

## 論文の内容の要旨

論文題目 RNA 干渉技術を応用した p190BCR-ABL 陽性白血病の分子標的治療に関する基礎検討

指導教員 東條 有伸 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

二見 宗孔

慢性骨髄性白血病 (Chronic myeloid leukemia; CML) およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia; Ph<sup>+</sup> ALL) は染色体相互転座 t(9;22) に由来し、キメラ蛋白 Bcr-Abl を産生する。Bcr-Abl は恒常的に活性化したチロシンキナーゼであり、これらの白血病の発症、維持、進行に不可欠であると考えられている。p210 と p190 は Bcr-Abl の代表的なサブタイプであるが、p210 がしばしば CML 患者に認められるのに対し、p190 はほぼ必ず Ph<sup>+</sup> ALL 患者において認められる。近年、Abl キナーゼ阻害剤である imatinib、nilotinib、dasatinib などが開発されたことにより Bcr-Abl 陽性の白血病に対する治療成績は改善した。しかしながら T315I に代表される点突然変異によるチロシンキナーゼ阻害剤への耐性が解決すべき問題として残っている。

治療戦略の新しいアプローチとして、キメラ遺伝子の発現レベルを抑制する手法に大きな関心が持たれている。この手法であれば imatinib 耐性変異の有無に関わらず Bcr-Abl 陽性細胞のみを標的とし、正常細胞への影響を最小限にすることもできる。

近年 RNA 干渉 (RNAi) を用いると効果的に遺伝子発現を抑制できることが明らかになったため、本研究では RNAi で p190 を効果的に抑制できるか、p190 の発現抑制により増殖抑制や細胞死を誘導できるか、また下流のシグナル伝達経路へどのような影響を与えるかを検討した。さらに RNAi とともに、imatinib や 17-allyl-amino-geldanamycin (17-AAG) といった薬剤と併用した場合の効果についても検討した。

本研究においては、まず、p190(e1a2)型の Bcr-Abl を標的とした 21 塩基長 shRNA を 3 種類設計し、それぞれ shE1A2、shABL、shBCR と名付けた。U6 プロモーター下に上記 shRNA を発現するレンチウイルスベクターを作製し以後の実験に用いた。293/p190 細胞に上記 shRNA を遺伝子導入したところ、shE1A2、shABL、shBCR はいずれも p190 の発現を完全に抑制した。また内在性の Abl および Bcr の発現はそれぞれ shABL、shBCR によって抑制された。

次に p190 の抑制に伴う生物学的影響を評価するため p190<sup>+</sup>、p210<sup>+</sup>、および p190<sup>-</sup>/p210<sup>-</sup>の白血病細胞株に、これらの shRNA を遺伝子導入して細胞数と生存率を経時的に測定した。p190<sup>+</sup> Ph<sup>+</sup> ALL 由来の KOPN-30 細胞は shE1A2、shABL、および shBCR により、時間依存性に細胞数、生存率ともに減少した。shABL や shBCR はその配列から p190 だけでなく p210 も発現抑制できると考えられるため、これらを p210<sup>+</sup>の CML 細胞株 K562 細胞にも遺伝子導入した。shABL と shBCR は K562 細胞を死滅させたが、shE1A2 は shABL や shBCR ほど大きな効果を認めなかった。Bcr-Abl 融合部位の塩基配列が p190 と p210 とで異なるためと考えられた。Bcr-Abl を持たない B-ALL 細胞株 NALM-6 を用いた実験では shE1A2、shABL、shBCR とも生存には影響を与えず、shABL が増殖を抑えたのみであった。

RNAi による p190 の抑制は、Abl キナーゼ阻害剤に対する耐性を克服する可能性を秘めていると考え、野生型 (wt) あるいは imatinib 耐性変異 (Y253H) の p190 で形質転換させたマウス pro-B 細胞株 Ba/F3-p190 細胞に shRNA を遺伝子導入し、その効果を比較検討した。shE1A2、shABL、shBCR は、マウス IL-3 非存在下では Ba/F3-p190wt 細胞、Ba/F3-p190Y253H 細胞いずれも完全に死滅させた。一方、マウス IL-3 を 10 ng/ml 加えた条件下では p190 抑制による細胞死が軽減された。

次に、内在性の Abl や Bcr をノックダウンすることの正常細胞に与える影響を検討した。shBCR の遺伝子導入では明らかな変化が見られなかったが、shABL は臍帯血 CD34 陽性細胞の CFU-GEMM や BFU-E に由来するコロニー形成を抑制した。このことから Abl は骨髄系造血、特に赤芽球系の造血に関与している事が示唆された。

Bcr-Abl は Jak/Stat 経路、Ras/Raf/Mek/Erk 経路、PI3 kinase/Akt 経路をはじめとした多数のシグナル伝達経路を活性化することが知られているが、p190 による細胞増殖、アポトーシスの抑制に対しそれぞれの経路がどの程度寄与しているのかは不明であった。p190 の発現抑制によって影響を受けるシグナル伝達系を明らかにするため、Ba/F3-p190wt 細胞に shRNA を遺伝子導入し、各経路を担う分子の蛋白量、リン酸化状態をウェスタンブロット法で測定した。p190 を標的とする shRNA (shE1A2、shABL、shBCR)はいずれも Jak2 のリン酸化に大きな影響を与えなかった。一方、Stat5 のリン酸化は p190 を標的としたこの 3 種類の shRNA により顕著に抑制された。このことから p190 による Stat5 の活性化は Jak2 非依存性になされていることが示唆された。p190 を標的とした shRNA は Akt、MEK1/2 のリン酸化には大きな影響を与えなかった。これらの結果から p190 の減少は速やかな Stat5 の不活性化をもたらすが、PI3K/Akt 経路や Ras/Raf/MEK/ERK 経路に対する影響は Stat5 ほどには大きくないことが示唆された。

次に新規薬剤である Hsp90 阻害剤 17-AAG の p190、およびその下流シグナル伝達物質に与える影響を検討した。Hsp90 はシャペロン蛋白で、多様なペプチドと複合体を形成しその安定化に働いている。Hsp90 の選択的阻害剤である 17-AAG は p190 や p210 の分解を促進し、p190 あるいは p210 陽性細胞の増殖を抑制できることが知られている。本研究では、17-AAG は p190 と p145<sup>Abl</sup> の蛋白量を 100-300 nM 付近から濃度依存性に減少させた。比較的高濃度 (1000 nM) の 17-AAG を与えると Jak2 とリン酸化 Jak2 が減少したが、Stat5 のリン酸化はより低濃度 (300 nM) でも抑制された。Akt や MEK1/2 の蛋白レベルは 100-300 nM から抑制された。これらの結果から、17-AAG は p190 の他にも様々なシグナル伝達分子の蛋白量を減少させることがわかった。

RNAi、17-AAG、および imatinib はそれぞれ異なった機構で p190 を阻害することから、これらの併用効果が Ba/F3-p190wt 細胞や BaF/3-p190Y253H 細胞において見られるかを検討した。MOI=5 程度の高い遺伝子導入条件では p190 を標的とした shRNA 単独でも細胞を死滅させてしまうので、併用効果をみるこの実験においては弱い遺伝子導入条件 (MOI=1) で shRNA を導入し、異なる濃度の imatinib あるいは 17-AAG を加えて培養して細胞の増殖率を比較した。Ba/F3-p190wt 細胞において、imatinib と shRNA を併用すると imatinib 単独よりも増殖抑制効果が高くなった。Ba/F3-p190Y253H 細胞は Ba/F3-p190wt と比べて imatinib の IC<sub>50</sub> が高いため、高濃度の imatinib でなければ増殖抑制効果がない (imatinib 耐性)。本研究でも Ba/F3-p190Y253H 細胞は単独では 5 μM までの imatinib に感受性を示さなかった。一方 shRNA を併用して p190 の蛋白レベルを

落としてやると 1  $\mu$ M 程度の imatinib でも増殖抑制効果が見られた。shRNA と 17-AAG を併用した場合、増殖抑制効果の増強は Ba/F3-p190wt 細胞、Ba/F3-p190Y253H 細胞とも同程度認められた。17-AAG と imatinib を併用した場合には、Ba/F3-p190wt 細胞への相乗効果があり、Ba/F3-p190Y253H 細胞においては imatinib に対する感受性の増加が認められた。

以上まとめると、本研究により

1. RNAi を利用した p190 の発現抑制は、p190 陽性白血病細胞に殺細胞効果を持つ事
2. imatinib 耐性細胞に対しても同等の効果を示す事
3. RNAi は p190 陽性細胞のシグナル伝達経路や、正常細胞の Abl や Bcr の役割を解明する上で非常に有用であること
4. RNAi は p190 陽性細胞の増殖抑制において imatinib や 17-AAG と併用効果がある事

以上の事が分かった。

レンチウイルスを用いた RNAi は基礎研究のみならず、将来における遺伝子治療の候補としても可能性を秘めていると考えられた。