



TOHOKU MEDICAL AND PHARMACEUTICAL UNIVERSITY

4-4-1, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan

Tel: +81-22-234-4181; Fax: +81-22-275-2013

<https://www.tohoku-mpu.ac.jp/>

令和6年01月31日

報道関係者各位

学校法人東北医科薬科大学

## 急性骨髄性白血病 (AML) の新たな治療法の開発に寄与

—血液がんの再発や悪性度に影響するタンパク質の同定と機能解析—

### 【発表のポイント】

- 難治性の急性骨髄性白血病 (AML) 患者でよく見られる受容体型チロシンキナーゼFLT3の変異体に特異的に結合する分子を同定した。
- 脱ユビキチン化酵素BRCC36は、悪性度の高いFLT3-ITD変異体と特異的に相互作用し、ITD変異体の安定性とその下流シグナルの増加に寄与する。逆に、BRCC36を阻害することで、細胞増殖が抑制できた。
- FLT3変異を有するAMLの治療にはチロシンキナーゼの阻害剤を併用するが、FLT3-ITD変異は標準的な抗がん剤治療には抵抗性を示す。今回の発見は特定のユビキチンプロテアソーム系を制御することで、治療抵抗性を克服できる可能性を示している。

### 【概要】

急性骨髄性白血病 (AML) でよく変異する遺伝子 Fms-like チロシンキナーゼ 3 (FLT3)<sup>\*1</sup>には最も良く生じる内部タンデム重複ドメイン (ITD) 変異<sup>\*2</sup>とチロシンキナーゼドメイン (TKD)<sup>\*3</sup>変異があります。それぞれのタンパク質の安定性、細胞局在化、細胞内シグナル伝達が異なり、このことが患者の予後に影響を与えていると考えられています。このメカニズムを理解するために、薬学部 顧 建国 教授、藤村 務 教授、医学部 高橋 伸一郎 教授らは、近接依存性標識法<sup>\*4</sup>を用いて、FLT3-ITD またはTKDと特異的に相互作用するタンパク質を解析し、質量分析によって同定しました。

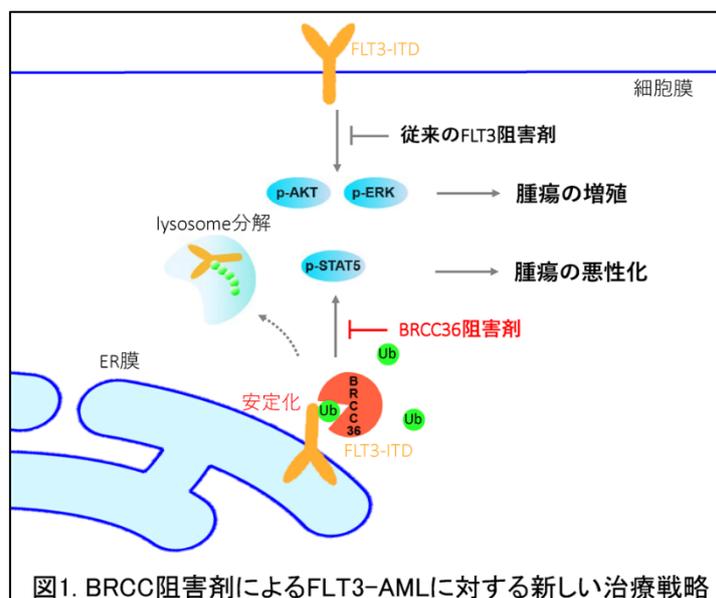
同定した分子の中に、FLT3-ITDと特異的に相互作用する分子BRCC36<sup>\*5</sup>が見つ

りました。BRCC36 は蛋白質に付加されたリジン 63 結合ポリユビキチン鎖を特異的に加水分解する脱ユビキチン化酵素です。脱ユビキチン化することによりユビキチン化\*6によるタンパク質の分解が抑えられます。siRNA 法を用いて BRCC36 の発現を抑制すると、ITD の発現量、下流シグナル STAT5 のリン酸化及び細胞増殖が減少しました。一方、野生型や TKD 発現細胞では BRCC36 発現抑制の影響は認められませんでした。さらに、BRCC36 の阻害剤であるチオルチン処理により、ITD 細胞のみ細胞増殖の抑制とアポトーシスが誘導されました。チオルチンは、AML の標準臨床薬であるキザルチニブ(FLT3 チロシンキナーゼ活性を阻害剤)と相乗効果を示しました。

さらに、BRCC36 により脱ユビキチン化される部位を検討したところ、ITD 変異体の重複ドメインの繋ぎ目にある 609 位のリジン残基が特異的に認識されることがわかりました。

これらのことから、BRCC36 が FLT3-ITD の特異的な調節因子であり、BRCC36 に対する感受性の違いが FLT3-ITD の安定化に関連し、AML の予後(再発・難治性)に影響を与えるものと考えられます(図 1)。BRCC36 の働きを制御することで、悪性度の高い FLT3-ITD 変異体の治療抵抗性の克服につながることを期待されます。

この研究成果は、国際科学雑誌「Cancer Science」に 2024 年 1 月 30 日付けで公開されました。



標準的な AML の治療ではチロシンキナーゼの阻害剤が用いられておりますが、FLT3-ITD 変異は ER に安定的に存在し、チロシンキナーゼ阻害剤耐性遺伝子変異を獲得します。一方、BRCC36 は FLT3-ITD の安定化に関連し AML の再発・難治性に影響を与えると考えられます。BRCC36 の働きを阻害することで、FLT3-ITD 変異体を不安定化することは新しい治療法になるのではないかと期待されています。さらに、FLT3/BRCC36 の二重阻害が FLT3-ITD の治療抵抗性を克服できる可能性があるかと期待しています。

## 【研究背景と内容】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia : AML) は、分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞による血液がんです。AML における遺伝子変異は細胞増殖に促進的に関与する遺伝子変異と細胞分化抑制に関与する遺伝子変異が知られていますが、他のがん種に比較して少数の遺伝子変異の蓄積により発症すると考えられています。AML の原因の中で Fms-like チロシンキナーゼ 3 (FLT3) は、最も頻繁に変異が認められる遺伝子で、内部タンデム重複 (ITD) 変位とチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異 (変異頻度は ITD : 20~28%TKD : 5~10%) が知られています。細胞表面受容体である FLT3 に変異による活性化が生じると、リガンドが結合しなくとも、常に活性化し下流シグナルの活性化を介して、白血病細胞の増殖を促進します。特に ITD 変異は変異のない患者と比べ、再発率が高く生存期間が短いことが知られています。

ITD 変異と TKD 変異は、多くの白血病細胞で恒常的に活性化されている STAT5 や ERK などを、異なる程度で活性化しますが、その制御機構の相違は分からないことが多く残されています。変異により相互作用するタンパク質が異なることが予測されたので、まず、近接依存性標識法を用いて、FLT3-ITD または TKD と特異的に相互作用するタンパク質を解析し、質量分析によって同定しました。FLT3-WT、ITD、および TKD サンプルから 371 個の相互作用するタンパク質を同定しました。その中に、ITD 特異的なタンパク質が 12 種類、TKD 特異的なタンパク質が 16 種類ありました。タンパク質の安定性、小胞輸送、またはシグナル伝達に関連する 11 個の候補タンパク質の機能を解析し、BRCC36 の発現抑制が、ITD 細胞特異的にリン酸化 STAT5 および ERK を有意に抑制することを見つけたので、BRCC36 に注目した解析を進めました。BRCC36 は蛋白質に付加されたリジン 63(K63)結合ポリユビキチン鎖を特異的に加水分解する脱ユビキチン化酵素です。ユビキチン化はユビキチンリガーゼと脱ユビキチン化酵素 (DUB) による可逆的反応です。付加されるユビキチン鎖には多様な結合様式が知られていますが、K63 結合ポリユビキチン鎖(K63 鎖)は、DNA 損傷修復、キナーゼシグナル伝達経路、受容体輸送に関わっています。BRCC36 は脱ユビキチン化することによりユビキチン化されたタンパク質の分解を防ぎます。

Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) データベースに因りますと、健康群と比較して AML 群では BRCC36 が顕著に発現上昇しています。免疫共沈降実験により、BRCC36 が ITD 変異体と特異的に相互作用することを確認しました。さらに、BRCC36 の発現を抑制すると ITD 変異体を不安定化しました。BRCC36 と FLT3-ITD 間の相互作用は特異的かつ機能的であることがわかりましたので、さらに、FLT3-ITD シグナル伝達と細胞増殖に対する BRCC36 発現抑制の影響を検討したところ、リン酸化 STAT5 (p-STAT5) レベルが著しく減少しました。逆に、BRCC36 の過剰発現は ITD 発現細胞の FLT3 発現を増加させ、p-STAT5 レベルを高めました。さらに、細胞増殖に対しても同様の効果が認められました。

FLT3-ITD 発現に及ぼす K63 ユビキチン鎖の影響について検討したところ、

BRCC36 が FLT3-ITD の K63 結合ポリユビキチンを分解してタンパク質の安定性を高めていることがわかりました。さらに、BRCC36 が ITD 特異的であるのかを理解するために、FLT3-ITD の K63 結合ポリユビキチン化部位を検討したところ、膜近傍ドメイン (内部タンDEM重複領域) に位置する 609 位のリジン残基が K63 ユビキチン化にとって重要な部位であることがわかりました。

BRCC36 が FLT3-ITD の安定化に関連し AML の予後(再発・難治性)に影響を与えると考えられたことから、BRCC36 阻害剤と FLT3 キナーゼ阻害剤(チオルチンおよび/または AML に対して臨床的に期待できるチロシンキナーゼ阻害剤である AC220 (キザルチニブ) の相乗効果を検討しました。BRCC36 阻害剤と FLT3 キナーゼ阻害剤の組み合わせが細胞増殖の抑制とアポトーシスを有意に誘導することがわかりました(図 2)。FLT3/BRCC36 の二重阻害が再発・難治性である FLT3-ITD 患者の臨床治療に適用できる可能性があることを示しています。

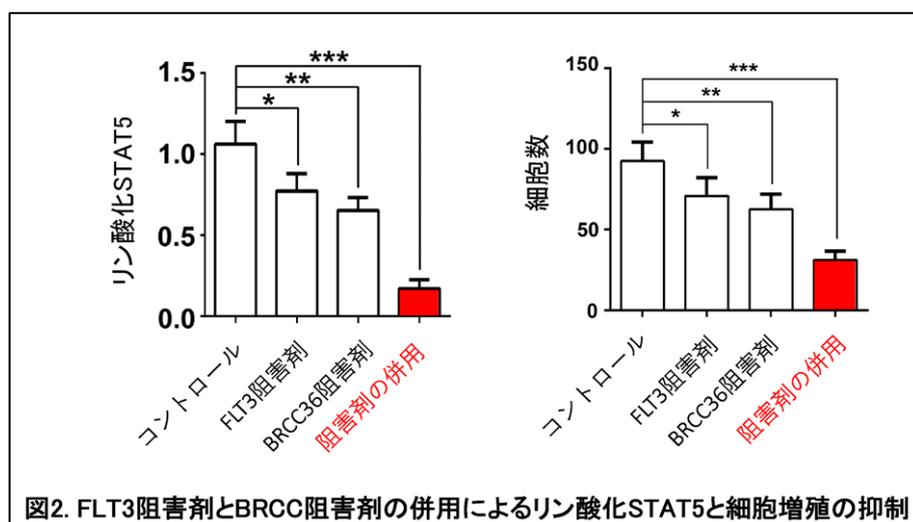


図2. FLT3阻害剤とBRCC阻害剤の併用によるリン酸化STAT5と細胞増殖の抑制

BRCC36 が FLT3-ITD の安定化に関連することから、BRCC36 阻害剤と FLT3 キナーゼ阻害剤の効果を検討したところ、BRCC36 と FLT3 のキナーゼ活性を同時に阻害することで、STAT5のリン酸化(左)と細胞増殖が抑制されることがわかりました(右)。FLT3 と BRCC36 の二重阻害が FLT3-ITD 患者の治療に新しい選択肢になることを期待しています。

### 【成果の意義】

現在の標準的な AML の治療ではチロシンキナーゼの阻害剤を用いられていますが、FLT3-ITD 変異はチロシンキナーゼ阻害剤耐性遺伝子変異を獲得することから、標準的な抗がん剤治療には抵抗性を示し、再発・難治性を獲得してしまいます。今回の発見は BRCC36 を制御することで、治療抵抗性を克服できる可能性を提案するもので、FLT3-ITD 陽性患者の効果的な治療法の開発に寄与することが期待されます。

本研究は、JSPS 科研費 23H02440, 22K19443, 22K06615, 21K06547 および共同利用・共同研究拠点として文部科学大臣認定を受けた糖鎖生命科学連携ネットワーク型拠

点 (J-GlycoNet) における戦略的融合研究として、ヒューマングライコームプロジェクト(Human Glycome Atlas Project (HGA))を推進する共同研究として実施されました。

### 【用語説明】

- \*1 Fms-like チロシンキナーゼ 3 (FLT3) : 造血細胞の増殖と分化を制御する重要な細胞表面受容体チロシンキナーゼで、しばしば AML で変異が生じる。
- \*2 内部タンデム重複 (ITD) 変異 : FLT3 遺伝子の一部が重複する重要な変異で、細胞の異常増殖や分化の異常を引き起こすことがある。
- \*3 チロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異 : FLT3 のチロシンキナーゼ活性を活性化する変異。
- \*4 近接依存性標識法 : 目的タンパク質の近傍(近い距離)に反応性が高いビオチン標識分子を酵素的に産生させ、近傍のタンパク質をビオチン標識させる技術。
- \*5 BRCC36 : K63 結合ポリユビキチン鎖を特異的に加水分解する酵素。DNA 損傷修復・細胞シグナル伝達・細胞周期制御など種々の種に関与するなどさまざまな生命現象に関わる。
- \*6 ユビキチン化(修飾) : タンパク質翻訳後修飾の一種で、ポリユビキチン鎖を形成することが多い。ポリユビキチン修飾は、プロテアソームによるタンパク質分解・エンドサイトーシス・DNA 修復・翻訳調節・シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わる。

### 【論文名】

タイトル : BRCC36 associates with FLT3-ITD to regulate its protein stability and intracellular signaling in acute myeloid leukemia

著者 : Jianwei Liu<sup>1</sup>, Tomoya Isaji<sup>1</sup>, Sachiko Komatsu<sup>2</sup>, Yuhan Sun<sup>1</sup>, Xing Xu<sup>1</sup>, Tomohiko Fukuda<sup>1</sup>, Tsutomu Fujimura<sup>2</sup>, Shinichiro Takahashi<sup>3,4</sup> and Jianguo Gu<sup>1,4</sup>

著者所属 : <sup>1</sup> 東北医薬大・薬・細胞制御; <sup>2</sup> 東北医薬大・薬・臨床分化;  
<sup>3</sup> 東北医薬大・医・臨床検査; <sup>4</sup> 責任著者

DOI: 10.1111/cas.16090

ウェブサイト : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.16090>

<p><b>【本件に関するお問い合わせ先】</b></p> <p>東北医科薬科大学 薬学研究科 細胞制御学教室 教授 顧 建国 (グ チェゴ) TEL : 022-727-0216 (直通) E-mail : <a href="mailto:jgu@tohoku-mpu.ac.jp">jgu@tohoku-mpu.ac.jp</a></p> <p>東北医科薬科大学 医学研究科 臨床検査医学教室 教授 高橋 伸一郎 TEL : 022-290-8889 (直通) E-mail : <a href="mailto:shintakahashi@tohoku-mpu.ac.jp">shintakahashi@tohoku-mpu.ac.jp</a></p>	<p>(取材に関すること)</p> <p>東北医科薬科大学 広報室 担当：片岡 (かたおか) TEL : 022-727-0363(直通) E-mail : <a href="mailto:koho@tohoku-mpu.ac.jp">koho@tohoku-mpu.ac.jp</a></p>
--	---