

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	内田 慧美
論文審査担当者	主査 東田 修二 副査 神奈木 真理、新井 文子
論文題目	TOPK is regulated by PP2A and BCR/ABL in leukemia and enhances cell proliferation
<p style="text-align: center;">(論文内容の要旨)</p> <p><要旨></p> <p>慢性骨髄性白血病 (CML) の治療成績は、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の登場により飛躍的に改善したが、一部の患者は TKI 投与下でも急性転化し重篤な経過を辿る。TOPK は悪性腫瘍で高発現するが、我々は TOPK が BCR/ABL 陽性細胞株でも高発現し、CML 患者では健常者よりも有意に上昇していることを確認した。TOPK 発現は BCR/ABL により誘導され、BCR/ABL 阻害薬であるイマチニブにより減弱することから、TOPK が BCR/ABL の下流分子であることが示唆された。TOPK 阻害薬である OTS514 は、BCR/ABL 陽性細胞株や CML 患者由来の CD34 陽性細胞コロニーにおいて、細胞増殖を抑制した。更に、TOPK のリン酸化は、PP2A 阻害薬であるオカダ酸により増強され、PP2A 刺激薬である FTY720 により減弱した。BCR/ABL 活性化及び PP2A 阻害は CML の病勢増悪の重要なメカニズムであり、TOPK は CML に関する重要なシグナル分子の一つであると言える。TOPK の阻害により、TKI 耐性例においても CML の病勢をコントロール出来る可能性がある。</p> <p><緒言></p> <p>CML は、造血幹細胞における染色体転座 t(9;22)(q34;q11.2) に由来する BCR/ABL により引き起こされる。慢性期 (CP) 患者の多くは無症状だが、無治療では急性転化 (BC) に進展することは必至である。一部の患者は TKI 投与下でも BC となり、その場合の予後は約 6 カ月から 1 年と報告されている。PP2A は、細胞増殖や生存に関わる分子を脱リン酸化することで、細胞増殖・生存を抑制する。CML では、BCR/ABL が SET の発現を増強し、SET は PP2A を抑制し細胞増殖を促進する。PP2A の活性化は BCR/ABL の脱リン酸化を惹起し、白血化を抑制する。我々は、CML-BC 由来細胞株である K562 に導入した HLA 分子上に、TOPK 由来のペプチドが提示されることを見出した。TOPK はセリン/スレオニンプロテインキナーゼであり、人の正常組織では精巣を除いては殆ど発現しておらず、血液腫瘍を含む様々な悪性腫瘍で高発現する。又、TOPK は細胞周期の M 期にリン酸化され、腫瘍細胞の細胞分裂に関与する蛋白を活性化する。我々は本論文において、CML の発症と TOPK の関係性に着目した。</p> <p><方法></p>	

細胞株は、白血病細胞株 (BCR/ABL 陽性 (K562、MOLM1、TMD5)、MV4-11、TMD2、TL-om1)、Bリンパ腫細胞株 (EW36、MD901、Raji)、HAM 由来細胞株 (ILT-M1)、多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226)、マウス系造血細胞株 32D 及び、32D に p210 を導入し BCR/ABL を常時発現させた 32D/p210、マウス由来の Ba/F3 に p210 を導入した TonB210 及び、これに T315 変異を伴う TonB210/T315I を用いた。CML 患者の骨髄及び末梢血、健常人の末梢血から単核球を分離し、Western Blot 法による TOPK 発現の有無の確認や、RT-PCR 及び Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) による TOPK 発現量の測定に用いた。更に、CML 患者の単核球から CD34 陽性細胞を分離・培養し、OTS514 の有無によるコロニー増殖の観察に用いた。Cell cycle の解析には Flow cytometry 法を、細胞内シグナル伝達の解析には Western Blot 法や免疫沈降法を用いた。

<結果>

HLA 欠損細胞株である K562 に HLA-A*24:02 を遺伝子導入し、HLA 上に提示されたペプチドを質量分析で解析した。得られたペプチドからその由来である TOPK に着目した。TOPK の mRNA は、造血器腫瘍細胞株では高発現していたが、健常人では発現を認めなかった。又、蛋白レベルでも同様であった。

K562 が CML 細胞株であることから、CML 患者検体における TOPK 発現について qRT-PCR を用いて解析した。TOPK/GAPDH 値は、CML 患者で健常人より有意に高値であり、同一患者では CP よりも BC の方で TOPK 発現が増強していた。

次に、TOPK と BCR/ABL の関係を評価した。32D と 32D/p210 で比較すると、BCR/ABL を常時発現している 32D/p210 で明らかに TOPK の高発現を認めた。又、Doxycycline 添加で BCR/ABL を発現する TonB210 では、Doxycycline を加えることで TOPK 発現が増強した。一方で、BCR/ABL を阻害するイマチニブを K562 に加えると、BCR/ABL のリン酸化及び TOPK の発現が、イマチニブ濃度依存性に減弱した。又、Doxycycline 添加で TOPK 発現を増強させた TonB210 にイマチニブを投与すると、TOPK 発現は減弱した。これらのことから、TOPK は BCR/ABL キナーゼ活性により誘導されることが示唆された。

次に、TOPK のリン酸化に着目した。TOPK は細胞周期の M 期において、9 番目のスレオニン残基のリン酸化を受ける。細胞周期を M 期で止める Nocodazole を K562 に加えると、時間依存性に TOPK のリン酸化が増強することが示され、以後の実験で TOPK のリン酸化を惹起する為に Nocodazole を用いた。PP2A は A・B・C のサブユニットから成り、BCR/ABL 陽性細胞で腫瘍抑制因子として働く。Nocodazole を加えた K562 では、PP2A 阻害薬であるオカダ酸存在下で TOPK のリン酸化が増強した。一方で、PP2A を活性化する FTY720 の存在下では、その濃度依存性にリン酸化が減弱した。このことから、TOPK が PP2A により脱リン酸化されることが示唆された。更に、FLAG をつけた TOPK を導入した K562 で、FLAG ビーズを用いて TOPK を免疫沈降したところ、TOPK と PP2A-A の共沈降を認めた。以上より、TOPK と PP2A 複合体の結合が示唆された。調節サブユニットである PP2A-B は複数あるが、どの PP2A-B が TOPK との結合に関与しているかを検討した。TOPK や PP2A-B56 (α , β , $\gamma 1$, $\gamma 3$, δ , ϵ) をトランスフェクションした 293T で、特に B56 β が TOPK と共沈降することが確認され、B56 β が TOPK と特異的に結合している可能性が示された。

OTS514 を BCR/ABL 陽性の造血器腫瘍細胞株に加えたところ、細胞増殖が有意に抑制された。又、

CML-CP 患者由来の CD34 陽性細胞に OTS514 を加えたところ、14 日間培養後の増殖コロニー数は、対照群と比較して有意に減少した。更に、K562 に OTS514 とイマチニブを単独投与或いは併用したところ、併用では単独投与よりも有意に細胞増殖が抑制されたことから、TOPK と BCR/ABL を共に抑制することで、CML 細胞の生存に相加作用を示すことが示唆された。

<考察>

本論文では、BCR/ABL が TOPK を誘導することを明らかにした。健常者よりも CML 患者で TOPK が高発現していたことから、TOPK が CML の進展に関与していることが示唆された。CP と BC の両方の検体がある 3 名の CML 患者の内、2 名では BC の方で TOPK の発現が高かった。更にその内 1 名では、全ての急性転化患者の中で最も TOPK 発現が高かった。この患者は、ニロチニブにより一旦は分子遺伝学的効果 (IS<0.10%) が得られたにも関わらず、診断から 11 ヶ月で E255K 変異を有して急性転化し (IS 136.55%)、非常に速い経過で死亡した。他の悪性疾患でも進行が速い症例において TOPK が高発現することが知られており、この患者の臨床経過にも TOPK 高発現が関与した可能性がある。

PP2A は、細胞増殖や生存に関わる分子を脱リン酸化することで、細胞増殖・生存を抑制する。我々は、BCR/ABL 陽性細胞の腫瘍抑制因子である PP2A が、TOPK と結合し脱リン酸化をもたらすことを明らかにした。PP2A は、その B サブユニットがサブユニット A と C から成るコアダイマーに結合することで、基質を受け入れられるようになる。B サブユニットは幾つかのサブファミリーに分類されるが、我々はその中でも B56 β が最も強く TOPK と結合することを明らかにした。Akt の下流標的分子である C1k2 は、B56 β をリン酸化することで、PP2A による Akt の脱リン酸化を誘導するという報告がある。TOPK はこの Akt と同様、細胞増殖・生存を調節するセリンスレオニンキナーゼであり B56 β と相互作用することから、PP2A が TOPK の脱リン酸化を調節する際に、Akt と同様のメカニズムが働いている可能性がある。

TOPK を高発現する細胞株では、TOPK 阻害薬が細胞増殖を抑制することが知られているが、本論文では BCR/ABL 陽性の造血器腫瘍細胞株において、殆どの TKI に抵抗性を持つ T315I 変異の有無に関わらず、TOPK 阻害薬である OTS514 が細胞増殖を抑制することを示した。更に注目すべきは、OTS514 がイマチニブの効果を有意に増強したことである。TOPK 阻害薬は、ABL 変異や TKI 使用の有無に関わらず有望な治療薬になり得る。

<結論>

Ph 染色体陽性白血病において、TOPK は BCR/ABL により発現誘導され細胞増殖を促進し、白血化を抑制する PP2A により脱リン酸化された。TOPK インヒビターである OTS514 は、単独でも腫瘍細胞の増殖を抑制するが、Imatinib との併用でより CML に対する有望な治療選択肢となると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 5718 号	内田 慧美
論文審査担当者	主査 東田 修二 副査 神奈木 真理、新井 文子	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
<p>本論文は、慢性骨髄性白血病（以下、CML）の発症原因である <i>BCR-ABL</i> 融合遺伝子に由来する融合蛋白が T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase (TOPK)の発現を亢進させること、脱リン酸化酵素である PP2A は TOPK の活性を抑制すること、TOPK 阻害薬である OTS514 は CML 細胞の増殖を抑制し、CML の新たな分子標的薬の候補となりうることを、詳細な細胞分子生物学的解析によって明らかにした論文である。</p>		
2. 論文審査		
<u>1) 研究目的の先駆性・独創性</u>		
<p>CML の治療成績は、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の登場により飛躍的に改善したが、一部の患者は TKI 耐性となり不幸な転帰をとるため、TKI を補完する治療が望まれている。申請者は、CML の腫瘍特異抗原の探索の中で、TOPK が新たな分子標的となる可能性を見出し、TOPK の発現や活性を制御する分子機能を解明した。その先駆的な着眼点は評価に値するものである。</p>		
<u>2) 社会的意義</u>		
<p>本研究で得られた主な結果は以下の通りである。</p>		
1. TOPK 阻害薬 OTS514 は CML 由来細胞株の増殖を抑制した。		
2. OTS514 は CML 患者細胞のコロニー形成を抑制し、正常骨髄細胞のコロニー形成は抑制しなかった。		
3. CML 細胞株 K562 の増殖抑制に対して、TKI と OTS514 の併用は、それぞれの単独の効果と比べて相加作用を認めた。		
<p>以上のように申請者は、OTS514 は CML 細胞の増殖抑制に有効であることを明らかにし、新たな分子標的薬の候補となる可能性を示した。これは臨床的に極めて有用な研究成果であると言える。</p>		
<u>3) 研究方法・倫理観</u>		
<p>研究には、CML 細胞株や患者細胞などが用いられ、細胞培養、遺伝子導入、遺伝子発現解析、蛋白発現解析などの詳細で論理的な解析が用いられた。本手法は細胞分子生物学的研究に関する十分な経験と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十</p>		

分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備と考察の上に行われたことが窺われる。

4) 考察・今後の発展性

さらに申請者は、TOPK の活性を PP2A が制御することを、PP2A の阻害薬や刺激薬を用いた実験で明らかにし、両者の結合の分子メカニズムも明らかにしている。また、ほとんどの TKI に抵抗性を示す T315I 変異を有する細胞にも OTS514 が増殖抑制を起こした事実より、TOPK を標的とした、CML に対する新たな分子標的治療が今後展開していく可能性を提示している。これは極めて重要な考察であり、今後の研究により知見がさらに発展することが期待される。

3. その他

特になし。

4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。