博士学位論文 2019 年度

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

【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

内原　脩貴

第1章　序論

生体を構成する細胞が、周囲の環境の変化を速やかに察知し対応することで、生体の恒常性は維持される。細胞外からの刺激が受容体で認識されると、細胞内シグナル伝達経路が活性化され、情報が核内へ伝達される。その後、遺伝子の転写調節が起こり、細胞の増殖や分化、形態変化などの生命現象が制御される。チロシンキナーゼは、受容体やシグナル分子のチロシン残基をリン酸化することにより、src homology 2 (SH2) ドメインや phosphotyrosine-binding (PTB) ドメインを持つタンパク質の結合を引き起こし、細胞内シグナル伝達経路を起動する重要なシグナル分子である。チロシンキナーゼは、構造上、細胞膜貫通領域を持つ受容体型チロシンキナーゼと、細胞膜貫通領域を持たない非受容体型チロシンキナーゼに大別される。受容体型チロシンキナーゼは、リガンドが結合すると多量体を形成し、互いをリン酸化することで活性化する。非受容体型チロシンキナーゼは、サイトカイン受容体や細胞接着因子などの受容体と共役しており、リガンドが結合することにより多量体を形成し、活性化する。正常な細胞内シグナル伝達経路の活性化において、チロシンキナーゼの活性が厳密に制御されることが要求されるが、染色体転座などの遺伝子の異常により、活性制御機構が破綻したチロシンキナーゼが生じると、がんなどの疾患を誘起することが知られている。

がんは、心疾患や脳血管疾患と同様に、世界の主要な死亡原因であり、2018 年においては、日本で死因の第一位、アメリカで死因の第二位を占めている。早期発見や新規的な治療法の開発により、年々、多くのがんで死亡率が低下し、5 年生存率が増加しているが、未だ、がんの再発や難治性がんなどの多くの解決すべき課題が残されている。腫瘍のゲノムには多くの遺伝子変異が認められるが、一般的には、その内 2〜8 個が、がんの発生や悪化の直接的な原因となるドライバー変異である。チロシンキナーゼを恒常的に活性化させるドライバー変異の多くは、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt 経路や Ras-Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路、Janus kinase (JAK)-Signal transducers and activators of transcription (STAT) 経路などのシグナル伝達経路の異常を誘起し、がんの特徴である、自律性増殖やアポトーシス抵抗性、代謝変化、ゲノム不安定性、転移などの悪性形質を誘導することが知られている。

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia; CML) や B 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia; ALL)、未分化大細胞リンパ腫 (Anaplastic large cell lymphoma; ALCL) などにおいて、染色体転座によりチロシンキナーゼの融合遺伝子が生じ、恒常的に融合型チロシンキナーゼが活性化することで細胞のがん化を誘導することが知られている。

CML や B 細胞性 ALL 患者において、染色体転座により産生する融合遺伝子 *Breakpoint cluster region-abelson* (*bcr-abl*) が認められる。BCR-ABL は活性型融合チロシンキナーゼであるため、CML や B 細胞 ALL の治療において、BCR-ABL 阻害薬が広く用いられており、高い治療効果を示している。しかしながら、BCR-ABL 阻害薬に耐性を示す腫瘍

の出現が問題となっており、これまでのBCR-ABL阻害薬と異なる作用機序を持つBCR-ABL陽性CMLやB細胞性ALLの治療薬の開発が重要だと考えられる。これまでに、Tayarani-Najaranらにより、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る。タキソジオンは、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、アビエタンジテルペン化合物である。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析することにより、BCR-ABL陽性CML、ALLに対する新規治療薬としてのタキソジオンの可能性を検討した (**第２章**)。

1985年、非ホジキンリンパ腫において、CD30の発現で特徴づけられる一群が存在することが見出され、CD30陽性の非ホジキンリンパ腫としてALCLの概念が定義された。現在のWHO分類では、ALCLは、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫 (primary cutaneous ALCL; pcALCL) と全身性未分化大細胞リンパ腫 (systemic ALCL; sALCL) に分けられ、さらに、sALCLはanaplastic lymphoma kinase (ALK) 発現の有無により、ALK陽性ALCLとALK陰性ALCLの2種類に分けられる。1980年代後半に、ALCLでt(2;5)(p23;q35)染色体転座が認められることが報告された。この染色体転座により、2p23に存在するALK遺伝子と5q35に存在するnucleophosmin (NPM) 遺伝子が融合し、融合タンパク質nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) が産生される。NPM-ALKは、ALK陽性ALCL患者の約8割で認められる。NPMは、主に核小体に局在する多機能タンパク質であり、ALKは受容体型のチロシンキナーゼである。NPM-ALKは、N末側のNPM領域にオリゴマー化ドメインを、C末側のALK領域にチロシンキナーゼドメインを持ち、二量体を形成することで、恒常的に活性化し、細胞を形質転換させる。

NPM-ALK陽性ALCL患者は、現在、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が、メトトレキサートによる副作用が問題となっている。近年、メトトレキサートが、NPM-ALK陽性ALCL患者由来細胞株に対して高い感受性を示すことが報告された。本研究では、メトトレキサートがNPM-ALK発現細胞の細胞死を誘導する分子機構を解析した (**第３章**)。

NPM-ALK陽性ALCLの根治を目指すためには、その発がん分子機構を正確に理解することが重要である。NPM-ALKは細胞質だけでなく、核小体にも局在する。TPR-ALKなどの細胞質にのみ局在するALK融合タンパク質が形質転換能を示すことから、細胞質に局在するNPM-ALKが形質転換に重要で、核内におけるNPM-ALKは重要ではないと考えられてきた。そのため、核内におけるNPM-ALKの機能は詳細に解析されてこなかった。一方で私は、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、核内に局在するNPM-ALKもまた、何らかの機能を持つ可能性を考えた。本研究では、核小体に局在するNPM-ALKの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 (**第４章**)。

第２章　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、タキソジオンの 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_1 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オ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 $p190^{BCR\text{-}ABL}$ 発現 Ba/F3 細胞だけでなく、BCR-ABL 阻害薬に耐性を示す $p190^{BCR\text{-}ABL\ T315I}$ 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。

第３章　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_1 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。

第４章　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、$NPM^{-/-}/p53^{-/-}$ MEF 細胞および $p53^{-/-}$ 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。$p53^{-/-}$ 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、$NPM^{-/-}/p53^{-/-}$ MEF 細胞において、NPM-ALK は細胞質にのみ局在した。$NPM^{-/-}/p53^{-/-}$ 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_0/G_1 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_0/G_1 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。

【主論文に関する原著論文】

1. Uchihara Y, Komori R, Tago K, Tamura H, Funakoshi-Tago M.
   Methotrexate significantly induces apoptosis by inhibiting STAT3 activation in NPM-ALK-positive ALCL cells, ***Biochemical Pharmacology***, 170:113666, 2019
2. Uchihara Y, Tago K, Taguchi H, Narukawa Y, Kiuchi F, Tamura H, Funakoshi-Tago M.
   Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation, ***Biochemical Pharmacology***, 154:357-372, 2018