

氏名 (生年月日) ^{あまり けいご}
甘利 圭悟 (1993年10月26日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第210号

学位授与の日付 2022年3月19日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の性状解析および BET 阻害剤耐性化機序の解明

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 高田 和幸

論文内容の要旨

序章

急性白血病は血球細胞の分化異常により骨髄内で未熟な芽球細胞が増殖することで起こる造血器腫瘍である。化学療法や造血幹細胞移植による治療法の確立により急性白血病の生存率は改善したが、特定の種類の白血病、特に *mixed-lineage leukemia (MLL)* 遺伝子に転座が生じた MLL 遺伝子関連白血病の再発率は高く予後不良であるため、新規治療法の開発が望まれている。

近年、MLL 遺伝子関連白血病に対する治療標的として、bromodomain and extra-terminal domain (BET) ファミリータンパク質が注目されている。BET ファミリータンパク質はヒストンのアセチル化されたリジン残基を認識し、様々な標的遺伝子の転写をエピジェネティックに制御する分子である。BET ファミリータンパク質の1つである bromodomain-containing protein 4 (BRD4) は、MLL 遺伝子の転座により生じた MLL 融合タンパク質複合体を構成する分子の1つであり、*HOXA9* や *MYC* の転写を亢進させることで白血病の発症に関与している。BET ファミリータンパク質を標的とした BET 阻害剤である I-BET151 が MLL 遺伝子関連白血病細胞に有効であることが報告されて以来、様々な BET 阻害剤が開発され、臨床試験も進行中であり、BET 阻害剤は有望な治療薬として期待されている。しかしながら、BET 阻害剤の長期使用による耐性獲得が懸念されるため、耐性化機序を解明することは重要な課題である。

そこで本研究では、BET 阻害剤である OTX015 に耐性を持つ MLL 遺伝子関連白血病細胞株を樹立し、その性状解析と性状に基づいた新規の BET 阻害剤耐性化機序の探索を行った。

第1章 BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立およびその性状解析

マウスおよびヒト MLL 遺伝子関連白血病細胞株 (MLL-AF5q31, MV4;11) に対して、OTX015 含有培地で長期間培養し BET 阻害剤耐性株を樹立した。樹立した耐性株は、OTX015 だけでなく JQ-1 や I-BET151 といった他の BET 阻害剤に対しても耐性を示し、感受性株で細胞死が誘導される OTX015 濃度 (MLL-AF5q31: 5 μ M, MV4;11: 250 nM) でも細胞周期の停止やアポトーシスの誘導は認められなかった。

次に、qRT-PCR 法による mRNA 発現およびウエスタンブロット法を用いたタンパク質発現の解析により耐性株の性状を調べた。耐性株では、BET 阻害剤の標的である BRD4 のタンパク質発現が顕著に上昇しており、さらに BRD4 が発現を制御している c-MYC、CDK6、BCL-2 の mRNA およびタンパク質の発現亢進を認めた。一方、BRD4 の mRNA 発現については親株と耐性株の間に変化はなかった。これらの結果から、耐性株では BRD4 タンパク質の過剰な蓄積による標的遺伝子の転写亢進により BET 阻害剤耐性を獲得することが示唆された。

BRD4 タンパク質はユビキチン・プロテアソーム系によりその分解が制御されている。樹立した耐性株とその親株において、既報で見られる BRD4 の分解を制御する分子である speckle type BTB/POZ protein (SPOP) や deubiquitinating protein 3 (DUB3) の発現に差は認められなかったが、脱ユビキチン化酵素である ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 (UCHL5) の発現が耐性株において上昇していることを発見した。この結果より、耐性株における BRD4 タンパク質の過剰発現は、UCHL5 による BRD4 の分解抑制を介して起こり得ることが示唆された。

第2章 BRD4 タンパク質の分解に着目した BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病における耐性化機序の解析

前章で明らかとなった耐性株における UCHL5 の発現上昇が、BRD4 タンパク質の分解および耐性株の増殖に関与しているかを明らかにするために、UCHL5 に対する shRNA を耐性株に導入することで UCHL5 ノックダウン細胞株を作製し、BRD4 発現および細胞増殖における影響を検証した。その結果、UCHL5 のノックダウンにより耐性株における BRD4 タンパク質の発現が顕著に減少し、細胞増殖が抑制された。次に UCHL5 阻害剤である b-AP15 を処置したところ、BRD4 タンパク質発現は減少し、細胞増殖抑制、アポトーシスが誘導された。さらに、UCHL5 の阻害が耐性株における OTX015 の感受性を回復させるかどうかを検証するため、b-AP15 の前処置後 OTX015 の細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、b-AP15 を前処置することにより、耐性株における OTX015 の感受性は一部回復した。以上のことから、UCHL5 は BRD4 タンパク質の分解に関与しており、UCHL5 の阻害により BRD4 タンパク質の発現を減少させることが BET 阻害剤耐性の克服につながることを示唆された。

脱ユビキチン化酵素の機能は、転写調節やリン酸化などの翻訳後修飾により厳密に制御されている。UCHL5 は細胞周期の進行に関与する E2 promotor binding factor 1 (E2F1) により発現が制御されることが報告されている。E2F1 の機能は CDK4/6-Cyclin D 複合体による retinoblastoma transcriptional corepressor (RB) のリン酸化に依存することから、BET 阻害剤耐性株における UCHL5 の制御機構について、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib を用いて検証した。その結果、Abemaciclib 処置により、UCHL5 の発現低下を認めた。また、Abemaciclib 処置により BRD4 タンパク質の発現が低下し、BRD4 が制御する分子である c-MYC、CDK6、BCL-2 のタンパク質発現も低下した。さらに、Abemaciclib は OTX015 耐性株の細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導し、Abemaciclib の併用により OTX015 に対する感受性が上昇した。これらの結果から、BET 阻害剤耐性株において、UCHL5 は CDK4/6 によって発現が制御されており、CDK4/6 阻害剤は BET 阻害剤耐性を克服する薬剤になり得ることが示唆された。

総括

本研究により、MLL 遺伝子関連白血病細胞株の BET 阻害剤耐性化において、CDK4/6 と UCHL5 からなる BRD4 タンパク質分解抑制経路が重要な 1 つであることを明らかにした。本研究の成果は、BET 阻害剤の薬剤耐性という課題への対策に資する重要な知見である。

審査の結果の要旨

《緒言》

急性白血病において、*mixed-lineage leukemia (MLL)* 遺伝子の転座を伴う MLL 遺伝子関連白血病は予後不良であるため、新規治療薬の開発が進められている。Bromodomain and extra-terminal (BET) ファミリータンパク質を標的とした BET 阻害剤が有望な治療薬として期待されているが、長期使用による薬剤耐性の出現が懸念されており、耐性化機序の解明は重要な課題である。

本研究は、MLL 遺伝子関連白血病における BET 阻害剤耐性化機序の解明および耐性化を克服する治療標的の同定を目的とする基礎研究である。現在臨床試験が進められている BET 阻害剤である OTX015 を用いて耐性株を樹立し、性状解析に基づいた新規の BET 阻害剤耐性化機序ならびに耐性を克服する治療標的を探索している。

《審査結果の要旨》

第1章では、2株の MLL 遺伝子関連白血病細胞株を用いて、OTX015 の長期間処置により OTX015 耐性株を樹立し、OTX015 に感受性を持つ親株と比較した耐性株の性状を解析している。耐性株では、親株で誘導された BET 阻害剤による細胞周期の停止や細胞死に抵抗性を示し、その機序として、BET 阻害剤の標的である bromodomain containing protein 4 (BRD4) の著明な発現上昇に伴う BRD4 の標的分子である cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) および B-cell/CLL lymphoma 2 (BCL-2) の転写、翻訳亢進が関与することを明らかにした。続いて、ユビキチン関連分子の発現解析により、脱ユビキチン化酵素である ubiquitin C-terminal hydrolase L5 (UCHL5) の発現が耐性株において上昇していることを見出し、UCHL5 が BRD4 タンパク質の安定化に寄与する新規の分子である可能性を示した。

第2章では、耐性株で発現上昇が認められた UCHL5 に着目し、BRD4 タンパク質の分解における UCHL5 の寄与および UCHL5 の BET 阻害剤耐性を克服する治療標的としての有用性を評価している。UCHL5 の阻害により、耐性株において BRD4 タンパク質の発現が低下したことを示し、UCHL5 が BRD4 タンパク質の分解を制御することを明らかにした。また本章では、UCHL5 の制御機構について検討しており、UCHL5 の発現が細胞周期関連分子 E2 promotor binding factor 1 (E2F1) により制御されることから、CDK4/6 による UCHL5 発現の制御を着想し、その関与を検証している。CDK4/6 の阻害により耐性株における UCHL5 の発現が低下したことを示し、CDK4/6 が UCHL5 の発現を制御することを明らかにした。さらに、UCHL5 阻害剤および CDK4/6 阻害剤は細胞増殖抑制、細胞死を誘導し、OTX015 との併用により、耐性株における OTX015 の感受性が回復したことから、UCHL5 および CDK4/6 は BET 阻害剤耐性を克服する有効な治療標的であると結論付けられる。

《審査の結論》

本論文では、BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞における性状解析に基づいて、CDK4/6 と UCHL5 からなる BRD4 タンパク質分解抑制経路が重要な1つであり、この経路を標的とする UCHL5 および CDK4/6 阻害剤は、BET 阻害剤耐性を克服する有効な治療薬になることを、科学的根拠をもとに明確に論じられている。本基礎的研究の成果は、BET 阻害剤の、薬剤耐性という課題への対策に資する重要な知見と考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。