

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

造血器腫瘍発症におけるアダプター分子 Lnk の機能解析と 新たな治療標的の探索

研究代表者 多林 孝之(総合医療センター 血液内科)

研究分担者 木崎 昌弘*, 得平 道英*, 渡部 玲子*, 阿南 朋恵*,
佐川 森彦*, 富川 武樹*, 木村 勇太*, 高橋 康之*

緒 言

Lnkは主に造血器細胞に発現するアダプター分子であり、それ自体酵素活性を持たないもののレセプターチロシンキナーゼと結合しサイトカインシグナルを抑制的に制御している。Lnkのノックアウトマウスでは野生型のマウスに比べて造血幹細胞が著しく増加し骨髄増殖性腫瘍(MPN)様の病態を呈することが分かっている(Velazquez L, et al. J Exp Med 2002;195:1599)。また、近年、骨髄増殖性腫瘍において高頻度で認められるJAK2V617F変異を持たないMPN例でLnkの変異が認められたという報告がなされている(Oh ST, et al. Blood 2010;116:988. Lasho TL, et al. N Engl J Med 2010;363:1189)。ことからLnkが造血幹細胞や造血器腫瘍の増殖を抑え、それらの産生と維持に非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。慢性骨髄性白血病(CML)では染色体の転座によってBcr/Abl融合遺伝子が作られ、その融合遺伝子産物の強力なチロシンキナーゼ活性によってJAK/Stat経路, PI3K/Akt経路, MAPK経路などの細胞の増殖や不死化に促進的に働くさまざまな細胞内伝達経路が恒常的に活性化され、このことがCMLの病態と強く関連している。近年、Bcr/Ablチロシンキナーゼに対する特異的な阻害剤であるイマチニブの登場によってその予後は飛躍的に改善したが分子遺伝学的完全寛解後にイマチニブを中止すると高率に再発することが報告されている。また、CML加療中にイマチニブに耐性を持つ遺伝子変異を生じ治療抵抗性になる例も報告されている。このような遺伝子変異のうちT315I変異をもったCML細胞はイマチニブのみならずBcr/Abl以外のチロシンキナーゼを抑制する薬剤に対しても耐性をもつことが分かっている。これらのことからCMLの治療にはチロシンキナーゼ阻害剤の他に新たな治療法の開発が急務となっている。造血器腫瘍細胞株と臨床検体を使用した研究からLnkが

正常造血細胞のみならず、CMLを初めとしたさまざまな造血器腫瘍細胞において、正常造血幹細胞より、造血器腫瘍細胞においてより多く発現していることが報告されている(Gery S, et al. Exp Hematol 2009;37:e2)。また、申請者らは予後不良の急性骨髄性白血病細胞にて発現が認められる変異Flt3にもLnkは会合しその増殖を抑制することを見出した(Lin DC, Tabayashi T, et al. Blood 2012;120:3310)。更に、Lnkはレセプター型チロシンキナーゼのみならずJAK2など非レセプターチロシンキナーゼに対しても抑制的に働くことが分かっている(Bersenev A, et al. J Clin Invest 2008;118:2832)。このようにLnkは種々の造血器腫瘍において重要な役割を果たしていることが報告されており、造血器腫瘍の病態を明らかにし治療を開発するためにLnkの抗白血病効果の機序を解明することは重要と考えられる。

材料と方法

- 1) 造血器腫瘍細胞株のK562細胞と、ヒトBcr/Abl遺伝子を強制発現させたマウスの造血細胞株であるBa/F3細胞に遺伝子導入によってLnkを強制発現させ、trypan blue dye exclusion assayとコロニーアッセイ法を用いLnkによる増殖抑制の効果を調べた。
- 2) Lnkを強制発現させたK562細胞より蛋白を抽出しレセプター蛋白やチロシンキナーゼについてLnkとの会合の有無をImmunoprecipitation法を用いて検討した。

結 果

- 1) Lnkの造血器細胞に対する細胞増殖抑制作用と機序についてCML細胞株を用いて検討を行った。Lnkを強制発現させたK562細胞と、LnkとBcr/Abl遺伝子を共発現させたBa/F3細胞ににおいてLnkはいずれの細胞増殖を抑制した。また、FACSによるアポトーシスアッセイを行ったところLnkによっていずれの細胞に

* 総合医療センター 血液内科

においてもアポトーシスの誘導が認められた。

- 2) Lnkを強制発現させたK562細胞においてBcr/Abl細胞内からのシグナル伝達経路のリン酸化の状態を調べたところLnkはStat5のリン酸化を強力に抑制したがBcr/Abl, MAPK経路, PI3K経路のリン酸化には影響を及ぼさなかった。更にCML細胞においてはLnkは直接Stat5と会合し, 下流のシグナルを抑制した。

考 察

Lnkを強発現しているヒトCML細胞株と, Lnkを強制発現させたマウスCML細胞を用いた実験にてLnkはStat5を直接的に脱リン酸化しCML細胞のアポトーシスを誘導することによってその増殖を抑制することが示された。

研究成果リスト

論文

- 1) Sagawa M, Tabayashi T, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Kizaki M. TM-233, a novel analog of ACA,

induces cell death in myeloma cells by inhibiting both JAK/STAT and proteasome activities. Cancer Sci 2015 Jan 23. doi: 10.1111/cas.12616.

- 2) Tokuhira M, Kimura Y, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Sakai R, Okuyama A, Amano K, Higashi M, Tamaru J, Mori S, Tabayashi T, Watanabe R, Kizaki M. Therapy-related myeloid neoplasm in methotrexate-associated lymphoproliferative disease in a rheumatoid arthritis patient. Clin Exp Hematop 2014;54(2):137-41.

学会発表

- 1) Tabayashi T, Sagawa M, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Kizaki M. Targeting the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Multiple Myeloma: A Possible New Therapeutic Approach to Overcome Bortezomib Resistance (56th ASH Annual Meeting and Exposition (December 6-9, 2014) in San Francisco, CA)