

東海大学大学院令和 5 年度博士論文

プテロスチルベンは BCR/ABL を抑制して
T315I 変異を有する BCR/ABL 陽性白血病
細胞をアポトーシスに導く

指導 川田 浩志 教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

川上 翔平

- ・この学位申請論文は Scientific Reports に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・Scientific Reports に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

総括

プテロスチルベンは、ベリーやナッツなどに含まれるポリフェノールで、レスベラトロールのメチル化アナログである。本研究では、様々なヒトやマウスの白血病細胞株ならびに白血病患者から採取した骨髓検体を用いてプテロスチルベンの抗腫瘍効果を調べた。プテロスチルベンは、様々な白血病細胞をアポトーシスに誘導したが、正常造血幹細胞/前駆細胞のアポトーシスは誘導しなかった。プテロスチルベンは、ABL 依存性チロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性を示す T315I 変異を有する BCR/ABL 陽性白血病細胞もアポトーシスへ誘導した。BCR/ABL 陽性白血病細胞において、プテロスチルベンは BCR/ABL 蛋白レベルを低下させ、下流の標的分子である AKT および NF- κ -B の活性化を抑制した。このプテロスチルベンによる BCR/ABL 蛋白レベルの低下は、プロテア

ソーム阻害によって誘発される小胞体ストレスが引き起こすカスパーゼの活性化が関与していると考えられた。また、プテロスチルベンは、MEK/ERK 阻害剤 (U0126) と相乗的に作用して、BCR/ABL 陽性白血病細胞のアポトーシスをより強く誘導した。さらに、BCR/ABL 陽性白血病細胞を移植したマウスにおいて、プテロスチルベンの経口投与は白血病細胞の増殖を有意に抑制した。今回の研究から、プテロスチルベンは BCR/ABL 陽性白血病、特に ABL 依存性チロシンキナーゼ阻害薬に耐性を示す治療抵抗性の難治性白血病に対する新しい治療薬となる可能性のあることが示唆された。

研究の背景

慢性骨髄性白血病は、成人白血病の約 20% を占める血液悪性腫瘍である。早くも 1800 年代後半には白血球数著増と巨脾によって特徴づけられる疾患として認知され、その後、放射線被爆によって誘発されるという報告が相次いだ。1960 年になり、慢性骨髄性白血病に特異的な異常として、フィラデルフィア染色体が発見された。さらに、1973 年にフィラデルフィア染色体が 9 番染色体と 22 番染色体の転座によって引き起こされ、本疾患の病態に深く関わっていることがわかってきた。こ

の時期には同種骨髄移植による治療が応用されるようになり、患者の長期生存が期待できるようになってきたものの、厳しいドナーの選定や移植関連有害事象の合併などで、実際に移植治療を受け長期生存する症例は一部に限られた。1983 年に、フィラデルフィア染色体では 9 番染色体長腕の ABL 遺伝子と、22 番染色体長腕の BCR 領域が融合していることが判明し、この融合遺伝子から翻訳された BCR/ABL 蛋白のチロシンキナーゼ活性が恒常的に亢進していることが細胞増殖をもたらして慢性骨髄性白血病の発症につながるということが明らかとなった。1998 年にこのタンパク質を標的とした ABL チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)が開発され、TKI が奏功すれば 8 年生存率は 90%と長期生存が望める疾患となった。しかし一部の症例では、T315I 変異に代表される BCR/ABL 遺伝子点突然変異が加わり、キナーゼタンパクの構造変化が起きることで従来の TKI に抵抗性を示すことが臨床的に大きな問題として残されている。T315I 変異例にも効果を示す第 3 世代 TKI としてポナチニブが開発されたが、重大な血管閉塞事象のリスクを持つことや薬剤そのものが高額であることなどの問題があり、より安全で費用負担の少ない新たな薬剤の登場が望まれている。

植物がストレスに対して応答して働く生体防御機構として、植物内

で自ら生合成するファイトアレキシンの存在がある。ファイトアレキシンは、太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) のタキソール、ナス科 (*Solanaceae*) のアルカロイド、メギ科ポドフィラム (*Podophyllum peltatum*) のポドフィロトキシンなどのように、抗腫瘍効果を示すものもある植物由来の天然化合物である。ポリフェノール化合物であるレスベラトロールもファイトアレキシンの一種であり、*in vitro* において様々な腫瘍に対して強い抗腫瘍作用を示す。様々な機能が報告されており、サプリメントとしても用いられているが、生体内利用率が低く速やかに分解されてしまうため、生体への応用は難しいと考えられてきた。プテロスチルベンはレスベラトロールのジメチル化アナログで、ブルーベリーやブドウに多く含まれる天然化合物である。レスベラトロールよりも生体内利用率が高く、高い濃度を長時間維持できることに加え、これまで健常者や脂質異常患者において行われた臨床試験では人体に対して注意すべき重大な毒性の発現は認められていない。さらにプテロスチルベンは *in vitro* において血管新生阻害作用、抗酸化・抗炎症作用などが示されているだけでなく、リンパ腫細胞や BCR/ABL 陽性白血病細胞等でアポトーシス誘導作用も有すると報告されている。

以上を背景に、一般的な植物に含まれる安全で安価な天然由来の成分であるプテロスチルベンが、TKI へ抵抗性を示す BCR/ABL 陽性白血病細胞に対しても有効である可能性を考えた。それゆえ本研究ではプテロスチルベンの同白血病細胞に対するアポトーシス誘導効果と BCR/ABL のシグナル伝達への影響、さらに白血病細胞を移植したマウスへのプテロスチルベン経口投与による抗白血病効果について調べた。

考察と展望

慢性骨髄性白血病および急性リンパ芽球性リンパ腫/白血病は ABL チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の登場により飛躍的に予後が改善した。TKI は BCR/ABL チロシンキナーゼの ATP 結合部位に競合的に結合することで、基質のリン酸化に続くシグナル伝達を阻害しアポトーシスを誘導する。多くの患者は TKI により長期的に白血病の進行を食い止めることができ、一定期間深い奏功を達成した患者の半数では TKI の投与を中止することさえ可能になった。しかしそれ以外の患者は再発を防ぐために継続的な治療が必要であり、その結果として有害事象や高額な医療費などに長期にわたって悩まされることとなる。BCR/ABL には変異体の存在が知られており、特に点突然変異である T315I 変異を有

する BCR/ABL では第 1 世代(イマチニブ)、および第 2 世代(ダサチニブ、ニロチニブおよびボスチニブ)によって BCR/ABL のリン酸化を阻害できない。第 3 世代(ポナチニブ)は有望であるが、有害事象が強く認められるため、新たな低侵襲性の薬剤の登場が望まれている。

ハーブや果実に多く含まれるスチルベンは、薬効のある重要な生物学的活性を示す天然化合物である。レスベラトロールは植物が環境ストレスに応答して生成するファイトアレキシンであり、これまで示されてきた抗酸化作用や抗炎症作用をもとに、栄養補助食品として非常に人気がある成分である。最近の研究で白血病細胞を含む様々なヒトの腫瘍細胞に対して、抗増殖活性やアポトーシス促進効果が実証されている。しかしレスベラトロールは生体内利用率が低く、半減期が短いため生体への応用は困難と考えられてきた。プテロスチルベンはベリーやナッツに含まれる、レスベラトロールのジメチル化アナログである。プテロスチルベンはレスベラトロールに比べヒドロキシ基が 1 つしかないために優れた経口吸収性と代謝安定性を備えている。さらに血液悪性腫瘍を含むヒトの腫瘍細胞に対して様々なメカニズムを介して抗腫瘍活性を示すことが報告されている。今回我々は、プテロスチルベンの造血器腫瘍に対する治療への応用の可能性を探るため、プテロ

スチルベンが白血病細胞に与える影響とそのメカニズムを *in vitro* で調べた。さらにプテロスチルベンを白血病マウスへ経口投与することで、*in vivo* においても抗腫瘍効果が認められるか検討した。

今回の研究によって、TKI に抵抗性を示す T315I 変異を有する BCR/ABL 陽性白血病細胞に対して、プテロスチルベンは BCR/ABL を蛋白レベルで低下させ、結果として下流分子であり腫瘍増殖に重要な役割を担っている AKT や NF- κ -B の活性化も抑制することを見出した。また、プテロスチルベンは、MEK/ERK 阻害剤の U0126 との併用により、BCR/ABL 陽性白血病細胞のアポトーシスを相乗的に誘導することもわかった。このプテロスチルベンによる BCR/ABL 抑制には、プロテアソーム阻害で誘発される小胞体ストレスによって引き起こされたカスパーゼの活性化が関与していることも明らかにした。さらに、生体内に移植された BCR/ABL 陽性白血病細胞に対してプテロスチルベンの経口投与が有意な増殖抑制効果を発揮することも示した。

本研究の *in vitro* スタディで用いたプテロスチルベンは 200 μ M と、白血病細胞への抗腫瘍効果を示した過去の研究報告で用いられた濃度 (最大 150 μ M) に比して高い濃度であったが、正常造血幹細胞/前駆細胞の生存への負の影響は認められず、腫瘍細胞選択的に効果を発揮した。

プテロスチルベンは、BCR/ABL の蛋白レベルを低下させることで、そのシグナル伝達の下流に位置する AKT や NF- κ -B を阻害する一方で、抗アポトーシス作用に関連する ERK の活性化を促進していた。このことは、BCR/ABL 抑制に基づくネガティブ・フィードバックを介して MEK/ERK 経路が活性化されることを示した以前の研究報告と一致していた。さらにプテロスチルベンと MEK 阻害剤を併用することで、相乗的にカスパーゼの活性化を促進し、その結果 BCR/ABL 陽性白血病細胞をより強力にアポトーシスへ導くことがわかった。

これまでの研究から、BCR/ABL はプロテアソーム活性の亢進と関連していると考えられ、慢性骨髄性白血病患者の骨髄単核球では健常人と比べてプロテアソーム活性が亢進していることが報告されている。このことから、BCR/ABL 陽性白血病細胞はプロテアソーム阻害の影響をより受けやすい可能性が考えられたが、実際、BCR/ABL 陽性細胞は BCR/ABL 陰性細胞よりもプロテアソーム阻害剤によってアポトーシスが強く誘導されたと報告されている。以上より、プテロスチルベンが BCR/ABL 陽性白血病細胞をアポトーシスへ強く誘導するメカニズムは、我々が今回観察したプロテアソーム阻害によって引き起こされる小胞体ストレスと、それに起因するカスパーゼ活性化によるところが大きいと推察

された。このことは、TKI に抵抗性を示す BCR/ABL 陽性白血病細胞に対し、プロテアソーム阻害剤が新たな治療戦略となりうる可能性を示唆している。

その一方で、汎カスパーゼ阻害剤である z-VAD がプテロスチルベンのアポトーシス誘導を完全に阻害できなかったことは、プテロスチルベンがプロテアソーム阻害によって引き起こされる小胞体ストレスを介したカスパーゼ活性化以外の経路でもアポトーシスを誘導しうることを示唆しており、さらなる検討が必要である。

近年複数の Ras/Raf/MEK/ERK 経路阻害剤が、一部の固形腫瘍に対する治療薬として上市されている。悪性黒色腫に対する治療薬である BRAF 阻害剤のダブラフェニブと MEK 阻害剤のトラメチニブの併用が、難治性の有毛細胞白血病に対して高い有効性をもつことが臨床試験で示された。有毛細胞白血病患者では BRAF V600E 変異が高頻度で認められ、Ras/Raf/MEK/ERK 経路が恒常的に活性化している。そのためこの経路を強力に阻害することで抗腫瘍効果を発揮するとされている。プテロスチルベンにおいても MEK 阻害剤 U0126 との併用により BCR/ABL 陽性白血病細胞を強力にアポトーシスへ導くことが今回示されたので、トラメチニブ等の臨床使用可能な Ras/Raf/MEK/ERK 経路阻害薬との併

用でも相乗的な効果が得られるのか今後検討したいと考えている。さらに、プロテアソーム阻害剤のボルテゾミブも、種々の白血病細胞に対するアポトーシス誘導効果が報告されており、同薬剤もプテロスチルベンとの相乗効果が期待できる可能性が考えられ、今後検討を進めていきたい。

結論

本研究ではヒトおよびマウスの白血病細胞株、さらに患者から得られた白血病細胞を使用し、プテロスチルベンの抗白血病効果を調べた。プテロスチルベンは、正常の造血幹細胞/前駆細胞に対してはアポトーシス誘導効果を示さなかったが、白血病細胞を有意にアポトーシスへと誘導した。特に BCR/ABL 融合遺伝子を持つ白血病細胞のアポトーシスを強く誘導し、T315I 変異を有して TKI に抵抗性を示す細胞に対しても強いアポトーシス誘導効果を発揮した。BCR/ABL 陽性白血病細胞において、プテロスチルベンは BCR/ABL を蛋白レベルで低下させ、白血病細胞の生存・増殖に重要な AKT および NF- κ -B の活性化を抑制した。プテロスチルベンと MEK/ERK シグナル伝達経路の阻害剤である U0126 の併用は、BCR/ABL 陽性白血病細胞のアポトーシスを相乗的に誘導する

こともわかった。さらに、プテロスチルベンによる BCR/ABL の下方制御には、プロテアソーム阻害によって誘発される小胞体ストレスに起因したカスパーゼの活性化に基づいていることが示唆された。また、プテロスチルベンの経口投与は、T315I 変異を有する BCR/ABL 陽性白血病細胞を移植したマウスにおいて有意な腫瘍増殖抑制効果を発揮した。

本研究から、プテロスチルベンが TKI に抵抗性を示す BCR/ABL 陽性白血病に対する新しい治療になりうる可能性が示された。