

主 論 文

Pharmacological inhibition of JAK3 enhances the antitumor activity of imatinib in human chronic myeloid leukemia

(JAK3 阻害は慢性骨髄性白血病において Imatinib の効果を増強する)

【緒言】

慢性骨髄性白血病 (CML) は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座によって生じる *BCR-ABL* 融合遺伝子が原因とされている。Imatinib は、ABL を標的とするチロシンキナーゼ阻害薬であり、CML の治療成績を劇的に向上させた。Imatinib 治療を受けたほとんどの CML 患者は、長期的に細胞遺伝学的完全寛解を達成し、さらに一部の患者では分子遺伝学的完全寛解 (CMR) の達成が可能となる。しかしながら、Imatinib の中止によって寛解を達成した患者の約 6 割が CML を再発することが問題となっている。再発は体内での白血病幹細胞が根絶できていないことが原因とされており、この白血病幹細胞においてはチロシンキナーゼ阻害剤の感受性が低下することが報告されている。そのため、白血病幹細胞を根絶できる有効な治療法の探索が急務と考える。

一方、JAK/STAT 経路は細胞の成長と分化に関与しており、BCR-ABL と深く関係することが報告されている。これまで CML に対する JAK2/3 阻害剤 Ruxolitinib と BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害剤の併用効果が報告されていることから、JAK/STAT 経路は CML 治療の新たな標的として注目されている。しかしながら、JAK ファミリーの中でも血球系細胞に特異的に発現している JAK3 の関与については明らかとなっていない。JAK3 は血液細胞に特異的に発現していることから、他の細胞への影響が少なく CML 治療に用いることが出来ると考えられる。実際に、JAK3 阻害剤である Tofacitinib は既に抗リウマチ薬として使用されており、安全性は臨床的に認容可能と考えられる。そこで、本研究では CML に対する JAK3 阻害薬である Tofacitinib および Imatinib と併用効果について検討を行った。

【材料と方法】

細胞

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 および KCL-22、ヒト急性骨髄性白血病細胞株 THP-1 を使用した。

試薬

BCR-ABL 阻害剤である Imatinib、JAK2/3 阻害剤である Ruxolitinib、JAK3 阻害剤である Tofacitinib を使用した。

細胞生存率アッセイ

K562、KCL-22 および THP-1 に Imatinib (0.06 - 1 μ M)、Ruxolitinib (10 - 1000 nM) および Tofacitinib (10 - 1000 nM) を曝露し、72 時間後に細胞生存率を MTT assay にて評価した。また、Imatinib と JAK 阻害剤の併用効果については、0.25 μ M の Imatinib および各 JAK 阻害剤を 100 nM の濃度で併用して細胞生存率を測定した。

ウエスタンブロット

Imatinib (0.25 μ M)、Ruxolitinib (100 nM) および Tofacitinib (100 nM) を単独および併用して曝露させた K562 を用いて、JAK-STAT 経路 (p-ABL、p-JAK2、JAK2、p-JAK3、JAK3、p-STAT3、STAT3、p-STAT5、STAT5)、アポトーシス (cleaved PARP、Caspase-3) およびがん幹細胞マーカー (ABCG2、ALDH1A) の発現をウエスタンブロット法にて検出した。

フローサイトメトリー

K562 に Imatinib (0.25 μ M)、Ruxolitinib (100 nM) および Tofacitinib (100 nM) を曝露させ、細胞周期への影響を測定した。測定は propidium iodide で染色した細胞をフローサイトメトリーを用いて行った。計測結果は FlowJo ソフトウェアにて解析を行った。

統計解析

併用における相乗効果の検討には二元配置分散分析を使用して分析を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

【結果】

白血病細胞株に対する Imatinib、Tofacitinib または Ruxolitinib の効果

K562 および KCL-22 においては Imatinib による IC50 値は 0.28 μM および 0.17 μM であり、濃度依存的に細生存率が低下したが、THP-1 においては細胞生存率に変化はなかった。また、Tofacitinib および Ruxolitinib は、いずれの濃度および細胞種においても単独で細胞生存率に影響しなかった。

Imatinib の抗腫瘍効果に対する Tofacitinib または Ruxolitinib の併用効果

Tofacitinib は、Imatinib と併用することで Imatinib の抗腫瘍効果を K562 では 14%、KCL-22 では 16% 増強した。Ruxolitinib については、Imatinib と併用することで Imatinib の抗腫瘍効果を K562 では 14%、KCL-22 では 16% 増強した。また、ウェスタンブロットによる PARP、Caspase3 の測定によりアポトーシスの有無について確認を行ったところ、JAK 阻害剤と Imatinib の併用群においても Imatinib 単独と同様にアポトーシスが誘導された。

Tofacitinib は JAK3 阻害を介して Imatinib の抗腫瘍効果を増強する

Imatinib 群では K562 細胞における Abl、JAK2、JAK3 および STAT3 のリン酸化が抑制された。JAK 阻害剤単独群では、Abl、JAK2/3 および STAT3/5 のリン酸が抑制されなかったが、Imatinib との併用群では、Abl、JAK2/3 および STAT3/5 のリン酸化が抑制された。Imatinib と Tofacitinib の併用群では JAK3 のリン酸化は抑制されたが、JAK2 のリン酸化は抑制されなかった。一方、Imatinib と Ruxolitinib の併用群では JAK2、JAK3 どちらのリン酸化も抑制された。また、Imatinib 単剤と比較し、JAK 阻害剤併用群では、STAT3/5 のリン酸化が抑制された。特に STAT5 のリン酸化においては、Imatinib 単剤では抑制はみられなかったが、併用群では抑制された。

Tofacitinib および Imatinib の併用は細胞周期を変化させ、アポトーシスを誘導する

Tofacitinib および Ruxolitinib と Imatinib の併用による K562 細胞の細胞周期の変化をフローサイトメリーにて解析した。それぞれの JAK 阻害剤は subG1 期の細胞集団の割合を増加 (Tofacitinib: 7%、Ruxolitinib: 5%) させた。

Tofacitinib はがん幹細胞マーカーを減少させる

Imatinib および JAK 阻害剤を使用した際の K562 における ABCG2 は、Imatinib、JAK 阻害剤のいずれの単独曝露群においても発現量が低下した。また、ALDH1A1 においては、Imatinib、JAK 阻害剤単独曝露では発現量に変化はなかったが、Imatinib と JAK 阻害剤を併用した場合に発現量が低下した。

【考察】

Imatinib の曝露により BCR-ABL 陽性細胞である K562 および KCL-22 の細胞生存率が低下したが、BCR-ABL 陰性細胞である THP-1 は、細胞生存率に変化はなかった。K562 に対する JAK2 阻害剤 Ruxolitinib および JAK3 阻害剤 Tofacitinib の単独曝露では細胞生存率に変化はなかったが、Imatinib と各 JAK 阻害剤の併用により細胞生存率が低下した。また、JAK のリン酸化に関しても Ruxolitinib および Tofacitinib の単独曝露では阻害されず、Imatinib との併用によって JAK のリン酸化が阻害された。これらのことから、CML 細胞では JAK/STAT 経路の上流に BCR-ABL が位置しており、BCR-ABL が活性化している状態では JAK のリン酸化を阻害できず、BCR-ABL が阻害された状態においてのみ JAK 阻害作用を示すことが明らかとなった。さらに Ruxolitinib は、JAK2 阻害作用に加えて JAK3 阻害作用が認められたが、Tofacitinib は JAK3 阻害作用のみであり、JAK2 阻害作用は認められなかった。しかし、Tofacitinib は Ruxolitinib と同程度の抗腫瘍効果を示したことから、JAK3 が CML の細胞生存に大きく寄与していることが示唆された。

続いて、K562 において、がん幹細胞マーカーである ABCG2 は、Imatinib または JAK 阻害剤単独曝

露によって完全に発現が抑制された。また ALDH1A1 に関しては、Imatinib または JAK 阻害剤単独曝露では発現が完全に抑制されなかったが、JAK 阻害剤および Imatinib の 2 剤を併用することによって発現が完全に抑制された。このことから、Imatinib により BCR-ABL 活性が低下した状態においては JAK 阻害剤が CML 幹細胞に有効である可能性が示された。以上のことから、Imatinib に Tofacitinib などの JAK 阻害剤を併用することは、CML の新たな治療法となることが示唆された。

【結論】

JAK3 は CML 細胞の生存に寄与しており、JAK3 阻害剤 Tofacitinib および Imatinib を併用することで CML の生存率を低下させることが明らかとなった。本研究より、Tofacitinib と Imatinib の併用は CML 治療における新たな治療戦略の 1 つとなることが示唆された。