の様な細胞質にのみ局在する ALK 融合タンパク質においても、形質転換能が認められることから、細胞質に局在する NPM-ALK が形質転換に重要であると考えられてきた。これまでに私は、NPM-ALK がキナーゼ活性に依存して核内に局在することを見出しており (Uchihara Y *et al. PLoS One*. 2017)、核内に局在する NPM-ALK もまた、何らかの機能を持つ可能性が考えられた。本研究では、NPM-ALK の核内における機能および局在制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 【結果および考察】

NPM-ALK および NPM-ALK のキナーゼ活性欠損変異体 (K210R) を発現させた Ba/F3 細胞の細胞質、核質、核小体画分を調製し、NPM-ALK の細胞内局在を検討した。NPM-ALK は細胞質や核質に加え、核小体にも局在したが、K210R 変異体は主に細胞質に局在した。また、共免疫沈降法により、NPM-ALK と核小体タンパク質 NPM との相互作用を検討した結果、NPM-ALK は、K210R 変異体に比べて、NPM と強く相互作用した。NPM-ALK の核小体局在に及ぼす NPM の影響を検討するために、NPM<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> MEF 細胞および p53<sup>-/-</sup> MEF 細胞に NPM-ALK を発現させ、それらの細胞内局在を検討した。p53<sup>-/-</sup> MEF 細胞において、NPM-ALK は細胞質、核質、核小体に局在した。一方で、NPM<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> MEF 細胞において、NPM-ALK は細胞質にのみ局在した。NPM<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> MEF に NPM を再構築すると、NPM-ALK は核質や核小体に局在することが確認された。以上の結果から、NPM は活性化した NPM-ALK と強く相互作用し、NPM-ALK の核質や核小体への局在を誘導することが示唆された。

核小体における NPM-ALK の機能を明らかにするために、核小体に局在する NPM-ALK の結合分子の同定をめざした。コントロール Ba/F3 細胞と NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞の核小体抽出液を作製し、抗 Flag 抗体を用いて NPM-ALK を免疫沈降した後、Flag ペプチドを用いて NPM-ALK 複合体を溶出した。その後、質量分析を行い、核小体 NPM-ALK に結合する分子として、EBNA1-binding protein 2 (EBP2) および RNA helicase DDX21 を同定した。核小体画分を用いた免疫沈降・イムノブロット法により、NPM-ALK が EBP2 および DDX21 と相互作用していることが確認された。また、チロシンホスフ

ァターゼ阻害剤である Pervanadate 存在化において、NPM-ALK 発現細胞では、EBP2 および DDX21 のチロシンリン酸化が誘導されたが、K210R 変異体発現細胞では、これらの分子のリン酸化は誘導されなかった。したがって、核小体において、NPM-ALK は EBP2 および DDX21 と結合し、これらの分子のチロシン残基をリン酸化する可能性が示唆された。

NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞において、EBP2 をノックダウンすると、細胞周期が G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止し、増殖が抑制された。一方で、DDX21 をノックダウンしても、細胞周期は停止しなかった。また、EBP2 をノックダウンした NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞では、p53 タンパク質発現や *p21* mRNA および p21 タンパク質発現が誘導された。したがって、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞において、EBP2 は p53 の活性化を抑制することにより、細胞増殖を誘導することが示唆された。

また、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞において、EBP2 をノックダウンすると、Akt のリン酸化が亢進し、Akt の活性が増強している可能性が示唆された。Akt 阻害剤イパタセルチブは、EBP2 のノックダウンによる p53 の活性化を抑制した。さらに、Akt の下流分子である mTORC1 の阻害剤ラパマイシンの処理および mTORC1 の構成因子 Raptor のノックダウンにより、EBP2 のノックダウンによる p53 の活性化は抑制された。また、Ki-JK 細胞の核小体においても、内在性の NPM-ALK が EBP2 と相互作用することが確認された。Ki-JK 細胞において、EBP2 をノックダウンすると、p53 の活性化が誘導され、細胞周期が G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止した。さらに、Ki-JK 細胞における EBP2 のノックダウンによる p53 の活性化は、イパタセルチブやラパマイシンにより抑制された。以上の結果から、NPM-ALK 発現 Ba/F3 細胞だけでなく、ALCL 患者由来細胞においても、EBP2 は、Akt および mTORC1 の活性を抑制することで、p53 の活性化を抑制することが示唆された。

これまでに、Akt や mTORC1 は、Mdm2 を核小体に隔離したり、Mdm2 と p53 の相互作用を抑制することで、p53 を安定化させることが報告されている。EBP2 のノックダウンにより、NPM-ALK 発現細胞における p53 mRNA 発現量は変化しなかったことから、EBP2 のノックダウンは、Mdm2 による p53 の分解を抑制し、p53 の安定化を誘導した可能性が考えられる。

本研究により、核小体に局在する NPM-ALK は、EBP2 と相互作用し、p53 の活性を負に制御することで、NPM-ALK による形質転換に寄与しているという新しいモデルが提唱された。EBP2 をノックダウンしても DNA 傷害は誘導されなかったことから、EBP2 の阻害剤は、DNA 傷害による二次性がんのリスクや副作用の少ない NPM-ALK 陽性 ALCL の治療薬になりうると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

染色体転座により生じるセリン/スレオニンキナーゼ BCR と非受容体型チロシンキナーゼ ABL から成る融合型チロシンキナーゼ BCR-ABL は、慢性骨髄性白血病 (CML) の原因遺伝子である。また、核小体に局在する多機能タンパク質 NPM と受容体型チロシンキナーゼ ALK から成る融合型チロシンキナーゼ NPM-ALK は、未分化大細胞リンパ種 (ALCL) の原因遺伝子となる。これらは恒常的に活性化し、STAT3 や STAT5、PI3K/Akt 経路、MEK/ERK 経路を介して細胞の形質転換を誘導する。現在、CML や ALCL では、融合遺伝子を標的とした分子標的薬を用いた治療や高用量メトトレキサートを含む多剤併用療法が適用されているが、薬剤耐性や副作用の低減が重要な課題である。

本博士論文において申請者は、薬剤耐性や副作用を克服した融合型チロシンキナーゼ依存性の血液系のがんの治療薬の開発や発がん誘導機構の理解に基づいた既存治療法の改善を目指した。その結果、ヒノキ科ラクウショウの球果に含まれるタキソジオンの BCR-ABL 陽性細胞の細胞死誘導のメカニズムとして、活性酸素種 (ROS) を介した BCR-ABL や STAT5、Akt のミトコンドリアへの集積を誘導し、これらの分子の活性を阻害することによりアポトーシスを誘導することを示した。また、NPM-ALK 発現細胞におけるメトトレキサートによるアポトーシス誘導機構の解析により、低濃度のメトトレキサートが NPM-ALK の重要なシグナル伝達分子である STAT3 のリン酸化を阻害し、顕著なアポトーシスを誘導するという分子機構を明らかにした。さらに、NPM-ALK の核小体への局在制御機構および核小体における NPM-ALK の機能解析により、核小体に局在する NPM-ALK は、EBP2 と相互作用し、p53 の活性を負に制御することで、NPM-ALK による形質転換に寄与しているという新しいモデルを提唱した。

以上のように、申請者は融合型チロシンキナーゼ依存性の血球系発がんの形質転換機構の解明および新規分子標的を明らかにできた。この成果は、血液がんの薬物治療による克服へ向けた光明であり、学術的にも臨床的にも高い価値がある。研究成果は一流の学術誌に掲載され、申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺知識も十分であり、博士 (薬科学) を授与するにふさわしいと判断した。

## 論文目録

### 1. 主論文に関する原著論文

Yuki Uchihara, Reiko Komori, Kenji Tago, Hiroomi Tamura, Megumi Funakoshi-Tago, Methotrexate significantly induces apoptosis by inhibiting STAT3 activation in NPM-ALK-positive ALCL cells, *Biochemical Pharmacology*, 170:113666, 2019

Yuki Uchihara, Kenji Tago, Hidetoshi Taguchi, Yuji Narukawa, Fumiyuki Kiuchi, Hiroomi Tamura, Megumi Funakoshi-Tago, Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation, *Biochemical Pharmacology*, 154:357-372, 2018

### 2. 参考論文（申請者が著者である、主論文に関する原著論文以外の論文）

Yuki Uchihara, Tomoyuki Ohe, Tadahiko Mashino, Takayuki Kidokoro, Kenji Tago, Hiroomi Tamura, Megumi Funakoshi-Tago, *N*-Acetyl cysteine prevents activities of STAT3 inhibitors, Stattic and BP-1-102 independently of its antioxidant properties, *Pharmacological Reports*, 71(6):1067-1078, 2019

Yuki Uchihara, Kenji Tago, Megumi Funakoshi-Tago, The mechanisms of taxodione-induced apoptosis in BCR-ABL-positive leukemia cells, *Folia Pharmacologica Japonica*, 153(4):147-154, 2019 (Review article)