

## 白血病幹細胞に対する分子標的治療の開発

研究代表者：吉田 明（医学部・准教授，現，国際医療福祉大学、薬学部、教授）  
共同研究者：大蔵美幸（医学部・大学院生）

概 要	
	がんは遺伝子変異の結果として引き起こされるが、変異した遺伝子産物の活性および安定性は熱ショックタンパク質のひとつ Heat shock protein90 (HSP90)のはたらきに大きく依存している。一方、Myeloid Cell Leukemia-1 (MCL-1)は抗アポトーシス作用を有する蛋白であり、多くの癌細胞において重要な役割を果たしてしていることが既に報告されており、癌治療を考察するための標的分子と考えられる。今回、我々は、MCL-1はHsp90のclient proteinであることを明らかにした。臨床的にもHSP90阻害剤の作用機序を考察する上でも興味深い発見である。
関連キーワード	Heat shock protein90 (HSP90)、Myeloid Cell Leukemia-1 (MCL-1)、抗アポトーシス分子

### 研究の背景および目的

#### 『研究の背景』

近年、成人の急性骨髄性白血病の治療成績は進歩がみられているが、その完全治癒率は35%前後にとどまっており、十分に満足できるものではない。治療の観点からは、特に白血病性幹細胞をいかに効率よく根絶するかが重要であると考えられる。我々は、特に難治性の骨髄異形成症候群から移行してきた白血病症例においては、CD34陽性の白血病性幹細胞において、抗アポトーシス分子であるSurvivinが非常に強く発現していることを見いだした(Yoshida, A et al. Haematologica, 2012, IF 5.9)。また、FLT-3遺伝子の変異を有する予後不良な症例でもSurvivinが高発現していることが認められている(Yoshida, et al. Biochem Pharmacol, 2014, IF 4.56)。こういった予後不良な症例に対する治療法を考案するため、Survivin阻害剤である低分子化合物YM155に関して我々は研究をおこなってきたが、YM155はSurvivinのみならず、もう一つの抗アポトーシス分子であるMCL-1をより強く抑制することを見いだした(Feng, W., Yoshida A et al. BBRC 2013)。さらに、興味深いことにYM155は直接的にHeat Shock Protein 90 (HSP90)に結合して、その機能を阻害すること発見した(投稿準備中)。YM155がMCL-1蛋白の分解を強力に誘導することより、MCL-1がHSP90のclient proteinではないか?という仮説を我々は考えた。これらの我々の知見をベースにして、さらに以下の点を明らかにすることを今回の目的とする。

#### 『目的』

1. MCL-1がHSP90のClient Proteinであることを証明するため培養白血病細胞を用いて以下の検討をおこなう。まず抗MCL-1抗体を用いて、免疫沈降を実施、その後、抗HSP90抗体を用いてウエスタンブロットを実施してMCL-1とHSP90の結合があるかどうか検討する。また、逆に抗HSP90抗体を用いて免疫沈降をおこない、その後抗MCL1抗体を用いてウエスタンブロットを実施する。さらにHSP90に対するsiRNAを培養白血病細胞に作用させることによりMCL-1蛋白の分解が誘導されるかどうかについて検討する。
2. HSP90阻害剤は癌治療の分野で大きな注目を集めている。しかし、がん幹細胞に対する効果については未だ報告がない。がん幹細胞の生物学的特性として、細胞がG0/G1期(静止期)にあることが知られており、静止期にある細胞は、多くの抗がん薬に対して耐性をしめし治療が困難となる。そこで、培養細胞をG0/G1期に誘導して、その状態でYM155を添加して、抗腫瘍効果を発揮するかを検討する。

## 研究の内容および成果

### 結果

1. MCL-1 が HSP90 の Client Protein であることを証明するため以下の検討をおこなった。培養白血病細胞株 KBM-5 を使用した。RIPA Buffer に Triton X-100 を加えて細胞を溶解後に、抗 MCL-1 抗体 (Santa Cruz 社) を加えて、Spin Trap Protein-G カラムを用いて、免疫沈降を実施した。免疫沈降物を回収後、ポリアクリルアミド電気泳動を実施して、その後に、抗 HSP90 抗体を用いてウェスタンブロットを実施し MCL-1 と HSP90 の結合があるかどうか検討した。その結果、図に示すように、MCL-1 との免疫沈降物には、確かに HSP90 が存在することが判明した。また、逆に抗 HSP90 抗体を用いて免疫沈降をおこない、その後に抗 MCL-1 抗体を用いてウェスタンブロットを実施したが、やはり、MCL-1 と HSP90 の結合が示唆された。さらに HSP90 に対する siRNA を培養白血病細胞に作用させ、HSP の発現を抑制したところ、MCL-1 蛋白の分解が誘導されることか観察された。

2. 細胞を G0/G1 期に誘導するため細胞を PBS で洗浄後、2%BSA を含む RPMI 培地に浮遊させ培養を継続した (血清非存在下で培養した)。その後、1 $\mu$ M YM155 を添加し細胞死の誘導について検討した。対象実験として、S 期特異的な薬剤 ara-C を添加して細胞死の誘導について検討した。その結果、ara-C は、まったく効果を示さなかったが、YM155 は強い細胞死誘導活性をしめした。以上より、YM155 は、静止期の細胞にも効果を示す薬剤であることがわかった。

### 考察

HSP90は細胞にもっとも豊富に存在する分子シャペロンであり、タンパク質が細胞において正常な立体構造を維持するうえで重要な役割をはたしている。HSP90は、変異型p53, ErbB2 (Her2/neu, Bcr-Ablなど、特にがん細胞の増殖や生存にかかわ

質、キメラタンパク質の安定性および活性化に必要不可欠である。一方、正常なタンパク質のHSP90への依存性は低い。そのため、HSP90は抗がん薬の有望な分子標的と考えられている。実際に、Hsp90阻害薬はさまざまな種類のがんに対して抗がん活性を示し、現在、第1世代および第2世代のHsp90阻害薬は骨髄腫、乳がん、肺がん、前立腺がん、腎がんなどを対象に臨床試験 (第1相試験～第3相試験) が行われている。

MCL-1 は多くの癌細胞において高発現していることが既に報告されており、癌治療を考察するための重要な標的分子と考えられる。具体的には、慢性骨髄生白血病の幹細胞において MCL-1 が高発現しており、その生存に重要な機能を果たしていることが報告されている。MCL-1 は BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death) と結合しており、BIM の機能を阻害することにより、抗アポトーシス作用を発揮していると考えられる。近年になり、MCL-1 に選択的に結合して特異的に阻害する化合物として、A-1210477, UMI-77 などが見いだされており、前臨床の段階であるが、抗腫瘍活性を有していることが報告されている。今回の我々の知見は HSP90 阻害薬により効率的に MCL-1 を抑制できる可能性が高いことを示唆するものである。

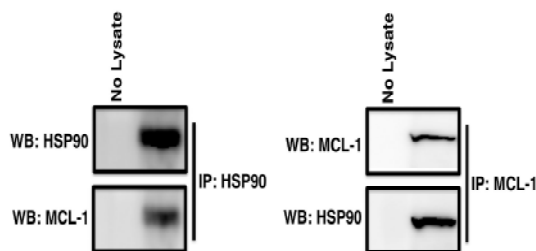


図. 抗 HSP90 抗体および抗 MCL-1 抗体を用いて免疫沈降を行い Western Blotting を実施した。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

1. **Yoshida A**, Ookura M, Zokumasu K, Ueda T. Gö6976, a FLT3 kinase inhibitor, exerts potent cytotoxic activity against acute leukemia via inhibition of survivin and MCL-1. *Biochem Pharmacol.* 90(1): 16-24, 2014

2. Feng W, **Yoshida A**, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 435(1):52-7, 2013.

3. **Yoshida A**, Zokumasu K, Wano Y, Yamauchi T, Imamura S, Takagi K, Kishi S, Urasaki Y, Tohyama K, Ueda T. Marked upregulation of Survivin and Aurora-B kinase are associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 97(9):1372-9, 2012.