

令和元年度

岡山大学大学院保健学研究科

博士学位申請論文

内容要旨

検査技術科学分野

荒尾 雄二郎 教授 指導

7 3 4 2 8 0 0 9

榊原 佳奈枝

令和元年 6 月提出

内 容 目 次

主 論 文

**Binimetinib, a novel MEK1/2 inhibitor, exerts anti-leukemic effects under inactive
status of PI3 kinase/Akt pathway**

(新規 MEK1/2 阻害剤であるビニメチニブは PI3 キナーゼ/Akt 経路の不活性状態下で
抗白血病効果を発揮する)

榑原佳奈枝、辻岡貴之、木田潤一郎、黒住奈美、中原貴子、末盛晋一郎、
北中 明、荒尾雄二郎、通山 薫

International Journal of Hematology (掲載予定)

主 論 文

新規 MEK1/2 阻害剤であるビニメチニブは PI3 キナーゼ/Akt 経路の不活性状態下で
抗白血病効果を発揮する

[緒言]

急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) などの造血器腫瘍における治療戦略は日々進歩しているが、現在でもなお、造血幹細胞移植 (HSCT) を実施しない限り完全な治癒を達成するのは難しい。このような状況から、HSCT の実施に適さない患者に対する新しい治療選択肢が期待されている。今日まで、多くのがん遺伝子が造血器腫瘍の進行に関与していると報告されている。その中でも *RAS* は最初に同定されたがん遺伝子の 1 つであり、細胞増殖および生存に寄与する。新規 *RAS* 阻害剤ビニメチニブは非 ATP 競合アロステリック MEK1/2 阻害剤であり、MEK1/2 のキナーゼドメイン以外の別の位置に結合することでシグナル伝達を抑制する。これまでにビニメチニブは、肺、膵臓、結腸、神経、皮膚など様々な組織に由来する癌細胞の増殖を抑制することが報告されており、特に *N-RAS* 変異を有する悪性黒色腫細胞に対して、より効果的であることが示されている。造血器腫瘍においては Kerstjens らにより *N-RAS* 変異を有する小児急性リンパ芽球性白血病患者に対する検討が行われた。しかしながら、成人急性白血病および MDS におけるビニメチニブの効果は不明のままである。本研究では、*N-RAS* 変異の有無にこだわらず、骨髄性/リンパ性白血病細胞株に対するビニメチニブの細胞増殖抑制効果を調べ、その主たる原因の解明と、ビニメチニブの治療効果を予測できるバイオマーカーの特定を試みた。

[材料と方法]

(1) 試薬

ビニメチニブおよびブパリシブはジメチルスルホキシドで溶解後、それぞれ最大 10 μM と 2 μM の濃度で使用した。

(2) 細胞株および培養

N-RAS 変異陽性ヒト白血病細胞株として HL-60 (Q61L)、TF-1 (Q61P)、MDS-L (G12A)、THP-1 (G12D)、MOLT4 (G12C) を使用した。一方、*N-RAS* 変異陰性ヒト白血病細胞株には Jurkat、MOLM13、K562、U937、F-36P を使用した。これら細胞株は 10% ウシ胎児血清および 100 U/mL の IL-3 を補充した RPMI1640 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

(3) *RAS* 変異解析

全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) で抽出し、One step RNA PCR Kit (TAKARA

BIO) と対応するプライマーを用いて RT-PCR を行った。その生成物を 0.8%アガロースゲル上で電気泳動分離し、Wizard[®]SV Gel と PCR Clean-up System (Promega) で精製後、製造元の指示に従って pCR[™]II-TOPO[®] vector (Invitrogen by Life Technologies) に連結した。その後、Big Dye terminator ver 3.1 Cycle Sequencing Kit と ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて配列決定した。

(4) 細胞増殖アッセイと MTT 試験

細胞増殖はトリパンブルー染色後の生細胞数を数えることにより評価した。MTT 試験は細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに播種し、37°C で 1~4 日間インキュベート後、MTT 試薬を加えて吸光度測定した。

(5) アポトーシスアッセイ

AnnexinV Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen) を用い、FACS Calibur flowcytometer と CellQuest software (Becton Dickinson) でアポトーシスを解析した。

(6) 細胞周期解析

メタノール固定後の細胞懸濁液に 2 mg/mL のリボヌクレアーゼ A (Nacalai Tesque) と 50 µg/mL のヨウ化プロピジウム (Sigma) を加え、FACS Calibur flowcytometer と CellQuest software (Becton Dickinson) で細胞周期を解析した。

(7) イムノブロットィング解析

細胞溶解物を SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロット法で解析した。一次抗体には Santa Cruz Biotechnology (bcl2, bcl-XL/Xs)、Cell Signaling Technology (ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、S6、p-S6、cPARP)、Sigma-Aldrich (α-tubulin) を、二次抗体は GE Healthcare Life Sciences の西洋ワサビペルオキシターゼ標識抗ウサギおよびマウス抗体を使用した。

(8) 遺伝子発現プロファイリングと GSEA 解析

100 nM のビニメチニブで 24 時間処理した HL-60 の全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) で抽出後、cDNA に変換した。GeneChip WT Terminal Labeling and Controls Kit (Affymetrix) で増幅し、GeneChip Scanner 3000 7G System (Affymetrix) でスキャン後、遺伝子発現プロファイリングデータと GSEA ソフトウェアで解析した。

(9) 統計処理

グループ間の統計学的比較には Dunnett と Scheffe の検定 (p<0.05) を使用した。

[結果]

(1) ビニメチニブは主に G₁ 細胞周期停止により白血病細胞株の増殖を阻害する。

10 種の細胞株に対しビニメチニブを 0-10 µM の濃度で 0-96 時間インキュベーション後、MTT 試験で IC₅₀ 値を調べた。IC₅₀ 値のカットオフ濃度は第 1 相試験結果より 96 時間で 1 µM と定義した。その結果、全 10 種の細胞株を 4 つのビニメチニブ感受性株 (HL-60、TF-1、MDS-L、F-36P) と 4 つのビニメチニブ耐性株 (Jurkat、MOLM13、

U937、MOLT4) に分類できた。次に、この増殖抑制効果の原因を調べるためにアポトーシスアッセイと細胞周期解析を行った。驚くべきことに、ビニメチニブのアポトーシス誘導は非常に限定的であった。一方、ビニメチニブ感受性株では押し並べて G₁ 細胞周期停止が起こっていた。

(2) ビニメチニブに対する感受性は Akt のリン酸化状態に関連する。

ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、S6、p-S6 の発現量をイムノブロットング解析で調べたところ、細胞株間における感受性の程度に関わらず、ビニメチニブは MEK/ERK シグナル伝達経路を抑制していた。また、各細胞株における p-ERK および p-Akt の基礎レベルを調べたところ、リン酸化の程度は細胞株毎に変動しており、ERK と Akt 間で相互的に相容れない関係であるように見えた。興味深いことに、ビニメチニブ耐性株は感受性株と比較して Akt のリン酸化が強い状態であった。

(3) ビニメチニブは細胞周期の G₁-S 移行に関与する遺伝子発現に影響を与える。

ビニメチニブにより調節される分子経路を調べるために、HL-60 を用いて遺伝子発現プロファイリングと GSEA 解析を行った。その結果、1019 個の遺伝子はビニメチニブにより発現が上昇し、951 個の遺伝子は発現が低下した。また、最も有意に影響を受けた GSEA セットは「CYCLIN E ASSOCIATED EVENTS DURING G1-S TRANSITION」であった。まとめると、遺伝子発現プロファイリングはビニメチニブが HL-60 における細胞周期 G₁-S 進行に関与する遺伝子経路を抑制することを示唆した。

(4) PI3 キナーゼ/Akt 阻害剤であるブパリシブとビニメチニブの併用により、白血病細胞株に対する抗腫瘍効果は増強できる。

ビニメチニブ単剤での使用は白血病細胞の増殖阻害を誘導するには不十分である可能性があるため、我々は本薬剤にブパリシブを併用処理し、各細胞株を培養した。その結果、TF-1 および F-36P に対して増殖抑制効果が増強することを MTT 試験により証明した。また、これら薬剤の併用はアポトーシス細胞を相加的に増加させた。

[考察]

本研究では、*N-RAS* 変異を伴う 5 株と *N-RAS* 変異を伴わない 5 株、計 10 種類の骨髄性/リンパ性白血病細胞株を用いて、新規 MEK1/2 阻害剤ビニメチニブの効果を調べた。今まで、様々な研究グループにより悪性腫瘍細胞における *RAS* 突然変異の存在と MEK1/2 阻害剤に対する感受性の関係が調べられてきた。それによると、大部分の報告は *RAS* 突然変異を有する細胞は変異を有さない細胞と比較して MEK1/2 阻害剤に対してより感受性を認める傾向にあると結論付けられた。それにも関わらず、薬物感受性と *RAS* 変異との関連性には依然として不明確な部分があった。本研究においても、4 種のビニメチニブ感受性株のうち 3 株 (75%) しか *N-RAS* 変異を有しておらず、ビニメチニブの抗腫瘍効果は *N-RAS* 変異の有無以外の要因による可能性が示唆された。興味深いことに、ビニメチニブ耐性株は感受性株と比較して Akt の強いリン酸化状態を有し

ていた。したがって、このリン酸化状態でビメチニブの造血器腫瘍に対する治療効果が予測可能と考えられる。しかし、4種のビメチニブ感受性株の中でも ERK および Akt のリン酸化状態の両方が認められない場合、ビメチニブ単剤では限定的な抗腫瘍効果しか示さなかった。そこで、ビメチニブと PI3 キナーゼ/Akt 阻害剤であるブパリシブを併用したところ、相加的な抗腫瘍効果が認められた。本研究結果より、新規 MEK1/2 阻害剤ビメチニブや PI3 キナーゼ/Akt 阻害剤ブパリシブなどを用いる治療は、HSCT に適さない患者や再発・難治性造血器腫瘍に対する新たな治療戦略となり得ることが明らかとなった。ただし、そのためには腫瘍細胞における増殖シグナル伝達の特徴に基づく適正な使用が必須と考えられる。

[結論]

新規 MEK1/2 阻害剤であるビメチニブは主に G₁ 細胞周期停止を誘導することにより細胞増殖を阻害することがわかった。この抗腫瘍効果は *N-RAS* 変異の有無ではなく、むしろ Akt のリン酸化状態により左右されると考えられ、このリン酸化状態がビメチニブの造血器腫瘍に対する治療効果を予測するバイオマーカーとして役立ち得ると期待される。今後、ビメチニブは HSCT に適さない患者や再発・難治性造血器腫瘍の新たな治療戦略の1つとなるであろう。