

2018 年度

博士学位論文

BCL2 阻害剤 (ABT-199) と JNK 阻害剤 (SP600125) が
イマチニブ耐性 Ph+ ALL 細胞に対して示す
相乗的な殺細胞効果

中部大学大学院

生命健康科学研究科 生命医科学専攻

井上 千聖

目次

第一章 緒言	2
第二章 実験方法	4
第一節 細胞株	
第二節 試薬	
第三節 生細胞数測定	
第四節 ウェスタンブロット	
第五節 Isobologram 解析	
第六節 統計解析	
第三章 実験結果	9
第一節 NphA2/STIR 細胞の特性解析	
第二節 細胞内シグナル経路の解析	
第三節 BCL2 ファミリー阻害剤の効果	
第四節 ABT-199、IMT および SP600125 の併用効果	
第四章 考察	42
参考文献	47
謝辞	57

第一章 緒言

急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) は、骨髄、末梢血およびその他の臓器における未熟なリンパ系細胞の増殖に起因する疾患である^[1]。ALL は小児に多く発症し、小児白血病の約 80%を占めるが、成人白血病において ALL の割合は 20%程度である。また、小児 ALL は約 80%に長期の生存が認められる一方で、成人 ALL は治癒率が 30~40%と低く、予後不良である^[1, 2]。t(9; 22) の染色体相互転座 (フィラデルフィア染色体 [Philadelphia: Ph]) による BCR-ABL 融合遺伝子を有する ALL は、すべての ALL の中で最も予後が悪い^[3]。Ph の異常は小児 ALL では 3%とまれだが、成人 ALL は 25%以上であり、高齢者においては 50%に達する^[4]。これら白血病細胞の大部分は当初は通常の化学療法薬に感受性を示すが、完全寛解は長期間持続できない^[2, 4]。分子標的薬が導入される以前は、強力な化学療法を行っても寛解状態が続くのは Ph+ ALL 患者の 30%以下だった^[5]。さらに、同種幹細胞移植は Ph+ ALL の治療に有効だが、長期の全生存率はいまだ満足すべきものではない^[6]。

BCR-ABL 融合遺伝子は、Ph+ ALL と慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) において、重要な発がん因子として働くチロシンキナーゼをコードする。この BCR-ABL に特異的なチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitors: TKIs) の登場は、これら疾患の治療法を劇的に変えた^[7, 8]。第 1 世代の TKI 治療薬である

イマチニブ (imatinib: IMT) は、安全で疾患関連死がなく、血液学的完全寛解ならびに細胞遺伝学的基準でも有効である。したがって、TKIs はこれら疾患 (Ph+ ALL、CML) の第一選択薬になった。

このように有効な TKIs による治療にも関わらず、これら疾患はよく再発してくる^[9]。再発の原因の1つには、BCR-ABL の point mutation (T315I を含む) または compound mutation が挙げられる。IMT よりも、さらに効能のある新規 TKIs (第2世代、第3世代と続く TKIs) が治療に導入されつつある。しかしながら、第3世代の TKIs に対して耐性を獲得したという症例がすでに報告されている^[10]。また、このような耐性の報告に加えて、第3世代の TKI は少なからぬ頻度で深刻な血管障害も引き起こすことが分かってきている^[11]。

本研究は、Ph+ ALL 細胞株である NphA2 細胞^[12] と Ph+ bi-phenotypic AL 細胞株である MR87 細胞^[13] ならびに、親株より樹立した IMT 耐性である NphA2/STIR 細胞および MR87/STIR 細胞を使用してその IMT 耐性について調べた。NphA2/STIR 細胞株は、BCR-ABL のキナーゼドメインに変異を持たず、phosphorylated ABL の増加を示さないことがすでに論文で示されている^[12]。本研究では、これらの細胞株を用いて、いくつかの重要な細胞内シグナル経路およびアポトーシス経路に焦点をあてて、BCR-ABL 非依存的な IMT 耐性のメカニズムについての解析を行った。

第二章 実験方法

第一節 細胞株

本研究には表-1 に示す細胞株を使用した。IMT 耐性である MR87/STIR 細胞は、MR87 細胞^[13] の培養液に IMT を添加し、その濃度を徐々に上げていくことにより樹立した。

表-1 使用した細胞株

使用した細胞株	文献
NphA2、NphA2/STIR	Suzuki M. <i>et al.</i> , Eur. J. haematol., 84: 229-238, 2009
MR87	Okumura J. <i>et al.</i> , Blood, 72: 1261-1268, 1998
TccY/sr	Shiotsu Y. <i>et al.</i> , Blood, 114: 1607-1617, 2009
K562、K562/DNR	Nishida Y. <i>et al.</i> , Biochim. Biophys. Acta. ,1839: 265-274,2014
NALM16、Jurkat、U937	Sobue S. <i>et al.</i> , Int. J. Hematol., 87: 266-275, 2008
MEGA2	Abe A. <i>et al.</i> , Leukemia, 9: 341-349, 1995

第二節 試薬

Imatinib (IMT) 、nirotinib (NRT) 、dasatinib (DST) は、富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。細胞内シグナル経路阻害剤である U0126、LY294002、SB203580、SP600125 は、Calbiochem より購入した。BCL2 阻害剤の ABT-199 (venetoclax) 、汎 BCL2 ファミリー阻害剤の ABT-263 (navitoclax) および MCL-1 阻害剤の A-1210477 は、Abcam より購入した。MCL-1 阻害剤の marinopyrrole A (maritoclax) は ChemScene より購入した。JNK 阻害剤の JNK-IN-8 および抗がん剤の

daunorubicin (DNR)、cisplatin (Cisp)、cytarabine (AraC)、etoposide (ETOP)、paclitaxel (PTX)、vincristine (VCR)、camptothecin (CPT) は Sigma より購入した。

第三節 生細胞数測定

ほとんどの場合、24 穴プレート (Thermo Fisher Scientific) に 1 穴あたり $2 \times 10^5/\text{mL}$ になるように細胞数を調製後、結果で示した各濃度の試薬を培養液に添加し、5% CO_2 、37°C環境のインキュベーター (CO_2 INCUBATOR、SANYO) 内で培養した。生細胞数の計測は、トリパンプルー染色により行った。

第四節 ウェスタンブロット

各種細胞を回収後、超音波により細胞を破碎した。95°C、5 分間の heat denature 後に、15,000rpm、10 分間の遠心をして上清をサンプルとした。このサンプルを、BCA 法によりタンパク濃度を測定し、サンプルバッファーで $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように調整した。ここに、BPB および 2-メルカプトエタノールを追加してウェスタンブロット用のサンプルとした。

電気泳動には、スーパーセップ™ エース、5-20% 17 well gel plate (富士フイルム和光純薬株式会社) を使用した。1 ウェルあたり、5 μL のプロテインマーカー (Bio-Rad) と 10 μL (20 μg) のサンプルをアプライした。パワーサプライ (PowerPac 300、

Bio-Rad) を 50mA (constant A) 、 300V に設定し、60 分間の電気泳動を行った。PVDF
メンブレンを 100% メタノールで 5 分間の振とう後、トランスファーバッファーで
平衡化した。電気泳動の終了後にゲルを取り出して、濾紙およびメンブレンではさんで
ブロッキング装置 (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell、Bio-Rad) にセットした。
パワーサプライを 16V (constant V) 、 300mA に設定し、40 分間のブロッキングを
行った。ブロッキング後、3% スキムミルクまたは 0.1% BSA 中にメンブレンを浸し、
室温で 60 分間のブロッキングを行った。ブロッキング後、1 次抗体を反応させた。
本研究に使用した 1 次抗体は表-2 に示した。1 次抗体の反応後、PBS-T で洗浄を
行った後に 2 次抗体 (HRP-linked Antibody、Cell Signaling Technology) を
反応させた。2 次抗体の反応後、PBS-T で洗浄した。メンブレンを ECL Select Western
Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) の基質に浸した後、検出に ATTO Cooled
CCD Camera System Light-Capture (アトー株式会社) を使用した。

表-2 使用した1次抗体

抗体名	購入先	商品コード
PCNA	Cell Signaling Technology	#13110
PARP	Cell Signaling Technology	#9532
cleaved Caspase 3	Cell Signaling Technology	#9664
p15	Cell Signaling Technology	#4822
p16	Cell Signaling Technology	#4824
p21	Cell Signaling Technology	#2946
p27	Cell Signaling Technology	#2552
ERK	Santa Cruz	sc-94
p-ERK	Santa Cruz	sc-7383
AKT	Cell Signaling Technology	#9272S
p-AKT	Cell Signaling Technology	#4060S
JNK	Cell Signaling Technology	#9252
p-JNK	Cell Signaling Technology	#9251
c-Jun	Cell Signaling Technology	#9165T
p-c-Jun	Cell Signaling Technology	#2361T
p38	Santa Cruz	sc-535
p-p38	Santa Cruz	sc-7975-R
BCL2	Santa Cruz	sc-492
BCI-XL	Abcam	ab32370
Survivin	Santa Cruz	sc-10811
MCL1	BD Pharmingen	559027
Bax	Santa Cruz	sc-526
Bak	Santa Cruz	sc-832
Bim	Cell Signaling Technology	#2819

第五節 Isobologram

Isobologram は、薬物の併用効果を評価する方法である。併用効果を評価したい各薬剤単独の IC_{50} をつなぐ直線を作成する (Fig. 1)。種々の濃度の 2 つの薬剤の併用による IC_{50} を測定し、グラフにプロットしてつないだ曲線が、この直線上にあれば相加効果、直線より左へシフトすれば相乗効果、逆に右へシフトすれば拮抗効果と評価する^[16]。

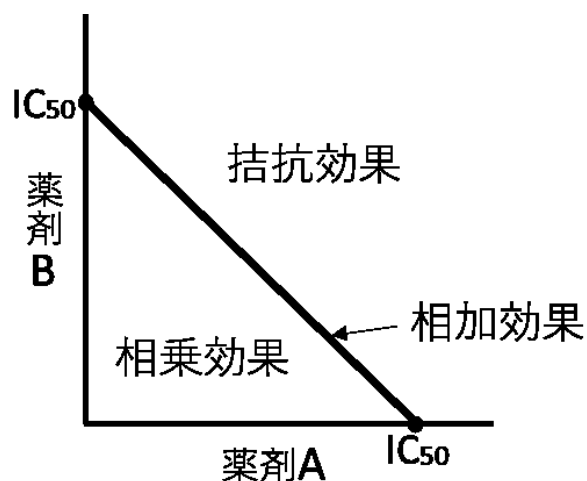


Fig. 1 Isobologram による薬物併用効果の評価

第六節 統計解析

統計解析は、Student's t-test または one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons を行った。すべての統計解析は GraphPad Prism 6 (MDF) を使用した。

第三章 実験結果

第一節 NphA2/STIR 細胞の特性解析

共同研究者の先行研究において、NphA2/STIR の IMT 耐性は BCR-ABL 非依存的であること、そして RAS/MAPK 経路に依存していることが示された^[12]。そこで、NphA2/STIR 細胞が IMT 以外の BCR-ABL 特異的 TKI にも耐性を示すのか検討した。生細胞数の測定により、BCR-ABL 特異的 TKIs (IMT、NRT、DST) はすべて、親株である NphA2 細胞の増殖を阻害する効果があることを確認した (Fig. 2A)。一方で、NphA2/STIR 細胞は IMT と同様に NRT、DST にも耐性を示した (Fig. 2B)。次に、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞への IMT 添加によるアポトーシス関連タンパク質、および細胞周期関連タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。NphA2 細胞では IMT 添加後の 2 日から 4 日にかけて PCNA の発現が減少し、cleaved PARP と cleaved Caspase3 が増加した (Fig. 3)。これは、IMT が培養 2 日から 4 日の間で徐々にアポトーシスを誘導していることを示す。細胞周期調節因子である p15 および p27 の発現は、NphA2 細胞において IMT 添加により増加した。NphA2/STIR 細胞ではいずれのタンパク質でも発現量に経時的な変化は見られなかった。したがって、NphA2 細胞において、IMT 添加による p15 および p27 の関与が示唆され、TKI により細胞周期の進行が阻止され、細胞生存性が減少したと考えられる。細胞周期調節因子の p16 はいずれの細胞においても検出されなかった。

次に、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞への従来の抗がん剤の効果についても検討を行った。これら 2 つの細胞株はともに同じような感受性パターンを示したが、NphA2 細胞に比べて NphA2/STIR 細胞は daunorubicin (DNR)、paclitaxel (PTX)、camptothecin (CPT) においてわずかに抵抗性が強かった (Fig. 4)。NphA2/STIR 細胞の TKI 耐性がおおむね BCR-ABL TKIs 特異的であることが示唆された。

MR87 細胞^[13] および培養液中の IMT 濃度を徐々に上げていくことにより樹立した MR87/STIR 細胞における TKIs の効果を生細胞数の測定により確認したところ、予想通り MR87/STIR 細胞は IMT、NRT、DST のすべてに耐性を示した (Fig. 5A)。さらに、CML 由来赤白血病細胞株である K562 細胞と、daunorubicin (DNR) 耐性の K562/DNR 細胞についても同様に検討した。K562 細胞と K562/DNR 細胞は 3 つの TKIs すべてに対して感受性であった (Fig. 5B)。これらの結果は、NphA2/STIR 細胞または MR87/STIR 細胞の IMT 耐性メカニズムと、K562/DNR 細胞の DNR 耐性のメカニズムが異なっていることを示唆する。

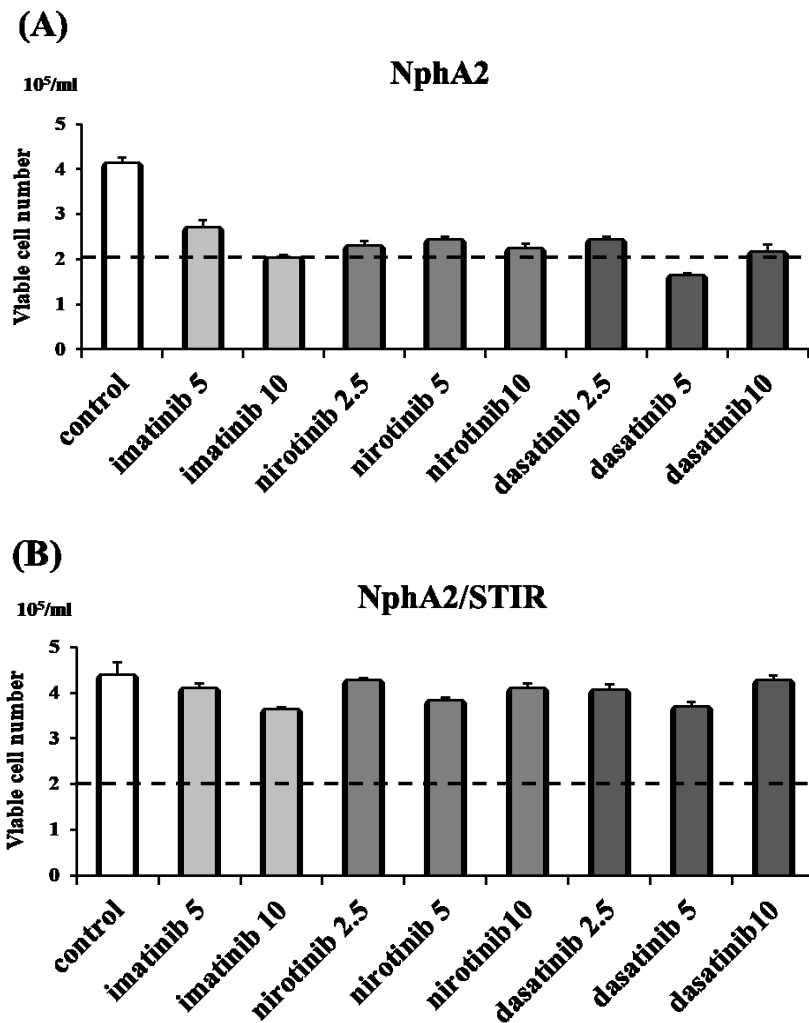


Fig. 2 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における TKIs の効果

BCR-ABL 特異的 TKIs (IMT、NRT、DST) をグラフに示す各濃度 (μM) で培養液に添加し、NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。

実験は 3 重測定で実施した。NphA2 細胞では、すべての TKIs に感受性を示し、細胞の増殖が抑えられた (A)。一方で、NphA2/STIR 細胞では IMT と同様に NRT、DST にも耐性を示した (B)。

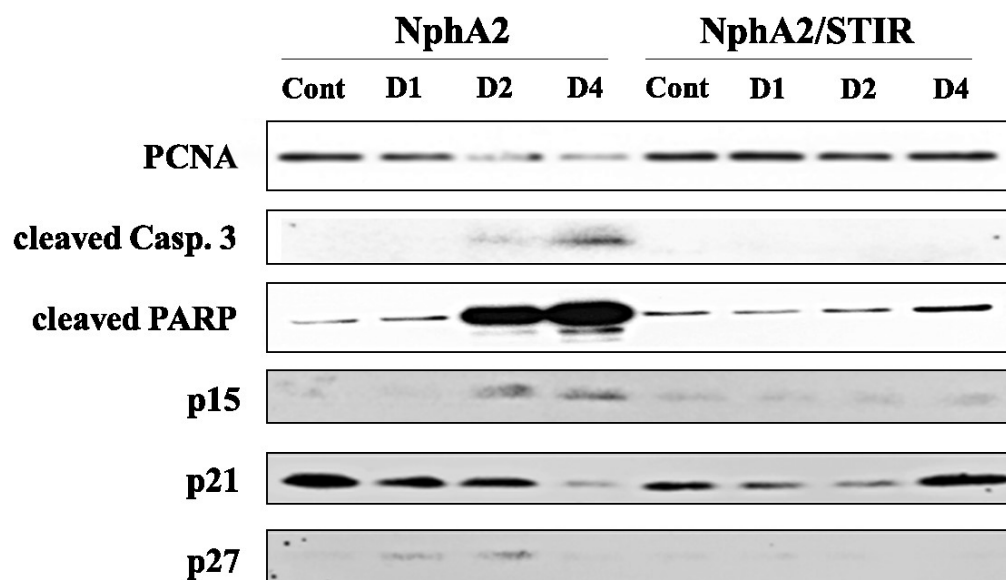


Fig. 3 IMT 添加によるアポトーシスおよび細胞周期関連タンパク質の

発現解析

NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の培養液に 10 μ M の IMT を添加し、1 日後 (D1) 、2 日後 (D2) 、4 日後 (D4) に細胞を回収した。ウェスタンブロットにより PCNA、cleaved Caspase3、cleaved PARP、p15、p21、p27 の発現解析を行った。NphA2 細胞では、D1 から D4 にかけて PCNA の発現が減少し、cleaved Caspase3 と cleaved PARP が増加した。また、p15 および p27 も増加した。一方で、NphA2/STIR 細胞では発現量に顕著な経時的変化は見られなかった。

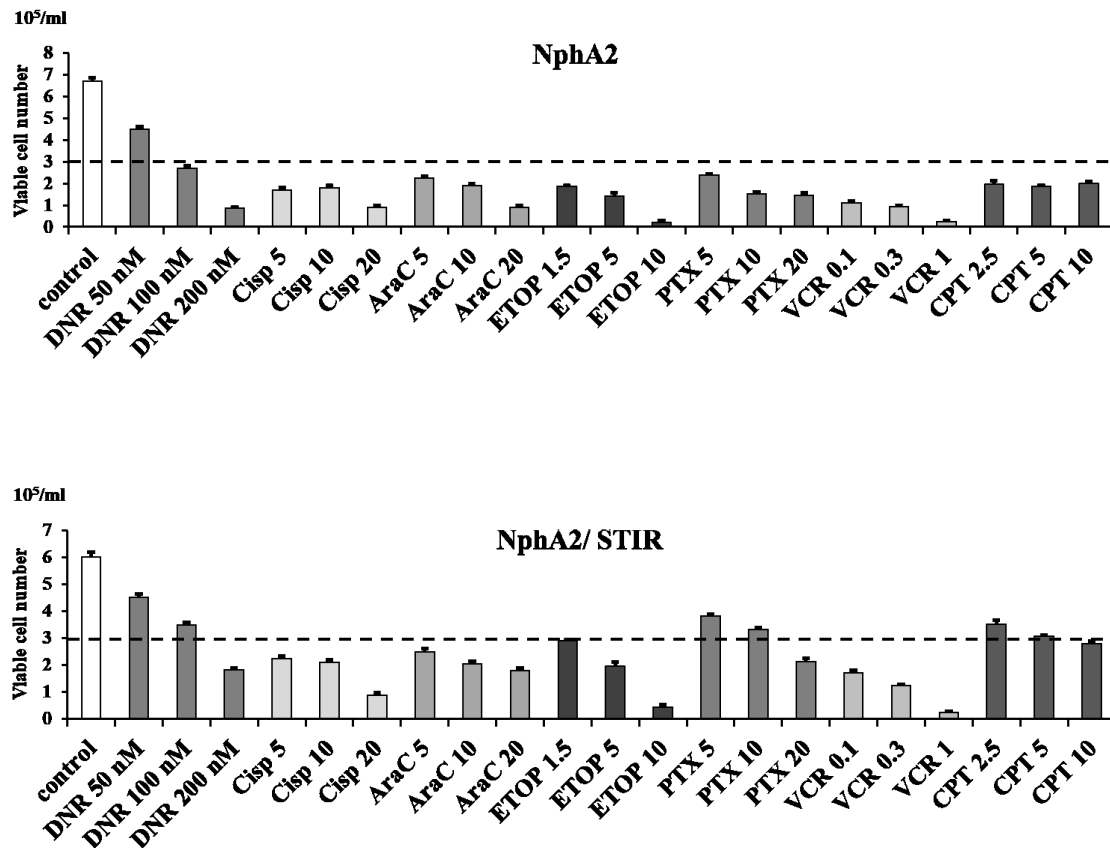


Fig. 4 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における抗がん剤の効果

各種抗がん剤をグラフに示す各濃度（ μM ）で培養液に添加し、NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $3 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した（mean $\pm$ SD）。実験は 3 重測定で実施した。NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞は同じような感受性パターンを示したが、NphA2/STIR 細胞は daunorubicin (DNR)、paclitaxel (PTX)、camptothecin (CPT) で NphA2 細胞よりもわずかに抵抗性が強かった。

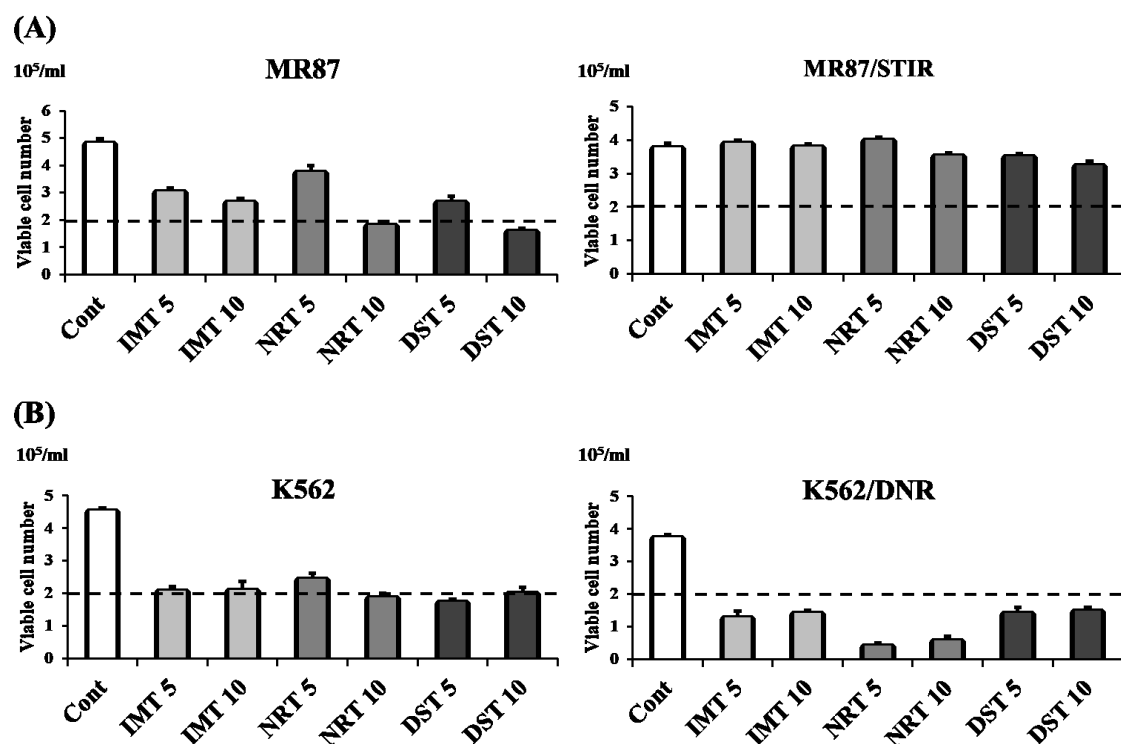


Fig. 5 MR87 細胞系および K562 細胞系における TKIs の効果

IMT、NRT、DST をグラフに示す各濃度 (μM) で培養液に添加し、MR87 細胞、MR87/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。

実験は 3 重測定で実施した。MR87/STIR 細胞はすべての TKIs に耐性を示した (A)。

K562 細胞および K562/DNR 細胞は、すべての TKIs に対して感受性を示した (B)。

第二節 細胞内シグナル経路の解析

細胞内シグナル経路についての検討を行った。まず、NphA2 細胞、NphA2/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞における細胞内シグナル経路タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。ERK は NphA2/STIR 細胞においてより強く活性化することが共同研究者の M. Suzuki らにより示されている^[12]。本実験においても、NphA2 細胞と比べて NphA2/STIR 細胞で phosphorylated ERK (p-ERK) の発現が強かった (Fig. 6)。さらに、phosphorylated JNK (p-JNK) も NphA2/STIR 細胞で発現が強かった。p-AKT は NphA2/STIR 細胞と比べて NphA2 細胞でわずかに強い発現が見られるが、AKT の活性化はこれら細胞の生存に影響を与えないことが分かっている^[12]。NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞への細胞内シグナル経路阻害剤の効果を生細胞数の測定により確認したところ、ERK 阻害剤の U0126 は、NphA2 細胞よりも NphA2/STIR 細胞の増殖を阻害した (Fig. 7)。興味深いことに、JNK 阻害剤の SP600125 は細胞の増殖を阻害するだけでなく、NphA2 細胞、NphA2/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞の生細胞数を初期の播種濃度より減少させた。すなわち、SP600125 の添加によりこれら細胞の細胞死が誘導された (Fig. 7、Fig. 8)。続いて、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞への SP600125 添加によるアポトーシス関連タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。SP600125 (20 μ M) による、JNK のターゲットである

c-Jun のリン酸化の減少は、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞で認められた (Fig. 9)。同じく、SP600125 添加により cleaved PARP と cleaved Caspase3 の発現増加が見られた。これらの結果より、アポトーシスの誘導が示唆された。さらに、より特異性が高い新規 JNK 阻害剤である JNK-IN-8^[18] の効果を生細胞数の測定により確認したところ、NphA2/STIR 細胞に対して SP600125 と同じような細胞毒性があることが分かった (Fig. 10)。

次に、JNK が BCR-ABL の下流に位置しているかについて検討した。NphA2 細胞への IMT 添加により、時間依存的に活性化 JNK である p-JNK の発現が抑えられることをウェスタンブロットにより示した (Fig. 11)。続いて、MR87 細胞、MR87/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞における細胞内シグナル経路タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。MR87 細胞および MR87/STIR 細胞の発現パターンはおおむねよく似ているが、MR87 細胞では p-ERK の発現が高く、MR87/STIR 細胞では低かった (Fig. 12)。さらに、MR87 細胞および MR87/STIR 細胞への細胞内シグナル経路阻害剤の効果を生細胞数の測定により確認したところ、両細胞とも SP600125 に感受性を示した (Fig. 13)。

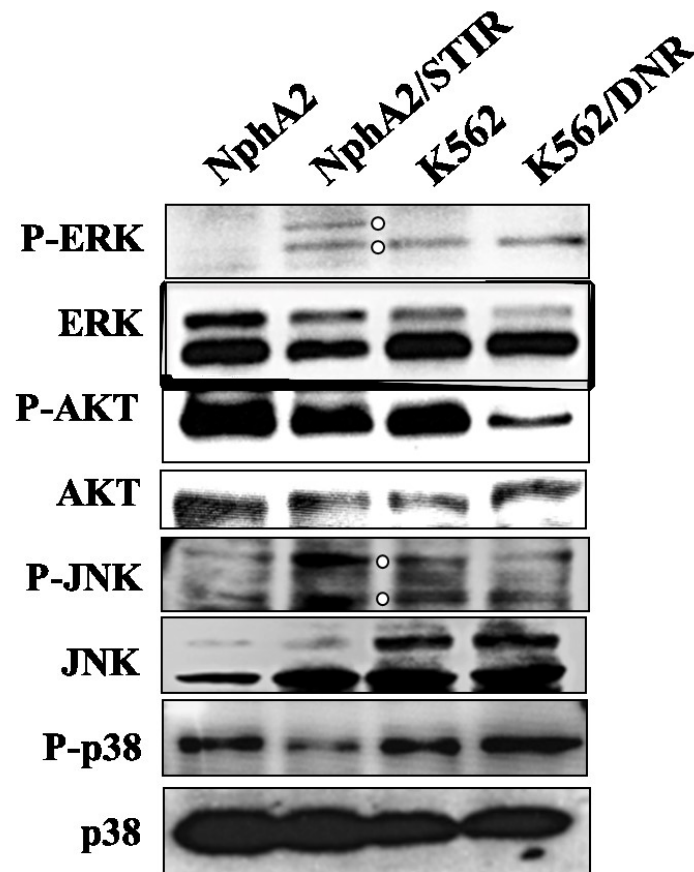


Fig. 6 NphA2 細胞系および K562 細胞系における

細胞内シグナル経路タンパク質の発現解析

NphA2 細胞、NphA2/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞における細胞内シグナル経路タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。NphA2 細胞と比べて、NphA2/STIR 細胞において P-ERK および P-JNK の強い発現が見られた（白点）。

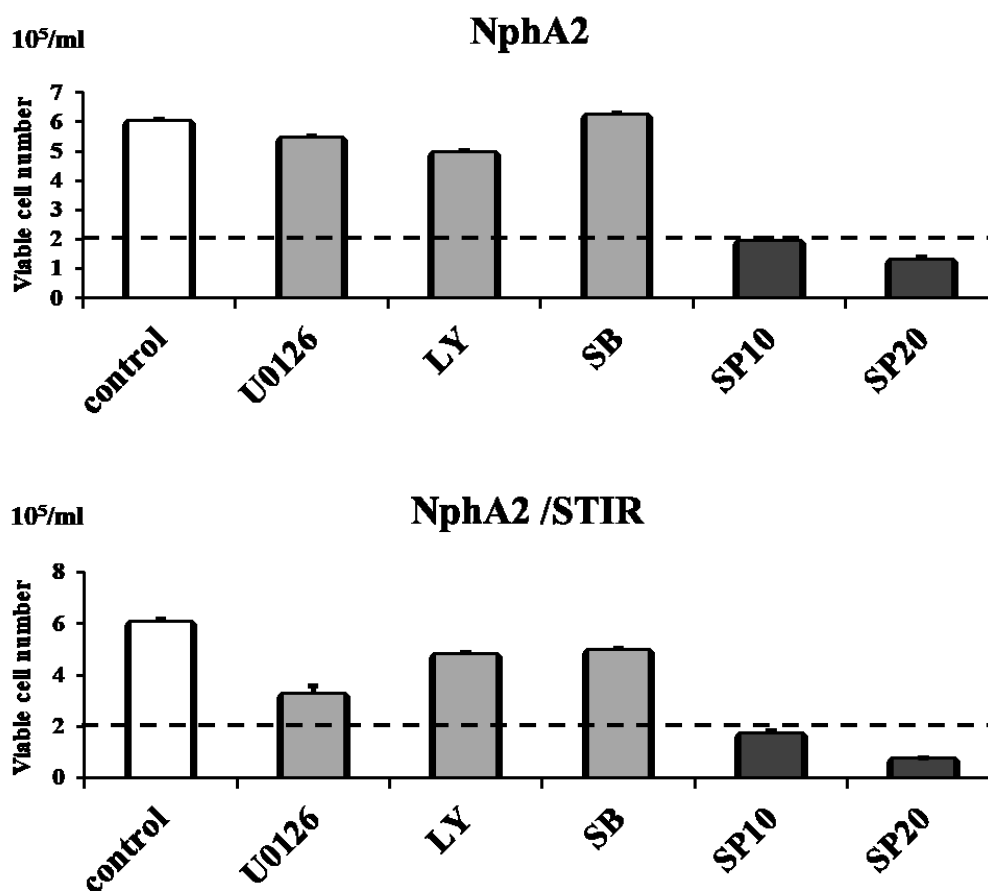


Fig. 7 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における

細胞内シグナル経路阻害剤の効果

NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の培養液に、U0126 (ERK 阻害剤、10 μ M)、LY294002 (AKT 阻害剤、10 μ M)、SB203580 (p38 阻害剤、25 μ M)、SP600125 (JNK 阻害剤、10 μ M または 20 μ M) を添加し、生細胞数を測定した。細胞は 2 $\times$ 10⁵/mL でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した(mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。U0126 は、NphA2 細胞よりも NphA2/STIR 細胞の増殖を抑制した。SP600125 は、単に NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の増殖を抑制するだけでなく、生細胞数を濃度依存的に減少させた。

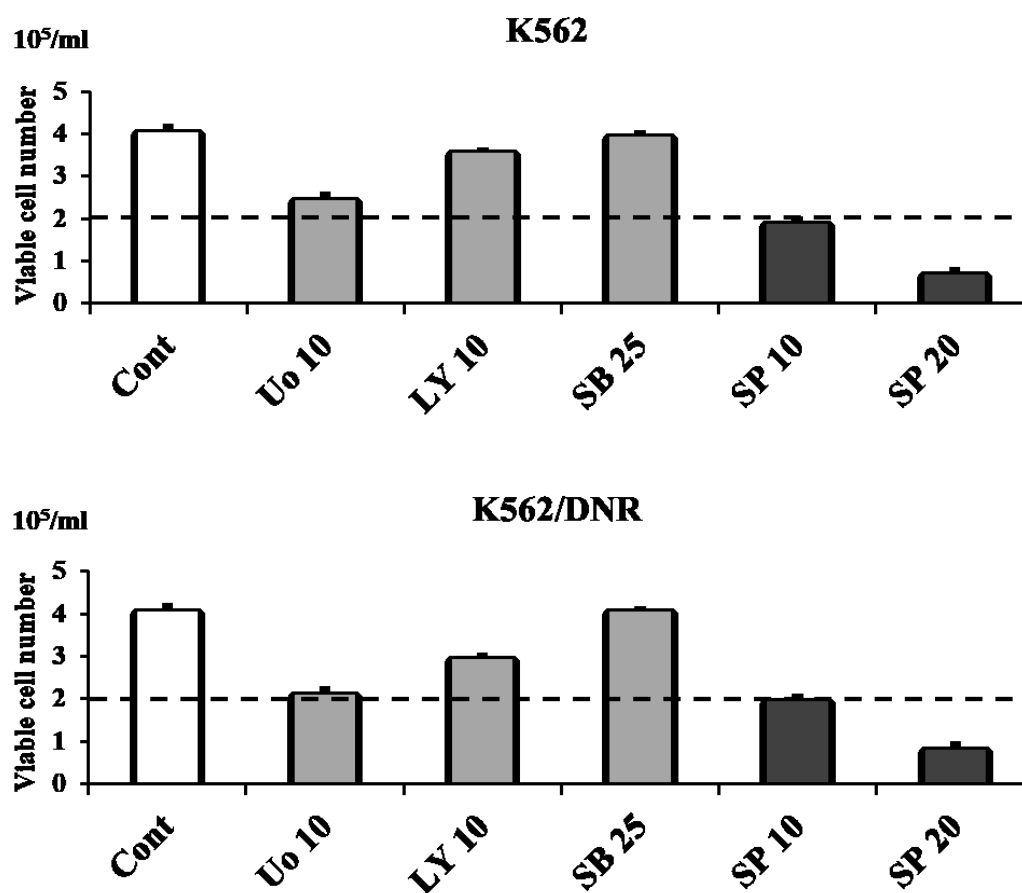


Fig. 8 K562 細胞および K562/DNR 細胞における

細胞内シグナル経路阻害剤の効果

K562 細胞および K562/DNR 細胞の培養液に、U0126 (10 μ M) 、LY294002 (10 μ M) 、SB203580 (25 μ M) 、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) を添加し、生細胞数を測定した。細胞は 2 $\times$ 10⁵/mL でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD) 。SP600125 は K562 細胞および K562/DNR 細胞の増殖を抑制するだけでなく、Fig. 7 と同様に細胞死を誘導した。他の阻害剤である U0126、LY294002、SB203580 は K562 細胞および K562/DNR 細胞において同じような感受性パターンを示した。

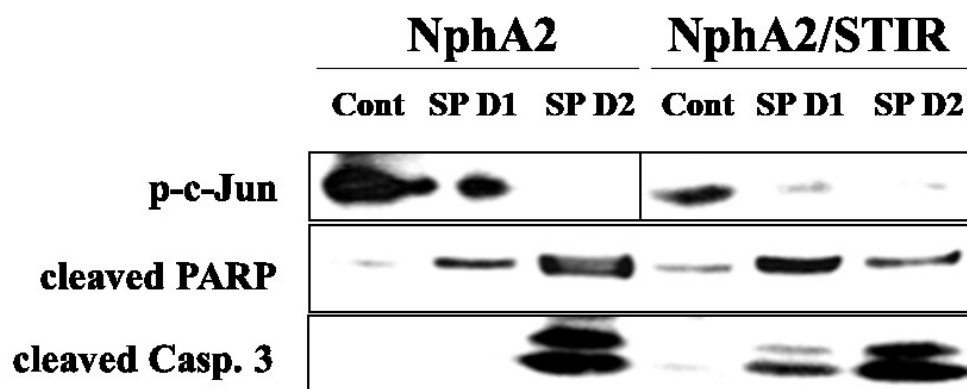


Fig. 9 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における

SP600125 によるアポトーシス関連タンパク質の発現解析

NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の培養液に SP600125 (20 μ M) を添加し、1 日後 (D1)、2 日後 (D2) に細胞を回収した。ウェスタンブロットにより、phosphorylated c-jun (p-c-jun)、cleaved PARP、cleaved Caspase3 の発現解析を行った。SP600125 より、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞において p-c-jun の発現が減少した。そして、cleaved PARP と cleaved Caspase3 の発現が増強した。

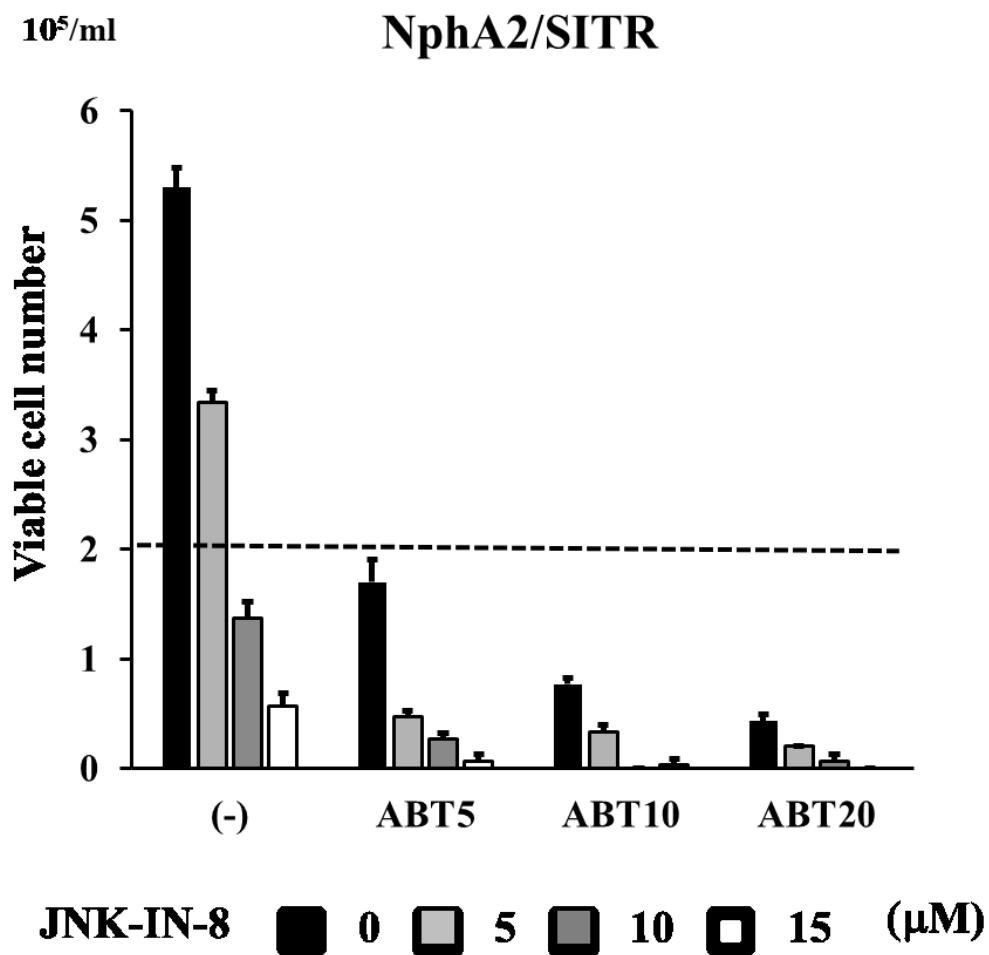


Fig. 10 NphA2/SITR 細胞における JNK-IN-8 および ABT-199 の効果

JNK 阻害剤である JNK-IN-8 (μM) と ABT-199 (nM) を単独あるいは併用の添加で NphA2/SITR 細胞の培養液に添加し、生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。JNK-IN-8 の単独使用に比べ、ABT-199 との併用で細胞数が減少した。さらに、ABT-199 が高濃度であるほどその効果が強かった。

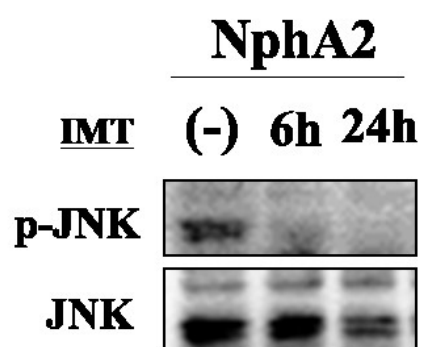


Fig. 11 NphA2 細胞における IMT による phosphorylated JNK の発現解析

NphA2 細胞の培養液に IMT (10 μ M) を添加し、6 時間後 (6h) および 24 時間後 (24h) に細胞を回収した。ウェスタングロットにより、phosphorylated JNK (p-JNK) と total JNK (JNK) の発現解析を行った。NphA2 細胞は、IMT により時間経過により p-JNK の発現が抑えられた。

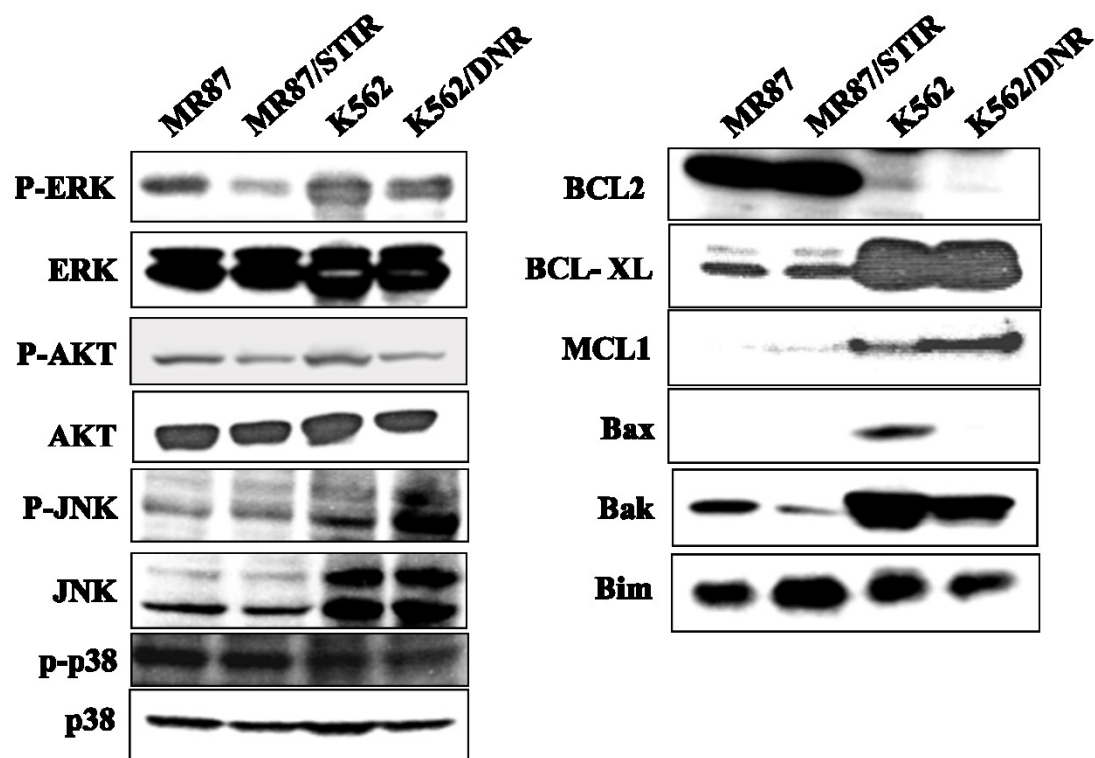


Fig. 12 MR87 細胞系および K562 細胞系における

細胞内シグナル経路タンパク質の発現解析

MR87 細胞、MR87/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞における細胞内シグナル経路タンパク質および BCL2 ファミリータンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。MR87 細胞と比べて MR87/STIR 細胞は、phosphorylated ERK (p-ERK) の発現が弱かった。P-ERK 以外は同じような発現パターンを示した。

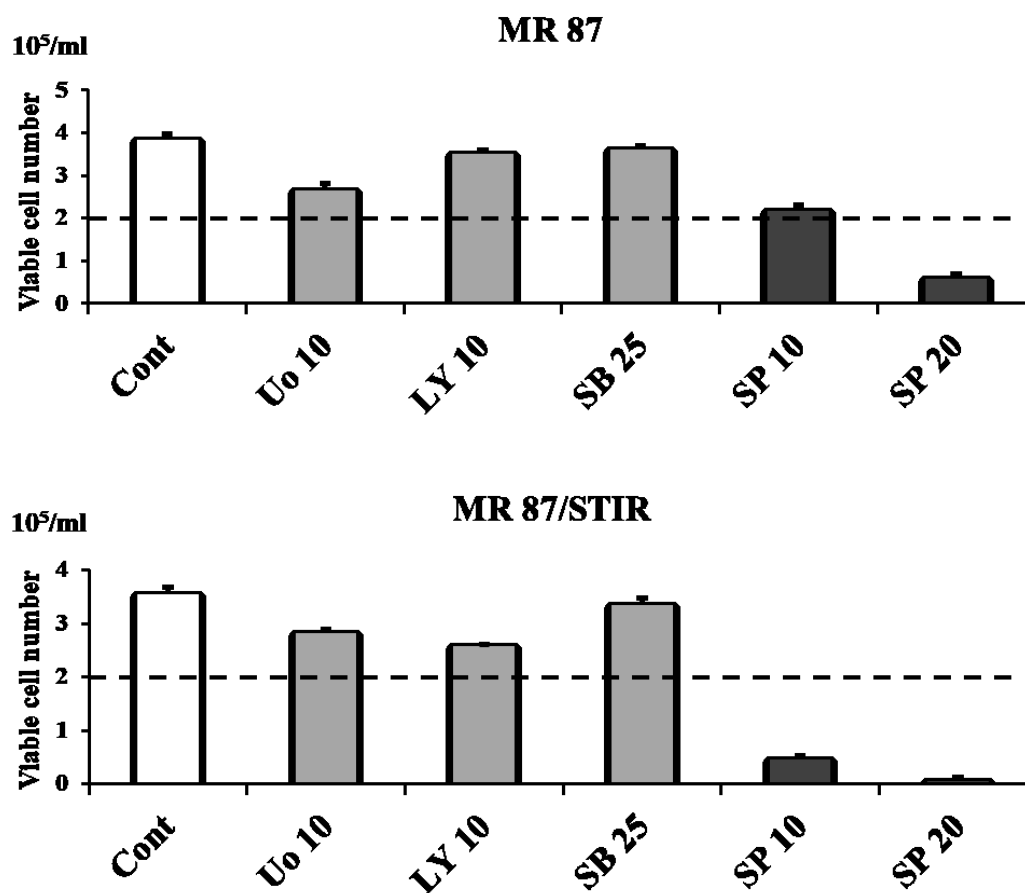


Fig. 13 MR87 細胞および MR87/STIR 細胞における

細胞内シグナル経路阻害剤の効果

MR87 細胞および MR87/STIR 細胞の培養液に、U0126 (10 μ M) 、LY294002 (10 μ M) 、SB203580 (25 μ M) 、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) を添加し、生細胞数を測定した。細胞は 2 $\times$ 10⁵/mL でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD) 。SP600125 は MR87 細胞および MR87/STIR 細胞の増殖を抑制するだけではなく、初期の播種濃度より細胞数を減少させた。

第三節 BCL2 ファミリー阻害剤の効果

BCL2 ファミリータンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。BCL2 の発現は、NphA2 細胞に比べて NphA2/STIR 細胞で強かった (Fig. 14)。K562 細胞と K562/DNR 細胞では BCL2 の発現が見られなかった。興味深いことに、K562 細胞および K562/DNR 細胞は、BCL-XL と MCL-1 の発現が NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞よりもかなり強かった (Fig. 12)。今回の実験条件下では survivin はいずれの細胞においても検出されなかった。MR87 細胞および MR87/STIR 細胞において、アポトーシス関連タンパク質の BCL2、BCL-XL、MCL-1 は、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞と同じような発現パターンを示した (Fig. 12)。

次に、NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞、K562 細胞と K562/DNR 細胞および MR87 細胞と MR87/STIR 細胞への BCL2 阻害剤である ABT-199 (venetoclax) の効果について検討した。ABT-199 は濃度依存的に NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の増殖を阻害した (Fig. 15)。そのうえ、高濃度ほど細胞死の誘導がはやかった。対照的に、K562 細胞と K562/DNR 細胞は ABT-199 には感受性がないが、BCL2 と BCL-XL の両方を阻害する ABT-263 (navitoclax) に軽度な感受性があった (Fig. 16)。K562 細胞および K562/DNR 細胞への ABT-263 の軽度な効果は、MCL-1 を介するような他の細胞生存メカニズムへの関与が示唆された。MCL-1 は ABT-263 と ABT-199 に直接阻害されないことが知られている^[19, 20]。MR87 細胞および MR87/STIR 細胞は、ABT-199 と

ABT-263 の両方に対して高い感受性を示した (Fig. 17) 。さらに、他の白血病細胞株である NALM16 細胞、Jurkat 細胞、U937 細胞においても、ABT-199 および ABT-263 の効果を検討した。NALM16 細胞は ABT-199 に感受性があるが、Jurkat 細胞および U937 細胞は ABT-199 と ABT-263 の両方に耐性があった (Fig. 18) 。さらに、BCL2 阻害剤に耐性を示した Jurkat 細胞および U937 細胞へ MCL-1 阻害剤である marynopyrrole A (maritoclax) を添加したところ、高い感受性を示した (Fig. 19) 。この結果は、Jurkat 細胞と U937 細胞の細胞内シグナル経路が MCL-1 に依存的な細胞生存経路であることを示唆する。他の MCL-1 阻害剤の A1210477 でも検討したところ、K562 細胞、K562/DNR 細胞、Jurkat 細胞、U937 細胞、MEGA2 細胞に対しても、細胞の生存を阻害する効果があることが分かった。

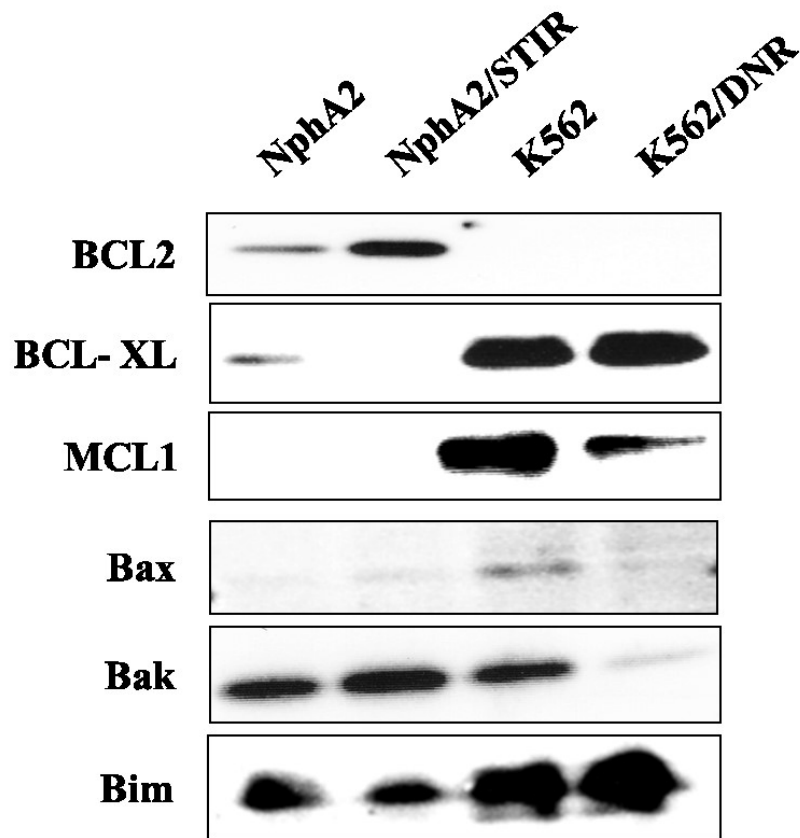


Fig. 14 NphA2 細胞系および K562 細胞系における

BCL2 ファミリータンパク質の発現解析

NphA2 細胞、NphA2/STIR 細胞および K562 細胞、K562/DNR 細胞における BCL2 ファミリータンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。BCL2 の発現は NphA2 細胞に比べて NphA2/STIR 細胞で強く、K562 細胞および K562/DNR 細胞では BCL2 の発現が見られなかった。また、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞と比べて、K562 細胞および K562/DNR 細胞は BCL-XL と MCL-1 の発現が強かった。

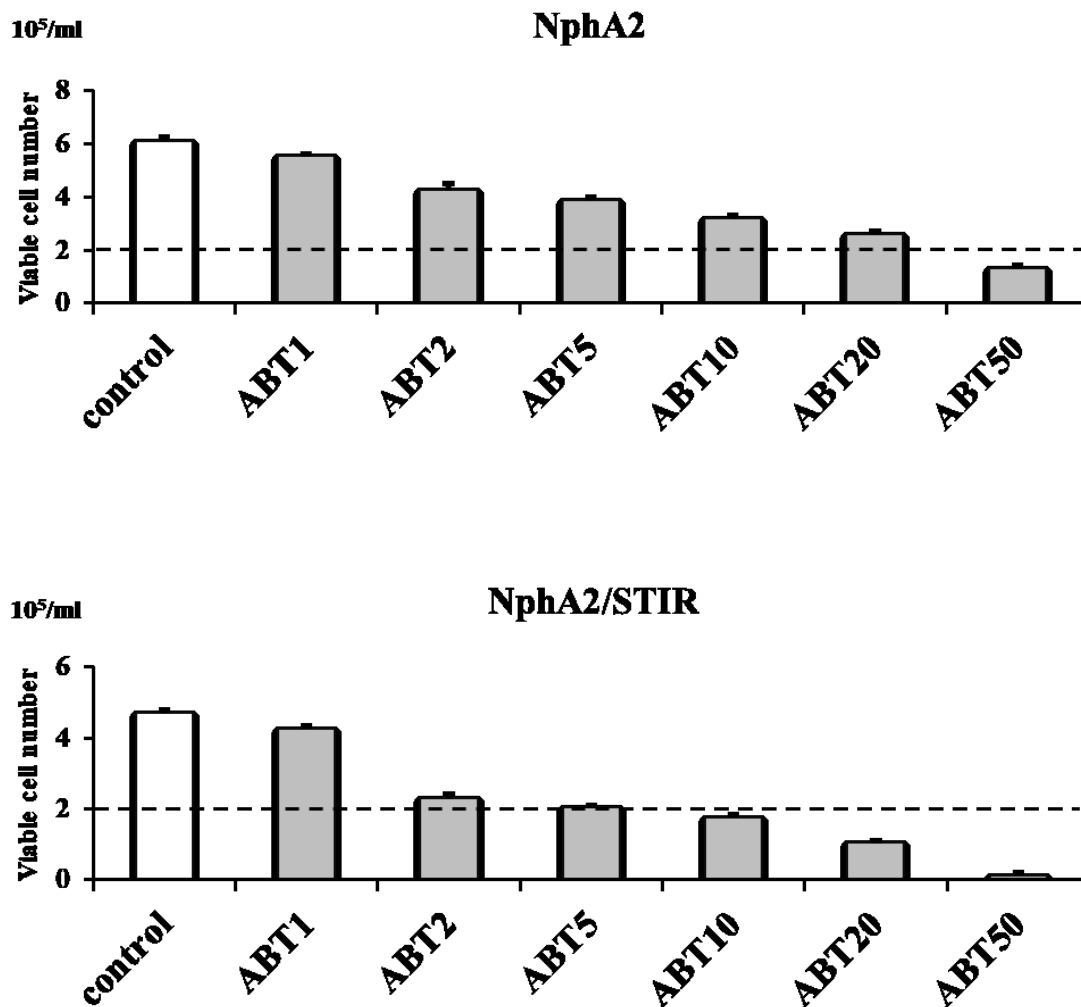


Fig. 15 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における ABT-199 の効果

BCL2 特異的阻害剤である ABT-199 を各濃度（1、2、5、10、20 および 50nM）で培養液に添加し、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した（mean $\pm$ SD）。実験は 3 重測定で実施した。ABT-199 は濃度依存的に NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の増殖を阻害した。

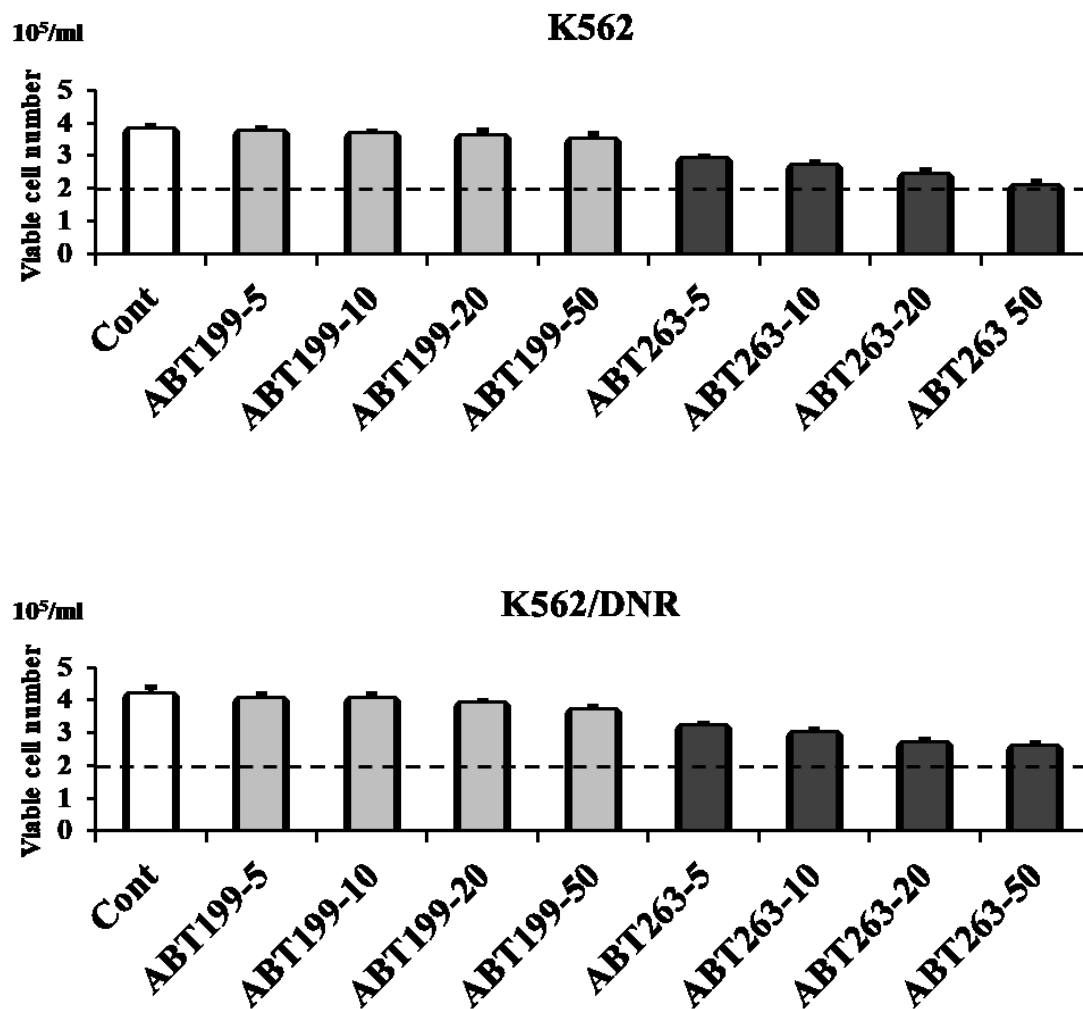


Fig. 16 K562 細胞および K562/DNR 細胞における

ABT-199 と ABT-263 の効果

ABT-199 と汎 BCL2 阻害剤である ABT-263 をグラフに示す濃度 (nM) で培養液に添加し、K562 細胞および K562/DNR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。K562 細胞および K562/DNR 細胞はともに ABT-199 への感受性は示さなかったが、ABT-263 にはわずかに感受性を示した。

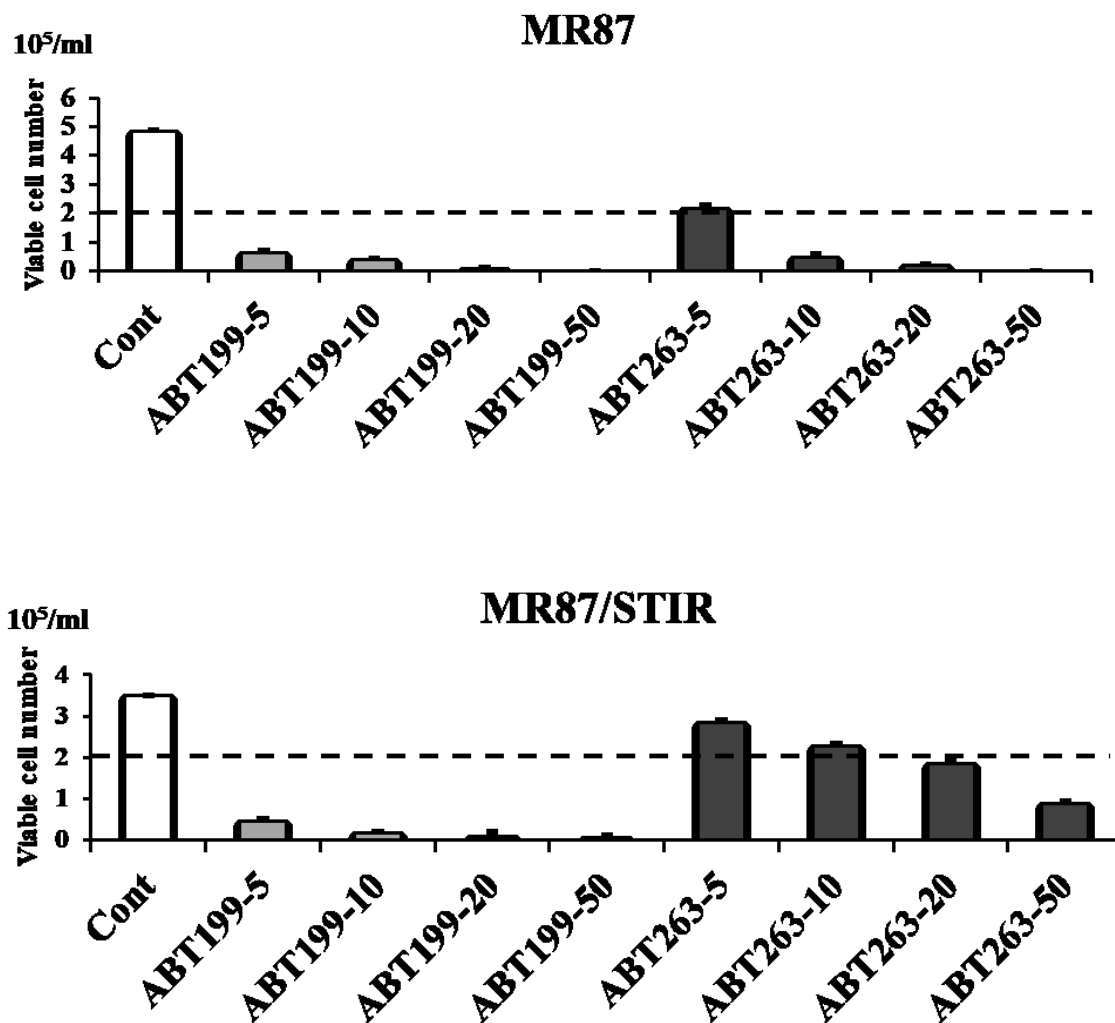


Fig. 17 MR87 細胞および MR87/STIR 細胞における

ABT-199 と ABT-263 の効果

ABT-199 と ABT-263 をグラフに示す濃度 (nM) で培養液に添加し、MR87 細胞および MR87/STIR 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。MR87 細胞および MR87/STIR 細胞はともに、ABT-199 と ABT-263 の両方に高い感受性を示した。

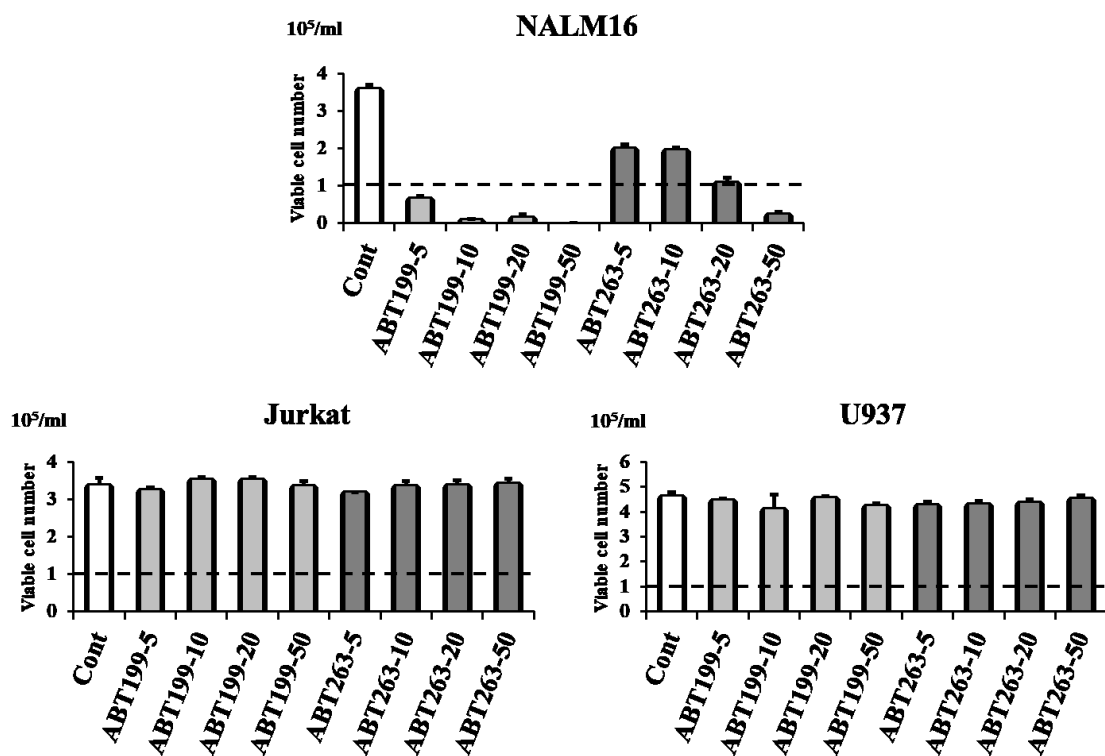


Fig. 18 各種白血病細胞株における ABT-199 および ABT-263 の効果

ABT-199 および ABT-263 をグラフに示す濃度 (nM) で培養液に添加し、NALM16 細胞、Jurkat 細胞および U937 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $1 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。NALM16 細胞は ABT-199 に感受性を示したが、Jurkat 細胞および U937 細胞は ABT-199 と ABT-263 の両方に耐性があった。

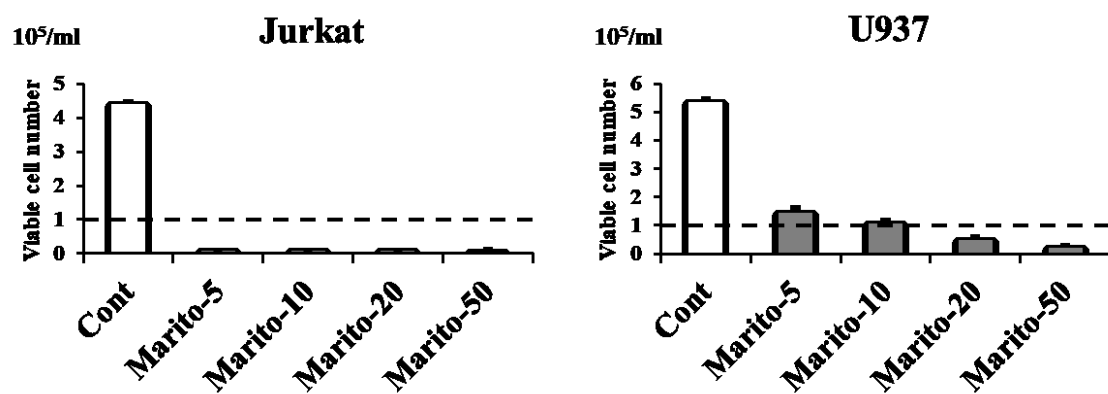


Fig. 19 Jurkat 細胞および U937 細胞における

marinopyrrole A (maritoclax) の効果

MCL-1 の阻害剤である marinopyrrole A (maritoclax) をグラフに示す濃度 (μM) で培養液に添加し、Jurkat 細胞および U937 細胞の生細胞数を測定した。細胞は $1 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean ± SD)。実験は 3 重測定で実施した。Jurkat 細胞および U937 細胞はともに、maritoclax に高い感受性を示した。

第四節 ABT-199、IMT および SP600125 の併用効果

ABT-199、IMT および SP600125 における併用の効果を NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の生細胞数の測定により検討した。NphA2 細胞において、いずれの薬剤も単独使用時に比べて併用で著しく細胞の生存率が低下した (Fig. 20)。

SP600125 (10 μ M) と ABT-199 の組み合わせによる併用は NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の両方で増殖を阻害し、さらに細胞死を誘導する効果があった。ABT-199 (20nM) の単独使用では、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞とともに細胞増殖能が強く抑えられた。同様の結果が NphA2/STIR 細胞への JNK-IN-8 と ABT-199 の併用で得られた (Fig. 10)。

次に、ABT-199 と SP600125 の組み合わせによる併用が相乗的 (synergistic) 効果か、相加的 (additive) 効果かを Isobologram 解析により検討した。ABT-199+SP600125 の Isobologram は、SP600125 (13 μ M) と ABT-199 (8.5nM) の IC₅₀ をつなぐ直線に対して左方へシフトし (Fig. 21)、ABT-199+SP600125 の相乗効果を示した。

IMT+ABT-199 も相乗効果を示すが、IMT+SP600125 では相乗効果を示さなかった。

しかしながら、IMT は NphA2/STIR 細胞で IC₅₀ を算定するには非常に高濃度 (100 μ M) の添加が必要である。これらの結果は、NphA2/STIR 細胞内でさまざまなシグナル経路が関連しあっていることを示唆する。

生細胞数測定の結果を確かめるために、ABT-199、IMT および SP600125 による

アポトーシス関連タンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。

NphA2/STIR 細胞において、各種阻害剤の単独使用または併用により、cleaved PARP と cleaved Caspase3 の発現が増強した (Fig. 22) 。この結果は、アポトーシスの強い誘導を示唆する。

次に、K562 細胞および K562/DNR 細胞への IMT、SP600125、marinopyrrole A (maritoclax) の効果について検討した。K562 細胞および K562/DNR 細胞は、ABT-199 と ABT-263 には高い感受性を示さないが、maritoclax は K562 細胞と K562/DNR 細胞の細胞増殖を阻害し、初期の播種濃度より生細胞数を減少させた (Fig. 23) 。この結果は、Jurkat 細胞と U937 細胞において観察されたのと同様に、これら細胞株が MCL-1 依存状態であることを示唆する。SP600125 と maritoclax の併用は、K562 細胞と K562/DNR 細胞の両方にすぐれた細胞毒性を示した。

最後に、T315I 変異をもつ高い TKI 耐性の Ph+ ALL 細胞である TccY/Sr 細胞への IMT、SP600125、ABT-199 の効果について、生細胞数の測定により確認したところ、SP600125 と ABT-199 の強い殺細胞効果を観察した (Fig. 24) 。

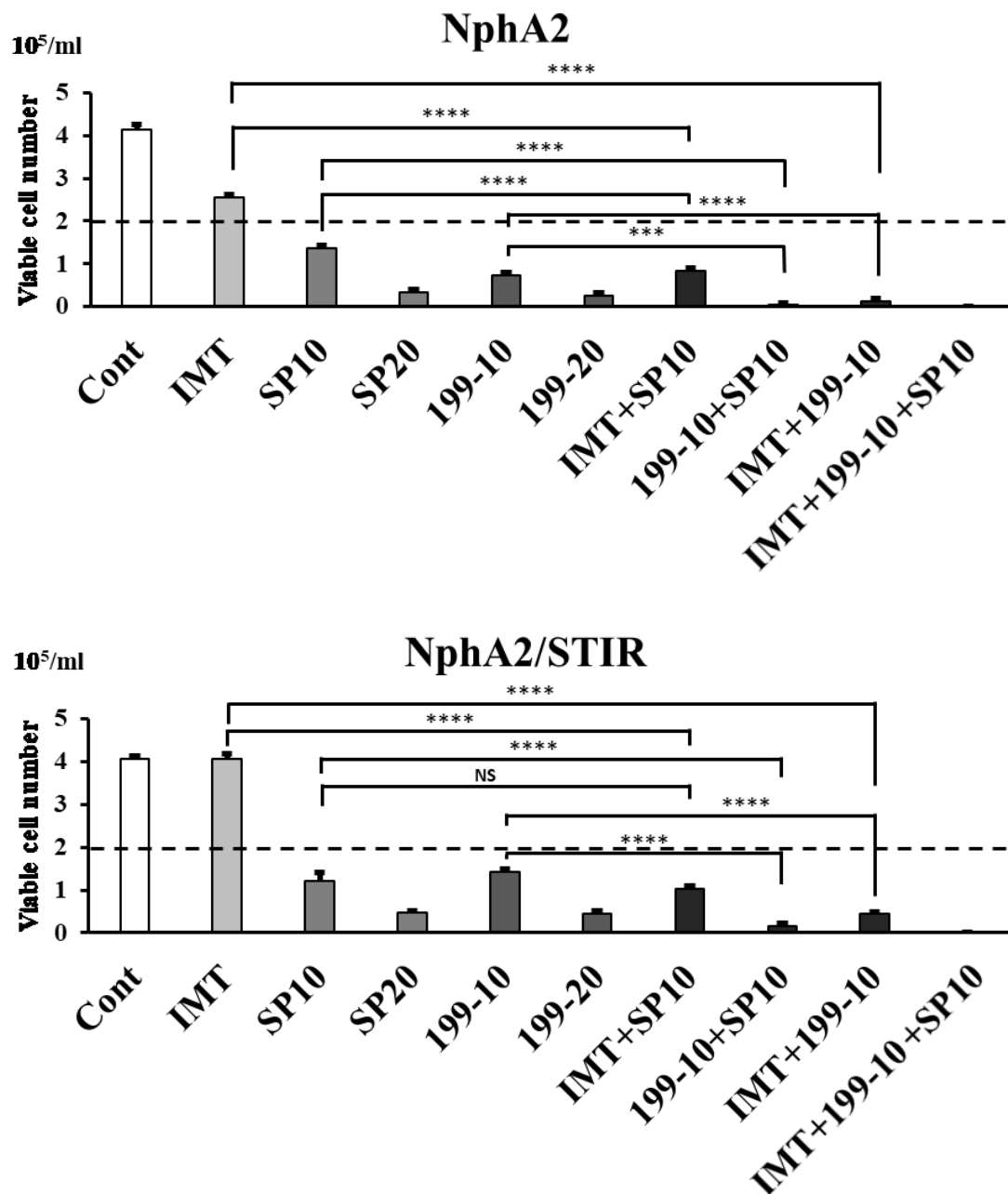


Fig. 20 NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における

IMT、ABT-199、SP600125 の単独使用または併用の効果

NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞への IMT (10 μ M) 、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) および ABT-199 (10nM または 20nM) の単独使用または併用による

生細胞数を測定した。細胞は $2 \times 10^5/\text{mL}$ でプレートにまき、各濃度の薬剤を培地に添加して、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。単独使用時に比べて、各種薬剤の併用の方が細胞増殖の阻害効果が強かった。SP600125 と ABT-199 の併用は、NphA2 細胞と NphA2/STIR 細胞の両方で初期の播種濃度より生細胞数が著しく減少した。統計解析は one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparison で行った (***, $P < 0.01$ 、****, $P < 0.0001$ 、NS: not significant)。

Isobologram (NphA2/STIR)

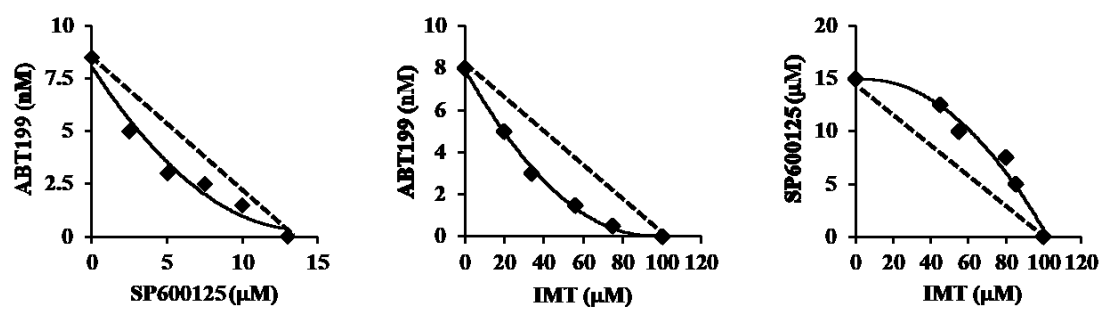


Fig. 21 NphA2/STIR 細胞における Isobologram 解析

NphA2/STIR 細胞への ABT-199、SP600125 および IMT の併用の効果について Isobologram による解析を行った。ABT-199 と SP600125 の組み合わせおよび ABT-199 と IMT の組み合わせでは、それぞれの IC₅₀ を結んだ点線より曲線が左方へシフトすることから、両者が相乗効果を示すことが分かった。

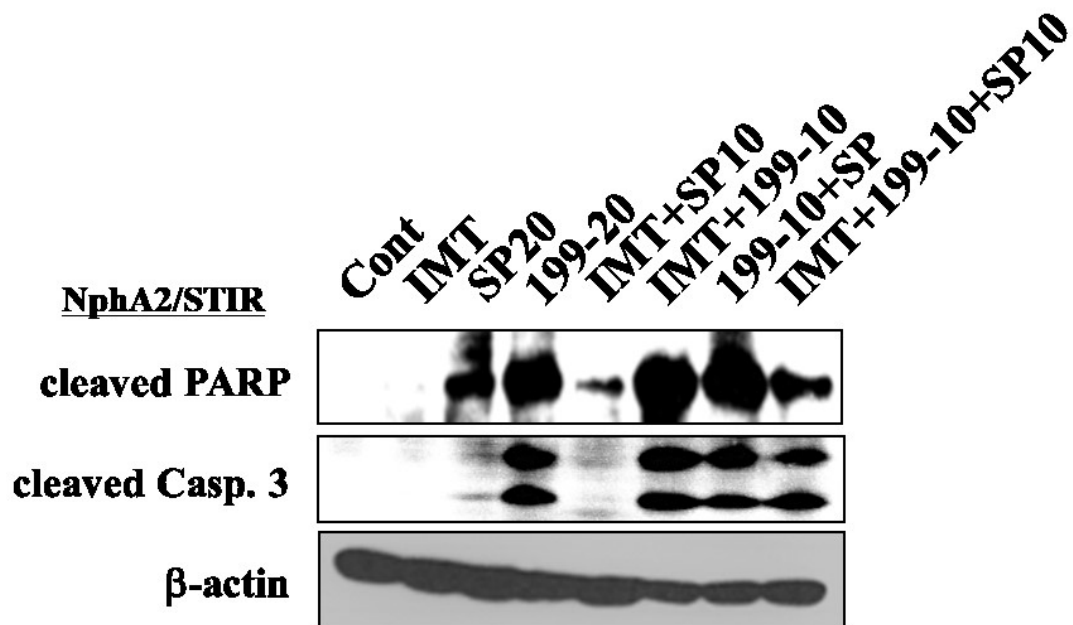


Fig. 22 NphA2/STIR 細胞における IMT、SP600125、ABT-199 による

アポトーシス関連タンパク質の発現解析

IMT (10 μ M) 、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) 、ABT-199 (10nM または 20nM) を NphA2/STIR 細胞の培養液に添加し、24 時間後に細胞を回収した。Cleaved PARP、cleaved Caspase3、 β -actin の発現をウェスタンブロットにより解析した。各種薬剤の併用により、cleaved PARP および cleaved Caspase3 の発現が増強した。

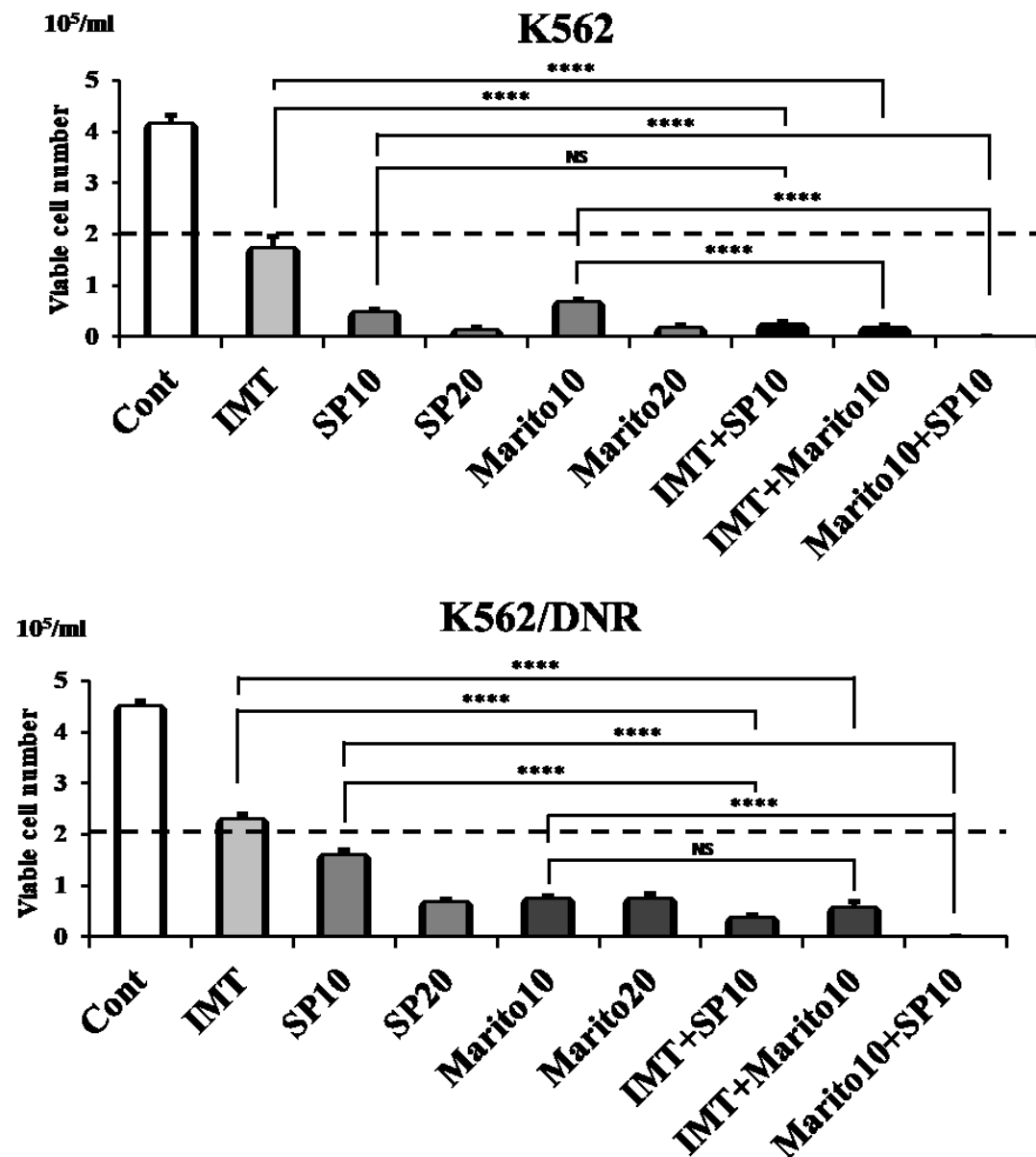


Fig. 23 K562 細胞および K562/DNR 細胞における

IMT、SP600125、marinopyrrole A (maritoclax) の単独使用または併用の効果

K562 細胞および K562/DNR 細胞への IMT (10 μ M)、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) および marinopyrrole A (maritoclax) (10 μ M または 20 μ M) の単独使用または併用による生細胞数を測定した。細胞は 2×10^5 /mL でプレートにまき、各濃度の薬剤を

培地に添加して、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean±SD)。実験は 3 重測定で実施した。K562 細胞および K562/DNR 細胞は maritoclax に対して高い感受性を示した。Maritoclax と SP600125 の併用は、細胞をほぼ完全に消滅させた。統計解析は one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparison で行った (****, $P < 0.0001$ 、NS: not significant)。

TccY/sr (T315I +)

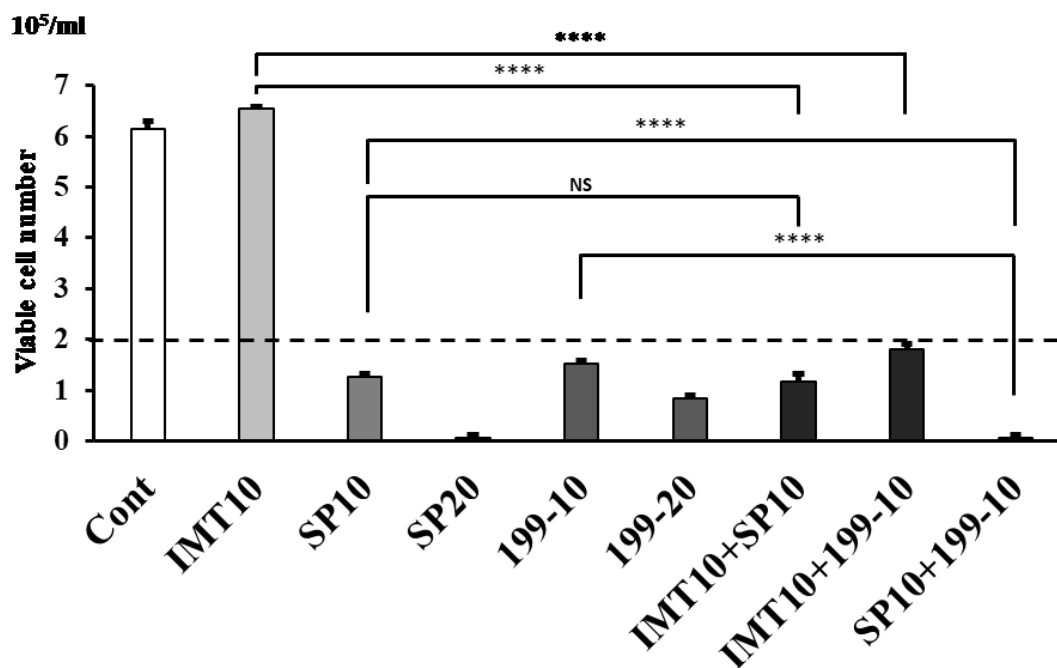


Fig. 24 TccY/sr 細胞における IMT、ABT-199、SP600125 の

単独使用または併用の効果

TccY/sr (T315I (+) Ph+ ALL) 細胞への IMT (10 μ M) 、SP600125 (10 μ M または 20 μ M) および ABT-199 (10nM または 20nM) の単独使用または併用による生細胞数を測定した。細胞は 2 $\times$ 10⁵/mL でプレートにまき、各濃度の薬剤を培地に添加して、2 日間の培養後に生細胞数を計測した (mean $\pm$ SD)。実験は 3 重測定で実施した。SP600125 および ABT-199 の単独使用に感受性があり初期の播種濃度より細胞数を減少させたが、SP600125 と ABT-199 の併用ではさらに強い効果を示した。

第四章 考察

BCR-ABL は、t(9; 22) の染色体相互転座に由来し、ABL キナーゼの恒常的活性化により CML と Ph⁺ ALL を発症させる。BCR-ABL 特異的 TKIs が、広く臨床応用されたことで BCR-ABL 関連疾患の治療法は劇的に変わった。しかしながら、これら TKI への耐性が頻繁に報告され、TKI 耐性をもつ患者の予後は悪いままである。ほとんどの TKI 耐性は BCR-ABL に依存しているが、いくつかの研究では BCR-ABL 非依存性の TKI 耐性が報告されている^[21]。

ERK の阻害剤が NphA2/STIR 細胞の増殖阻害を誘導した結果 (Fig. 7) は、2009 年の M. Suzuki らの報告^[12] と一致している。さらに、同じ論文で NphA2/STIR 細胞における EphB4 と Ras の活性化が示されている。これは、BCR-ABL による MEK-MAPK 経路の活性化の促進が RAS 経路の下流にあることを示唆する。最近、EphB4 は乳がん細胞株の MCF7 において RAS/MEK/ERK 経路を促進するという報告があった^[22]。また、先の M. Suzuki らの報告によると、JAK/STAT などの他の重要なシグナル経路に関して、phosphorylated STAT3 は増加するが phosphorylated STAT5 は減少し、さらに AKT 経路と JAK/STAT 経路の阻害は、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞の細胞生存に著しい変化は生じなかった^[12]。報告された結果は、この 2 つの細胞株ではこれらの経路が主要な役割を担っていないことを示唆する。

今までに、IMT 耐性 Ph⁺ ALL 細胞の JNK 阻害剤である SP600125 の効果について

報告がない。本研究では、Ph+ ALL 細胞および IMT 耐性の Ph+ ALL 細胞における JNK 阻害剤（SP600125）の殺細胞効果について示した。JNK の活性化は、アポトーシスの誘導、あるいは細胞の生存および増殖の促進など、多様な効果を及ぼす^[23]。BCR-ABL は、JNK の活性化と transformation に必要な Jun を活性化することが知られている。そして、BCR-ABL により悪性転化させた細胞での c-jun 遺伝子の発現は、JNK 活性の増加に一致する^[25]。さらに、in vitro において BCR-ABL による B リンパ芽球の transformation に JNK1 が重要であるという報告がある^[26]。実際に、BCR-ABL は JNK 依存的に BCL2 タンパク質の発現増加を引き起こす。最近の研究でも、イマチニブ感受性を抑制する JNK の効果が報告された^[27]。本研究において IMT は、IMT 感受性の NphA2 細胞において時間依存的に JNK 活性を抑えた（Fig. 11）。したがって、NphA2 細胞において JNK は BCR-ABL の下流にあると考えられた。一方で、JNK の阻害は、複数のがん細胞において、細胞周期のブロックとアポトーシスを誘導するという報告がある^[28, 29]。また、SP600125 は複数のがん細胞でアポトーシスを促進すると報告された^[30, 31]。これらの報告に対して、本研究では SP600125 の殺細胞効果の検討に加えて、JNK に高い特異性を持ち SP600125 とは異なるメカニズムを有する JNK-IN-8（JNK 阻害剤）も NphA2/STIR 細胞に対する殺細胞効果を持つことを証明した（Fig. 10）。SP600125 に関しては、このように細胞のモデル系ごとに細胞の増殖や生存に相反する効果が報告されて

いる^[32, 33]。したがって、NphA2 細胞および NphA2/STIR 細胞における SP600125 のターゲットの同定に関して更なる研究が必要である。

BCL2 ファミリーは、アポトーシス経路^[34]の重要な制御因子であり、アポトーシスを抑制するメンバー (anti-apoptotic members) とアポトーシスを促進するメンバー (pro-apoptotic members) からなる^[35]。BCL2 と BCL-XL の両方に親和性が高く、経口による生体利用が可能な navitoclax (ABT-263) は、主にリンパ球系悪性腫瘍にすぐれた抗がん効果を示すことが明らかとなっている^[36]。

しかしながら、この navitoclax は血小板減少症の投与限界毒性(dose-limiting toxicity)があることから、BCL2 選択的阻害剤の ABT-199 (venetoclax) が注目されてきている^[37]。この ABT-199 の臨床応用はリンパ系腫瘍で報告された^[38-40]。また ABT-199 は CML progenitors において IMT による細胞死の誘導を促進する^[41]。

米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は最近、慢性リンパ性白血病のいくつかのサブタイプに ABT-199 を承認した。しかしながら、Ph+ ALL における ABT-199 の効果はまだ十分には研究されておらず、さらに IMT 耐性細胞への効果は報告がない^[42]。2014 年に T. K. Ko らは、ABT-199 は 20nM の IC50 で正常な骨髄系前駆細胞の数を著しく減少したことを示した^[41]。したがって、白血病細胞への殺細胞効果の解析のためには、この 20nM より低い濃度の現実的な範囲の ABT-199 による検討が重要である。本研究で最も興味深い点は、IMT の感受性に

関わらず、Ph+ ALL 細胞が 20nM の ABT-199 に著しく高感受性を示したことにある。

対照的に、CML 由来の K562 細胞は、ABT-199 に耐性で ABT-263 に軽度の感受性を示した (Fig.16)。Marinopyrrole A (maritoclax) を含む MCL-1 阻害剤は、MCL-1 以外の BCL2 ファミリーもターゲットとなりうるが^[43]、maritoclax は K562 細胞および K562/DNR 細胞と同じように Jurkat 細胞と U937 細胞でも阻害効果を示した (Fig. 17、Fig. 19)。さらに、他の MCL-1 特異的阻害剤 (A1210477) の検討においても、CML 由来の細胞株 (K562 細胞、K562/DNR 細胞、MEGA2 細胞) を含む複数の白血病細胞株においてその MCL-1 依存性が確認された。いくつかの研究において、非ホジキンリンパ細胞は BCL2 依存的に生存するとの報告があるが、他方では MCL-1 または BCL-XL に依存的であるとの報告もある^[44]。それゆえに、個々の症例での BCL2 ファミリータンパク質の発現特性ならびに生存への依存性を明らかにすることは、BCL2 ファミリー阻害剤の治療的有用性を後押しし、臨床での悪性腫瘍と白血病細胞の新規治療法につながることを期待される。また、アポトーシス促進メンバーである BH3 (BCL2 Homology domain 3) の分析が、臨床利用のための薬剤選択に有用な方法の 1 つであるとの考えもある^[45]。

結論として、BCL2 阻害剤 (ABT-199) と JNK 阻害剤 (SP600125) の併用により、T315I BCR-ABL 変異細胞 (TccY/sr 細胞) を含む Ph+ ALL 細胞で、それらの TKI 耐性にも関わらず、相乗的に細胞の生存を阻害してアポトーシスが誘導される。

本研究による新たな知見は、白血病の将来的な治療の発展に貢献することができると考える。

参考文献

- [1] E. J. Jabbour, S. Fadel, H. M. Kantarjian. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin. Proc.* **80** (2005) 1517-1527.
- [2] J.I. Sive, G. Buck, A. Fielding, H.M. Lazarus, M.R. Litzow, S. Luger, D.I. Marks, A. McMillan, A.V. Moorman, S.M. Richards, J.M. Rowe, M.S. Tallman, A.H. Goldstone. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from the international MRC UKALL XII/ECOG2993 trial. *Br. J. Haematol.* **157** (2012) 463–471.
- [3] O.G. Ottmann, H. Pfeifer. First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Curr. Opin. Oncol.* **21** (Suppl. 1) (2009) S43–S46.
- [4] M. Malagola, C. Papayannidis, M. Baccarani. Tyrosine kinase inhibitors in Ph+ acute lymphoblastic leukaemia: facts and perspectives. *Ann. Hematol.* **95** (2016) 681–693.
- [5] L. Annino, A. Ferrari, M. Cedrone, F. Giona, F. Lo Coco, G. Meloni, W. Arcese, F. Mandelli. Adult Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: experience of treatments during a ten-year period. *Leukemia* **8** (1994) 664–667.
- [6] A. K. Fielding. Current treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Book* **2011** (2011) 231-7.
- [7] B.J. Druker, C.L. Sawyers, H. Kantarjian, D.J. Resta, S.F. Reese, J.M. Ford, R.

Capdeville, M. Talpaz. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.* **344** (2001) 1038–1042.

[8] A.K. Fielding. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in adults: a broader range of options, improved outcomes, and more therapeutic dilemmas. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* (2015) e352–e359.

[9] M. Vignetti, P. Fazi, G. Cimino, G. Martinelli, F. Di Raimondo, F. Ferrara, G. Meloni, A. Ambrosetti, G. Quarta, L. Pagano, G. Rege-Cambrin, L. Elia, R. Bertieri, L. Annino, R. Foa, M. Baccarani, F. Mandelli. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. *Blood* **109** (2007) 3676–3678.

[10] M.S. Zabriskie, C.A. Eide, S.K. Tantravahi, N.A. Vellore, J. Estrada, F.E. Nicolini, H.J. Khoury, R.A. Larson, M. Konopleva, J.E. Cortes, H. Kantarjian, E.J. Jabbour, S.M. Kornblau, J.H. Lipton, D. Rea, L. Stenke, G. Barbany, T. Lange, J.C. Hernandez- Boluda, G.J. Ossenkoppele, R.D. Press, C. Chuah, S.L. Goldberg, M. Wetzler, F.X. Mahon, G. Etienne, M. Baccarani, S. Soverini, G. Rosti, P. Rousselot, R. Friedman, M. Deininger,

K.R. Reynolds, W.L. Heaton, A.M. Eiring, A.D. Pomicter, J.S. Khorashad, T.W. Kelley, R. Baron, B.J. Druker, M.W. Deininger, T. O'Hare. BCRABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell* **26** (2014) 428–442.

[11] L. Saini, J. Brandwein. New treatment strategies for Philadelphia chromosomepositive acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **12** (2017) 136–142.

[12] M. Suzuki, A. Abe, S. Imagama, Y. Nomura, R. Tanizaki, Y. Minami, F. Hayakawa, Y. Ito, A. Katsumi, K. Yamamoto, N. Emi, H. Kiyoi, T. Naoe. BCR-ABL-independent, R.A.S. MAPK, pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur. J. Haematol.* **84** (2010) 229–238.

[13] J. Okamura, S. Yamada, E. Ishii, T. Hara, H. Takahira, J. Nishimura, K. Yumura, K. Kawa-Ha, K. Takase, Y. Enomoto, H. Tasaka. A novel leukemia cell line, MR-87, with positive Philadelphia chromosome and negative breakpoint cluster region rearrangement coexpressing myeloid and early B-cell markers. *Blood* **72** (1988) 1261–1268.

[14] Y. Nishida, N. Mizutani, M. Inoue, Y. Omori, K. Tamiya-Koizumi, A. Takagi, T. Kojima, M. Suzuki, Y. Nozawa, Y. Minami, K. Ohnishi, T. Naoe, T. Murate.

Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* **1839** (2014) 265–274.

[15] Y. Shiotsu, H. Kiyoi, Y. Ishikawa, R. Tanizaki, M. Shimizu, H. Umehara, K. Ishii, Y. Mori, K. Ozeki, Y. Minami, A. Abe, H. Maeda, T. Akiyama, Y. Kanda, Y. Sato, S. Akinaga, T. Naoe. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood* **114** (2009) 1607–1617.

[16] S. Sobue, S. Nemoto, M. Murakami, H. Ito, A. Kimura, S. Gao, A. Furuhata, A. Takagi, T. Kojima, M. Nakamura, Y. Ito, M. Suzuki, Y. Banno, Y. Nozawa, T. Murate. Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. *Int. J. Hematol.* **87** (2008) 266–275.

[17] A. Abe, N. Emi, H. Kato, K. Adachi, T. Murate, S. Saga, M. Ogura, T. Kojima, M. Tanimoto, N. Morishita, et al. Establishment and characterization of an immature human megakaryoblastic cell line, MEG-A2. *Leukemia* **9** (1995) 341–349.

[18] T. Zhang, F. Inesta-Vaquera, M. Niepel, J. Zhang, S.B. Ficarro, T. Machleidt, T. Xie, J.A. Marto, N. Kim, T. Sim, J.D. Laughlin, H. Park, P.V. LoGrasso, M. Patricelli, T.K. Nomanbhoy, P.K. Sorger, D.R. Alessi, N.S. Gray. Discovery of potent and selective

covalent inhibitors of JNK. *Chem. Biol.* **19** (2012) 140–154.

[19] C. Tse, A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S. K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S. H. Rosenberg, S. W. Elmore. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **68** (2008) 3421-3428.

[20] A. R. D. Delbridge, S. Grabow, A. Strasser, D. L. Vaux. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **16** (2016) 99-109.

[21] C.V. Ichim. Kinase-independent mechanisms of resistance of leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Stem Cells Transl. Med.* **3** (2014) 405–415.

[22] Z. Xiao, R. Carrasco, K. Kinneer, D. Sabol, B. Jallal, S. Coats, D.A. Tice. EphB4 promotes or suppresses Ras/MEK/ERK pathway in a context-dependent manner: implications for EphB4 as a cancer target. *Cancer Biol. Ther.* **13** (2012) 630–637.

[23] A.M. Bode, Z. Dong. The functional contrariety of JNK. *Mol. Carcinog.* **46** (2007) 591–598.

[24] A.B. Raitano, J.R. Halpern, T.M. Hambuch, C.L. Sawyers. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 11746–11750.

- [25] G.S. Burgess, E.A. Williamson, L.D. Cripe, S. Litz-Jackson, J.A. Bhatt, K. Stanley, M.J. Stewart, A.S. Kraft, H. Nakshatri, H.S. Boswell. Regulation of the c-jun gene in p210 BCR-ABL transformed cells corresponds with activity of JNK, the c-jun Nterminal kinase. *Blood* **92** (1998) 2450–2460.
- [26] P. Hess, G. Pihan, C.L. Sawyers, R.A. Flavell, R.J. Davis. Survival signaling mediated by c-Jun NH (2)-terminal kinase in transformed B lymphoblasts. *Nat. Genet.* **32** (2002) 201–205.
- [27] C.C. Niu, C. Zhao, X.L. Zhang, J. Pan, C. Zhao, W.R. Wu, Z.Q. Li, T. Liu, Z. Yang, W.K. Si. Wnt5a enhances the response of CML cells to Imatinib Mesylate through JNK activation and gamma-catenin inhibition. *Leuk. Res.* **37** (2013) 1532–1537.
- [28] C. Kuntzen, N. Sonuc, E.N. De Toni, C. Opelz, S.R. Mucha, A.L. Gerbes, S.T. Eichhorst. Inhibition of c-Jun-N-terminal-kinase sensitizes tumor cells to CD95- induced apoptosis and induces G2/M cell cycle arrest. *Cancer Res.* **65** (2005) 6780–6788.
- [29] O. Potapova, M. Gorospe, F. Bost, N.M. Dean, W.A. Gaarde, D. Mercola, N.J. Holbrook. c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 24767–24775.
- [30] S.H. Kook, Y.O. Son, Y.S. Jang, K.Y. Lee, S.A. Lee, B.S. Kim, H.J. Lee, J.C. Lee. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase sensitizes tumor cells to flavonoid-induced

apoptosis through down-regulation of JunD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **227** (2008) 468–476.

[31] Y. Liu, J. Feng, M. Zhao, J. Wu, J. Fan, Q. Wen, J. Xu, J. Zhang, S. Fu, B. Wang, Y. Lu, K. Xiong, L. Xiang, Y. Zhang, L. Yang. JNK pathway inhibition enhances chemotherapeutic sensitivity to Adriamycin in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol. Lett.* **14** (2017) 1790–1794.

[32] B.L. Bennett, D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning, D.W. Anderson. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) 13681–13686.

[33] P. Champelovier, M. El Atifi-Borel, J.P. Issartel, J. Boutonnat, F. Berger, D. Seigneurin. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase by SP600125: a cDNA microarray analysis. *Cancer Genom. Proteom.* **7** (2010) 87–92.

[34] P.E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J.M. Adams. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 49–63.

[35] F. Llambi, T. Moldoveanu, S.W. Tait, L. Bouchier-Hayes, J. Temirov, L.L. McCormick, C.P. Dillon, D.R. Green. A unified model of mammalian BCL-2 protein

family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* **44** (2011) 517–531.

[36] C. Tse, A.R. Shoemaker, J. Adickes, M.G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E.F. Johnson, K.C. Marsh, M.J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S.K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S.H. Rosenberg, S.W. Elmore. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **68** (2008) 3421–3428.

[37] A.J. Souers, J.D. Levenson, E.R. Boghaert, S.L. Ackler, N.D. Catron, J. Chen, B.D. Dayton, H. Ding, S.H. Enschede, W.J. Fairbrother, D.C. Huang, S.G. Hymowitz, S. Jin, S.L. Khaw, P.J. Kovar, L.T. Lam, J. Lee, H.L. Maecker, K.C. Marsh, K.D. Mason, M.J. Mitten, P.M. Nimmer, A. Oleksijew, C.H. Park, C.M. Park, D.C. Phillips, A.W. Roberts, D. Sampath, J.F. Seymour, M.L. Smith, G.M. Sullivan, S.K. Tahir, C. Tse, M.D. Wendt, Y. Xiao, J.C. Xue, H. Zhang, R.A. Humerickhouse, S.H. Rosenberg, S.W. Elmore. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19** (2013) 202–208.

[38] J.M. Benito, L. Godfrey, K. Kojima, L. Hogdal, M. Wunderlich, H. Geng, I. Marzo, K.G. Harutyunyan, L. Golfman, P. North, J. Kerry, E. Ballabio, T.N. Chonghaile, O. Gonzalo, Y. Qiu, I. Jeremias, L. Debose, E. O'Brien, H. Ma, P. Zhou, R. Jacamo, E. Park, K.R. Coombes, N. Zhang, D.A. Thomas, S. O'Brien, H.M. Kantarjian, J.D. Levenson, S.M. Kornblau, M. Andreeff, M. Muschen, P.A. Zweidler-McKay, J.C. Mulloy, A. Letai, T.A.

Milne, M. Konopleva. MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias activate BCL-2 through H3K79 methylation and are sensitive to the BCL-2-specific antagonist ABT-199. *Cell Rep.* **13** (2015) 2715–2727.

[39] S. Cang, C. Iragavarapu, J. Savooji, Y. Song, D. Liu. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.* **8** (2015) 129.

[40] V.M. Patel, K. Balakrishnan, M. Douglas, T. Tibbitts, E.Y. Xu, J.L. Kutok, M. Ayers, A. Sarkar, R. Guerrieri, W.G. Wierda, S. O'Brien, N. Jain, H.M. Stern, V. Gandhi. Duvelisib treatment is associated with altered expression of apoptotic regulators that helps in sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to venetoclax (ABT-199). *Leukemia* (2017).

[41] T.K. Ko, C.T. Chuah, J.W. Huang, K.P. Ng, S.T. Ong. The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia progenitor. *Oncotarget* **5** (2014) 9033–9038.

[42] J.T. Leonard, J.S. Rowley, C.A. Eide, E. Traer, B. Hayes-Lattin, M. Loriaux, S.E. Spurgeon, B.J. Druker, J.W. Tyner, B.H. Chang. Targeting BCL-2 and ABL/LYN in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* **8** (2016) 354ra114.

[43] M. Vogler, H.S. Walter, M.J.S. Dyer. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins

in haematological malignancies – from pathogenesis to treatment. *Br. J. Haematol.* **178**

(2017) 364–379.

[44] M. Klanova, L. Andera, J. Brazina, J. Svadlenka, S. Benesova, J. Soukup, D. Prukova, D. Vejmelkova, R. Jaksá, K. Helman, P. Vockova, L. Lateckova, J. Molinsky, B.C. Maswabi, M. Alam, R. Kodet, R. Pytlik, M. Trneny, P. Klener. Targeting of BCL2 family proteins with ABT-199 and homoharringtonine reveals BCL2- and MCL1-dependent subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **22** (2016) 1138–1149.

[45] M.S. Davids. Targeting BCL-2 in B-cell lymphomas. *Blood* **130** (2017) 1081–1088.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導並びにご助言をいただきました、中部大学
生命健康科学部 生命医科学科 村手隆教授、西沢祐治教授に心より感謝申し上げます。

さらに、研究を進めるうえで懇切なるご指導並びにご助言をいただきました、
中部大学 生命健康科学部 市原正智教授、祖父江沙矢加講師に深く感謝申し上げます。

平成 31 年 3 月 23 日

中部大学大学院

生命健康科学研究科 生命医科学専攻

井上 千聖