

PAI-1 阻害剤の造血再生と白血病治療への応用

八幡 崇*

Therapeutic applications of PAI-1 inhibitor for the treatment of hematological malignancies

Takashi YAHATA

要約: プラスミノゲン活性化抑制因子 (plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1) は, プラスミノゲンをプラスミンに変換する組織型プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: tPA) の酵素活性を阻害することにより, 線維素溶解系 (線溶系) を負に制御する. 我々は PAI-1 が線溶系を制御することにより造血再生を阻害することを明らかにした. さらに, PAI-1 は細胞の内部でもプロテアーゼインヒビターとしてはたつき, 造血幹細胞とニッチとの相互作用, 白血病幹細胞の薬剤耐性などの様々な局面に深く関わることを明らかにした. 本稿では, PAI-1 による造血制御に関する新しい知見を紹介し, PAI-1 阻害剤の臨床応用の可能性を提示したい.

Key words: PAI-1 inhibitor, hematopoietic stem cell, leukemia stem cell, hematopoietic regeneration, leukemia

1. PAI-1 と造血再生

造血幹細胞の移植において, 前処置として抗がん剤の投与や放射線照射による骨髄破壊を行うと, Heissig らの報告にある通り骨髄中の組織型プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: tPA) 主導の線溶系が活性化する¹⁾. そしてプラスミン以下, 一連の酵素活性が亢進し, 最終的に stem cell factor (SCF) などの増殖因子の産生が誘導され, 造血再生が促進する. 我々は, この移植前処置による tPA の発現上昇に伴ってその抑制因子であるプラスミノゲン活性化抑制因子 (plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1) の発現が, 特に骨髄内において, 著しく亢進することを見出した. この PAI-1 発現の意義を明確にするために, PAI-1 遺伝子欠損マウスをレシピエントとして造血幹細胞移植実験を行ったところ, 対照群に比べて速やかな造血系の再生が認

められた. つまり, PAI-1 は造血再生の阻害因子であることが明らかになった²⁾.

我々は, PAI-1 の三次元立体構造に基づいた *in silico* におけるドッキングシミュレーションによって PAI-1 活性を阻害する低分子化合物 (TM5275) を同定した³⁾. この PAI-1 阻害剤は, PAI-1 活性をほぼ完全に阻害して, ラットやサル of 血栓症モデルにおいて血漿凝塊の溶解を促進するなどの有効性を示した. 本剤は経口投与で効果を発揮することも大きな利点である. そこで, 造血幹細胞を移植すると同時に PAI-1 阻害剤を経口にて連日投与したところ, 期待された通りに PAI-1 の活性化は抑制され, tPA の産生量の増加と造血再生因子の産生亢進により, 造血幹細胞の増幅と造血再生の迅速化が達成された²⁾. 興味深いことに, tPA 製剤よりも PAI-1 阻害剤による造血再生の方が効率良いものであった. 一般的に造血幹細胞の増幅は, 幹細胞活性の低下につながるものが懸念される. そこで, 移植したマウスから骨髄細胞を回収し, さらに別のマウスに移植 (2次移植) して幹細胞活性を検討したところ, 本剤による増幅の場合, 対照群よりもむしろ高い再生能を示したことから, 高い幹細胞活性を維持したまま増幅できて

*責任者連絡先:

東海大学医学部先端医療科学科
〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143
Tel: 0463-93-1121, Fax: 0463-92-4650
E-mail: yahata@tokai-u.jp

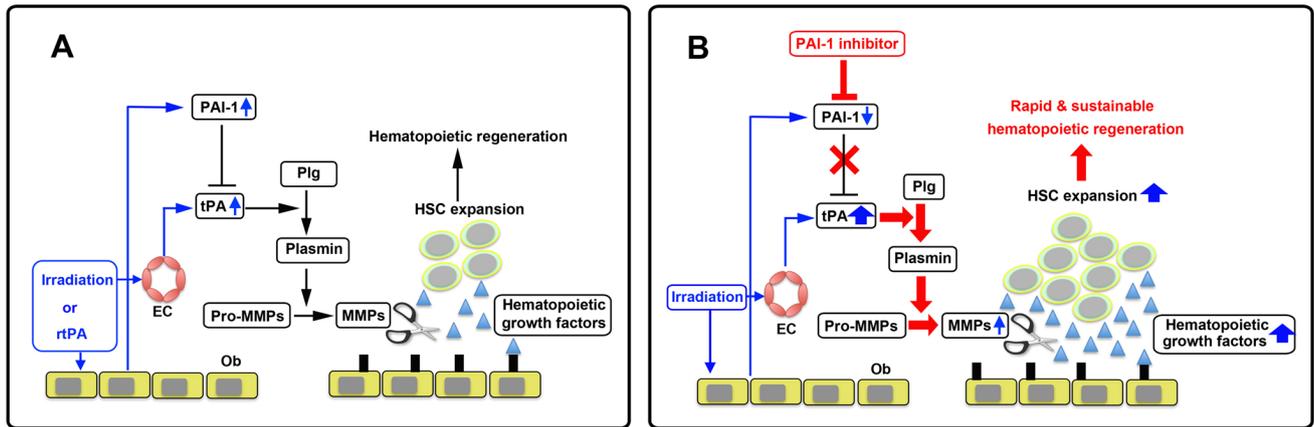


図1 PAI-1の線溶系による造血再生制御のメカニズム

放射線照射などの骨髄破壊処理により、骨髄内でプラスミノゲン活性化因子 (tPA) をはじめとした線溶系の活性化が引き起こされ、増殖因子の産生が亢進し、造血幹細胞の増幅を伴う再生反応が始まる (A)。この時骨髄内では、線溶系の阻害因子である PAI-1 の産生も亢進し、線溶系による造血再生反応を抑制してしまう。PAI-1 阻害剤の投与により、PAI-1 による線溶系の抑制が解除され、造血再生反応が効率化する (B)。

いることが明らかとなった。すなわち、本剤の投与により造血再生の早期回復と長期維持の両方が達成できることが明らかとなり、本剤の造血再生促進薬としての有効性が期待された (図1)。

2. PAI-1 による幹細胞の運動能制御機構

造血幹細胞は、骨髄の特殊な微小環境 (ニッチ) で『静止』することによって幹細胞活性を維持している。しかし、少数ながらも一定の割合で骨髄を離れ、末梢循環血中に流れ出ることも、造血系の恒常性維持に重要である。さらに、出血や G-CSF 投与などのストレス条件下では素早く骨髄を離れ末梢循環血中に流れ出る (動員)、逆に、放射線照射後の骨髄移植の場合には速やかに末梢血から骨髄に辿り着く (ホーミング) から、造血幹細胞は本質的には運動能の高い細胞であるといえる。では、造血幹細胞がニッチに留まるのは、どのようなメカニズムによるのだろうか? 我々は、生体には造血幹細胞の高い運動性を抑制しニッチに留めるための積極的な仕組みが備わっているのではないかと考えた。そこで注目したのが、ニッチ細胞が産生する TGF- β である。TGF- β は造血幹細胞の細胞周期を静止期に止めることにより幹細胞活性を維持する重要な因子で

あるだけでなく、PAI-1 の発現を強く誘導する作用がある。PAI-1 は LRP1 と呼ばれる LDL 受容体関連因子と結合し、がん細胞などの遊走を制御することが知られていることから、ニッチにおける PAI-1 の意義を明らかにすることを試みた。まず、造血幹細胞の移植時に PAI-1 阻害剤を投与したところ、造血幹細胞のホーミング能が亢進することが示されたが、ここで意外な事実が明らかとなった。すなわち、PAI-1 阻害剤によるホーミング能の亢進作用が線溶系の活性化によるものであるかどうかを検討するために、tPA 欠損マウスをレシピエントとして同様の実験を行ったところ、PAI-1 阻害剤の効果は全く影響を受けなかったのである。これはどういうことだろうか? 我々は、TGF- β の影響により造血幹細胞に PAI-1 発現が誘導され、それが線溶系とは違う機序で造血幹細胞の運動能を制御している可能性を考えた。そこで、PAI-1 欠損マウスをドナーあるいはレシピエントとして移植実験を行ったところ、野生型マウス由来の造血幹細胞を PAI-1 欠損マウスに移植した場合よりも、PAI-1 欠損マウス由来の造血幹細胞を野生型マウスに移植した方が高いホーミング活性を示すことがわかった⁴⁾。試験管内でトランスウェルアッセイを行うと、やはり PAI-1 を欠損した造血幹細胞の遊走能は高い。つまり、環境中に存在

する細胞外 PAI-1 ではなく、造血幹細胞自身に発現する細胞内 PAI-1 が造血幹細胞の運動能を抑制的に制御していることが示唆された。実際に、造血幹細胞の細胞内 PAI-1 の発現を調べてみると、他の分化した血液細胞に比べて優位に高く発現していることが明らかとなった⁴⁾。

それでは、細胞内 PAI-1 はどのようにして造血幹細胞の運動能を制御するのであろうか？我々は、造血幹細胞の動員やホーミングに重要な膜型メタロプロテアーゼ (membrane type-1 matrix metalloproteinase: MT1-MMP) に着目した。MT1-MMP の前駆体は生成の過程においてゴルジ体でセリンプロテアーゼである Furin による切断を受け、成熟型に変換され細胞膜上に輸送される。PAI-1 はセリンプロテアーゼであり、*in silico* で Furin とのドッキングシミュレーションを行ったところ、理論上 PAI-1 は Furin の活性を抑制する部位に結合することが示唆された。そこで、2つのタンパク質が極めて近い距離に存在している場合にのみ発色する近接ライゲーションアッセイ (PLA アッセイ) を行ったところ、実際に造血幹細胞のゴルジ体上で PAI-1 と Furin が結合していることが明らかとなった。これらのことから、PAI-1 は一般的によく知られている細胞外液中での線溶系の抑制だけでなく、細胞の内部でも Furin などのプロテアーゼ活性を抑制すると考えられる。そこで、未処置の野生型マウスに PAI-1 阻害剤を経口投与したところ、Furin の活性が高まり、MT1-MMP の発現が亢進し、造血幹細胞は速やかにニッチから離脱し、末梢血中に動員された。重要なことに、この動員された細胞を回収し、放射線照射したマウスに移植すると、全ての系列の血液細胞を産生し、さらに2次移植でも造血再生能を維持していることから、PAI-1 阻害剤の投与で動員された細胞は、多分化能と自己複製能を兼ね備えた造血幹細胞であることが明確になった。つまり定常状態においては、ニッチが産生する TGF- β が造血幹細胞の細胞内に PAI-1 の発現を誘導し、この PAI-1 が Furin 活性を抑制する結果、MT1-MMP の活性が減少するので造血幹細胞の運動能が制限されるということを見出した (図 2)⁴⁾。このことは、造血幹細胞はただ単にその場に「静止」しているわけではなく、TGF- β が誘導する PAI-1 に

よって積極的にニッチに留められながらも必要に応じて迅速に動き出せる状態を維持しているということが示唆された。このように、PAI-1 阻害剤は造血幹細胞の動員を促進することから、G-CSF 不応のドナー造血幹細胞の採取に有効である可能性がある。さらに、レシピエントに PAI-1 阻害剤を投与することによって造血幹細胞が離脱した後に機能的な空きニッチが形成され、放射線照射を行わなくても造血幹細胞を生着させることを実証し、本剤は移植前処置の低減などにも有効である可能性を示した⁵⁾。

PAI-1 阻害剤により造血幹細胞の動員とホーミングの両方が亢進するのは、骨髄から出て行く反応と入ってくる反応の両方を支持することになり、一見矛盾するようであるが、どちらもケモカインやサイトカインの濃度勾配に従って幹細胞が移動する方向が定まると考えると、PAI-1 を阻害して造血幹細胞の運動能が亢進したことの証左となる。

3. PAI-1 を標的とした白血病幹細胞の治療高感受性化

白血病幹細胞は白血病の発症起点であり、供給源でもある。抗がん剤は、活動的ながん細胞には作用するが、細胞周期が停止している静止状態のがん幹細胞には効果が低い。つまり、一見寛解期に至った場合でも治療抵抗性の白血病幹細胞が残存してしまうことが再発の原因であり、完治を困難にしている大きな要因の一つである。この幹細胞の静止状態は、骨髄のニッチと呼ばれる細胞との緊密な接着を介した相互作用によって誘導される。したがって、もしがん幹細胞の静止状態を解除しニッチによる保護作用から離脱させることができれば、抗がん剤に対する治療抵抗性が減弱し高感受性化するので、がん幹細胞の完全な排除を実現する理想的な治療法を確立することが期待できる。前段で紹介した通り、PAI-1 阻害剤は造血幹細胞のニッチからの離脱を促進することから、白血病幹細胞に対しても同じ効果が期待できるのではないかと考えた。

白血病幹細胞は正常造血幹細胞と多くの共通した性質を持つことが知られている。特に、PAI-1 の誘導因子である TGF- β によって白血病幹細胞が維持さ

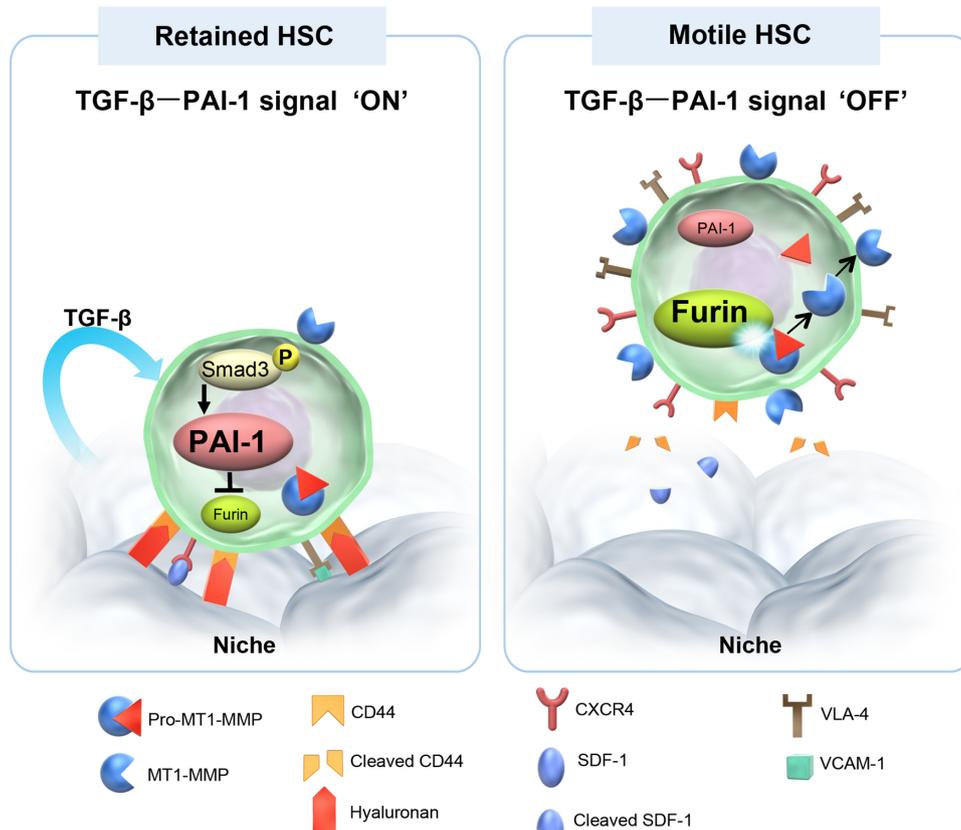


図2 細胞内PAI-1による造血幹細胞の運動能制御のメカニズム

ニッチが産生するTGF- β によって幹細胞に発現誘導される細胞内PAI-1がプロテアーゼであるFurinの活性を抑制する。その結果、細胞が運動能を発揮するために必要なMT1-MMPの成熟が抑制されることによって、幹細胞は骨髄内のニッチに繋ぎ止められる。PAI-1阻害剤の投与によりPAI-1活性が抑制されると、幹細胞はニッチを離れ、末梢に動員される。

れていることは、白血病幹細胞の治療抵抗性におけるPAI-1の関与を強く疑わせる。そこで、マウス造血幹細胞にウイルスベクターを利用してBCR/ABL遺伝子を導入して移植する慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia: CML)モデルマウスを作製して解析を行ったところ、予想した通り白血病幹細胞においてもTGF- β -PAI-1経路が活性化されていることを見出した。この白血病幹細胞におけるPAI-1発現の意義を明らかにするため、PAI-1高発現型のCML細胞とPAI-1欠損型のCML細胞を用意して、それぞれマウスに移植し、チロシキナーゼ阻害剤(イマチニブ)による治療実験を行ったところ、PAI-1高発現型CML細胞は治療抵抗性であるのに対し、PAI-1低発現型CML細胞は明らかに治療高感受性であった。すなわち、PAI-1は白血病細胞の治療感受性を決定する因子であり、そのPAI-1を高発現

する白血病幹細胞の治療抵抗性に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、イマチニブにPAI-1阻害薬を併用投与したところ、白血病幹細胞の運動能が亢進し、死亡率の低下など顕著な抗腫瘍効果を発揮するだけでなく、白血病幹細胞の著明な減少を誘導するなど、治療抵抗性白血病幹細胞の治療高感受性化に成功した(図3)⁶⁾。本剤は第I相臨床試験により安全性が確認された新薬であり、本知見をもとに、現在慢性骨髄性白血病患者を対象とした第II相臨床試験を進行中であり、有効性が示されることを期待している。

4. 考察

PAI-1は細胞外液中で線溶系を制御する機能が一般的によく知られている。我々は、PAI-1が細胞内

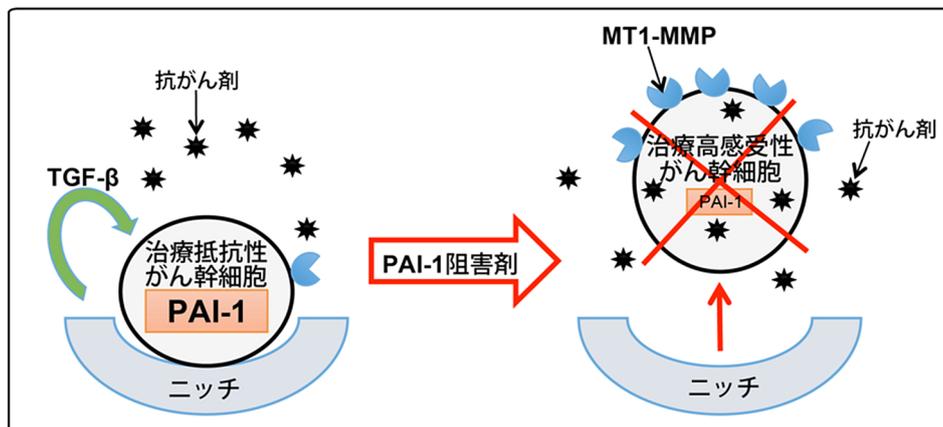


図3 細胞内 PAI-1 による白血病幹細胞の治療抵抗性獲得メカニズム

図2で示した細胞内 PAI-1 による造血幹細胞のニッチへの静止機構と同様のメカニズムによって、白血病幹細胞もニッチに繋ぎとめられる。そのため、白血病幹細胞はニッチによる保護を受け、治療抵抗性を示すようになる。PAI-1 阻害剤は、この白血病幹細胞とニッチとの相互作用を解除するので、白血病幹細胞の治療高感受性化を促し、薬剤の抗腫瘍効果を増強する。

においても機能し、細胞内のプロテアーゼ活性を阻害し、幹細胞の運動能を制御していることを明らかにした。PAI-1 阻害剤は細胞内外の PAI-1 活性を阻害することにより、造血再生から白血病治療まで幅広く利用可能である。我々の発見は以下に挙げる3つの点で重要である。

1) 幹細胞制御に関する新規なメカニズムの発見

造血幹細胞を静止期に留めておくことは、過度な細胞分裂による細胞老化を防ぎ、恒常性を維持するために重要である。線溶系の活性化は増殖因子の産生等を増強するため、PAI-1 による線溶系の阻害は、緊急時における造血再生反応を阻害する反面、平常時には造血幹細胞を静止期に維持するために重要な機構である可能性がある。ここで視点を変えてみると、従来から幹細胞の静止状態は前述したように細胞周期の停止現象として捉えられてきたが、幹細胞維持機構の根幹であるニッチとの相互作用を持続することが静止状態の本質であるからには、『細胞周期』と『運動能』の両方の観点から理解しなければ片手落ちである。しかし、このような切り口での研究はほとんど例がない。本研究は、幹細胞の『静止』状態には、細胞周期と運動性という2つの側面があり、そのどちらにも TGF-β によって誘導される細胞内外の PAI-1 が深く関与していることを明らかにし

た。そして、細胞内タンパク質分解系という新しい造血幹細胞制御機構を見出し、それは幹細胞が外的状況に応じて迅速な対応をするための重要な機能であると思われる。

2) PAI-1 阻害剤による新しいがん治療コンセプトの提唱

PAI-1 は、がんの生存、浸潤、転移に関与しており、PAI-1 高発現型のがんは予後不良であることが明らかとなっている。実際、米国臨床腫瘍学会により、乳がんの予後予測因子として PAI-1 の発現解析検査が推奨された。このように、PAI-1 はがんと深く関わる因子であるにも関わらず、PAI-1 がどのような機序でどのような役割を果たしているのかはほとんど不明である。本研究は、PAI-1 によるがん幹細胞の運動能制御機構に着目し、治療抵抗性の根幹であるニッチとの相互作用を解除することにより治療高感受性化させるという治療コンセプトを提唱するものである。TGF-β は様々ながん悪性化の主要因であることから、PAI-1 阻害薬は多くの悪性腫瘍にも適用できる可能性が高い。事実、乳がんや卵巣がんにおける PAI-1 阻害薬の有効性をすでに確認している。TGF-β 阻害薬は、幅広い生命現象を制御する TGF-β を阻害するため副作用が強く、臨床応用が頓挫している。PAI-1 は TGF-β の下流分子であり、PAI-1

阻害剤には細胞殺傷作用が無いなど、安全性が臨床試験で実証されていることから、新たながん治療法として安全性や有効性が高いことが期待できる。

3) PAI-1 阻害剤の血液がん以外の幅広い疾患への適応拡大

TGF- β と PAI-1 は多彩な機能を有する分子で、多くの疾患とも深い関係がある。申請者らはすでに、TGF- β を主因とする大腸炎や肺線維症などの様々な疾患において PAI-1 阻害薬が効果を発揮するという予備検討の結果を得ている⁷⁾。本研究の遂行により、血液がん以外の幅広い疾患に適応拡大できる可能性のある波及効果の高い知見が期待できる。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Heissig B, Lund LR, Akiyama H, Ohki M, Morita Y, Rømer J, Nakauchi H, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Danø K, Hattori K: The plasminogen fibrinolytic pathway is required for hematopoietic regeneration. *Cell Stem Cell* **1**: 658–670, 2007.
- 2) Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, Dan T, Van Ypersele De Strihou C, Miyata T, Ando K: Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells* **32**: 946–958, 2014.
- 3) Yamaoka N, Murano K, Kodama H, Maeda A, Dan T, Nakabayashi T, Miyata T, Meguro K: Identification of novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors with improved oral bioavailability: Structure optimization of N-acylanthranilic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **28**: 809–813, 2018.
- 4) Yahata T, Ibrahim AA, Muguruma Y, Eren M, Shaffer AM, Watanabe N, Kaneko S, Nakabayashi T, Dan T, Hirayama N, Vaughan DE, Miyata T, Ando K: TGF- β -induced intracellular PAI-1 is responsible for retaining hematopoietic stem cells in the niche. *Blood* **130**: 2283–2294, 2017.
- 5) Ibrahim AA, Yahata T, Muguruma Y, Miyata T, Ando K: Blockade of plasminogen activator inhibitor-1 empties bone marrow niche sufficient for donor hematopoietic stem cell engraftment without myeloablative conditioning. *Biochem Biophys Res Commun* **516**: 500–505, 2019.
- 6) Yahata T, Ibrahim AA, Hirano KI, Muguruma Y, Naka K, Hozumi K, Vaughan DE, Miyata T, Ando K: Targeting of plasminogen activator inhibitor-1 activity promotes elimination of chronic myeloid leukemia stem cells. *Haematologica*, 2020, in press, doi: 10.3324/haematol.2019.230227.
- 7) Imai J, Yahata T, Ichikawa H, Ibrahim AA, Yazawa M, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Matsushima M, Suzuki T, Mine T, Ando K, Miyata T, Hozumi K: Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice. *Intest Res*, 2020, in press, doi: 10.5217/ir.2019.00037.