

令和元年10月7日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05337

研究課題名(和文) MLL白血病の分子基盤に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for MLL-rearranged leukemia

研究代表者

横山 明彦 (Yokoyama, Akihiko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10506710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：MLL遺伝子に異常を持つ白血病は乳児に多く、予後が悪い。本研究において我々は異常なMLL遺伝子が引き起こす白血病の分子メカニズムを調べ、その理解に基づいて有効な治療法を開発することを試みた。

MLLは遺伝子の発現を制御するタンパク質である。本研究で我々は、MLL変異体がAF4とDOT1Lというタンパク質の働きに依存して遺伝子を活性化する事を見出した。さらに我々は、両方のタンパク質を同時に阻害することで高い抗腫瘍効果を得る事ができることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん治療法の開発はがん細胞が依存している特定のタンパク質を標的とした分子標的療法の開発に向かっている。しかし、開発中の化合物は単剤で十分な治療効果を得る事ができない場合も多い。現状の臨床現場では、まだほとんどの場合で古くから使われている抗がん剤に依存した治療が行われている。本研究成果は、がん化の分子メカニズムの一端を明らかにすると共に、得られた知見に基づいて新しい治療法を提案した点で学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Leukemias carrying mutations of the MLL gene are frequently found in infants and often associated with poor prognosis. We investigated the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia and proposed a novel therapeutic approach based on our findings.

MLL is a protein responsible for gene regulation. We found that MLL mutant proteins function as a hyper-active gene regulator dependently on two proteins, namely, AF4 and DOT1L. We showed experimentally that simultaneous inhibition of these two proteins by molecularly-targeted drugs exerted strong anti-tumor effects in mouse disease models.

研究分野：医科学

キーワード：白血病 分子標的薬 転写 クロマチン エピジェネティクス MLL 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MLL 遺伝子の変異を持つ白血病は急性白血病の7%程を占める。特に乳児の急性リンパ性白血病に多く、予後が悪い。*MLL* は転写制御因子であり、*HOX* 遺伝子などの転写を活性化する。染色体転座によって *MLL* 部分と融合パートナー部分がつながった *MLL* キメラ遺伝子が生じ、その結果発現する *MLL* キメラ蛋白質は、恒常的に標的遺伝子の転写を活性化することで白血病を引き起こす。*MLL* 白血病は二次的な遺伝子変異が非常に少ないことから、*MLL* キメラ蛋白質は非常に強力な発がん因子であるといえる。しかし、なぜこの発がん因子が単独で予後の悪い白血病を引き起こすことができるのか、よくわかっていなかった。従って、***MLL* キメラが白血病を引き起こす分子基盤を徹底的に明らかにしていく事が学術的にも治療法の開発に向けてももっとも重要な課題だ**と思われた。

2. 研究の目的

MLL 遺伝子の異常を伴う白血病は予後が悪く、現行の治療法では完全な治癒が高確率で望めないことから、新たな治療法の開発が切望されている。このような状況を受けて近年、*MLL* 白血病に対する分子標的薬の開発が世界中で試みられている。しかし、*MLL* 遺伝子異常が白血病を引き起こす分子基盤はいまだ未解明な点が多く、どのような治療法が最も効果的なのかは不明である。開発中の分子標的薬は単剤では高い治療効果が出ないことも懸念されており、分子基盤の理解に基づいて、複数の薬剤の併用療法を模索する必要がある。我々は、*MLL* 白血病発症の分子基盤を徹底的に明らかにすることで新たな分子標的を見出すとともに、これまでに開発されている分子標的薬の効果的な使用法を検討し、エビデンスを示しながら新たな治療法を提案することを目指す。

3. 研究の方法

(1) *MLL* キメラが局在するクロマチン環境の可視化

これまでに我々はクロマチン結合因子のゲノム上での局在を詳細に調べるために、独自に高感度なクロマチン免疫沈降 (ChIP)法を開発してきた。この手法を用いることで、特定のゲノム領域に *MLL* キメラと共同している転写制御因子を同定することができる。本研究期間中に可能な限り多くの転写関連因子やヒストン修飾に対する抗体を用いて ChIP-seq 解析を行い、*MLL* キメラの標的クロマチンの詳細なエピゲノム環境を明らかにし、*MLL* キメラがクロマチン上で共作用する因子を同定する。

(2) *MLL* キメラが造血細胞を不死化する分子基盤の解明

MLL キメラ遺伝子をマウスの造血前駆細胞に導入すると *HOXA9* の転写活性化を介して不死化する。また、*MLL* キメラを造血前駆細胞に導入して同系マウスに移植すると白血病を発症する。この手法を用いて、*MLL* キメラが白血病を引き起こすために必要な構造を同定し、その構造の機能を調べることで、白血病発症の分子基盤を明らかにする。

(3) *MLL* 白血病細胞を効率的に根絶させる分子標的薬間の協調作用の探索

MLL キメラの作用機序の理解に基づき、様々な分子標的薬の効果を検証し、効率的に白血病細胞を不活化する薬剤のコンビネーションを探索する。

4. 研究成果

MLL 遺伝子変異を伴う急性白血病について、がん化を引き起こすメカニズムを分子レベルで解明した

我々はがん化のメカニズムを解明するため、独自に開発したクロマチン免疫沈降法を用いて、MLL キメラタンパク質の一つである MLL-ENL とその結合タンパク質である AF4 や DOT1L が局在するゲノム領域を同定した。その結果、MLL-ENL は AF4 をがん関連標的遺伝子上にリクルートしており、その近傍に DOT1L も局在することを明らかにした(図1)。また、マウスにおいて白血病を引き起こす病態モデルを用いて、MLL キメラタンパク質が白血病を引き起こす上で必要な構造を調べることで、MLL-ENL や MLL-AF10 といった MLL キメラタンパク質が AF4 と DOT1L 両方と直接結合することで、遺伝子の異常な活性化を起こしていることを見出した。AF4 は主に転写反応を開始する働きと、転写伸長反応を促進する働きを持ち、DOT1L は転写活性化状態を維持する方向にクロマチン環境を整える働きを持っているが、本研究の結果、それぞれが相補的に働くことで遺伝子の発現を強く活性化し、がん化が引き起こされることが明らかになった。この結果は、AF4 の転写活性化機能と DOT1L の転写維持機能の両方を同時に阻害することで MLL キメラ依存的な遺伝子発現を効果的に抑制できる可能性を示唆した。

分子標的薬2剤による併用療法で高い抗腫瘍効果が期待できることを実験的に証明した

先の研究成果を踏まえ、MLL 変キメラタンパク質の複合体形成を阻害する薬剤と DOT1L の酵素活性を阻害する薬剤の併用について検討を行った。MLL 複合体形成を阻害する MI-2-2 という分子標的薬は、MLL-ENL と MENIN という結合因子の相互作用を阻害することで、AF4 が標的遺伝子上にリクルートされることを妨げる。これによって AF4 による転写活性化を抑制することができる。また、DOT1L はヒストンをメチル化することで遺伝子の活性化状態を維持するが、その酵素活性を阻害する EPZ-5676 という分子標的薬は DOT1L の作用を妨げる。これによって DOT1L 依存的な転写活性化状態の維持を妨げることができる。単剤ではあまり効果のない低濃度でも2剤を併用すると、MLL 白血病細胞の増殖を効率的に阻害し、分化を誘導した(図1)。また、3日間、2剤に暴露させた白血病細胞をマウスの体内に移植した場合、ほとんど白血病を起こさないことを見出した。これらの実験によって、AF4 と DOT1L の活性が同時に阻害されると、高い抗腫瘍効果が得られることが確認された。

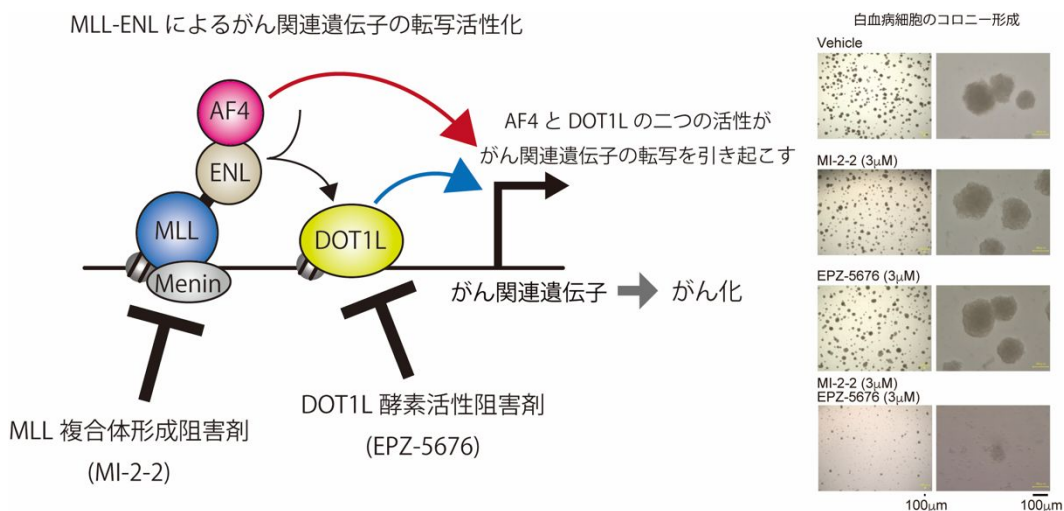


図1 MLL 変異体タンパク質による白血病化のメカニズム

MLL-ENL による転写活性化メカニズム(左)。MLL-ENL は ENL 部分を介して AF4 をリクルートして遺伝子の発現を活性化する。さらに DOT1L をリクルートして遺伝子の活性化状態を維持する。

MI-2-2によりMLL複合体が形成されなくなるため、AF4がリクルートされなくなる。また、EPZ-5676によってDOT1Lの酵素活性が失われ、遺伝子の活性化状態の維持ができなくなる。AF4とDOT1Lは協調的に働いており、2者を同時に阻害すると白血病細胞の増殖が著しく低下する(右)(Okuda et al. 2017 JCI)。

【今後の展望】

今回、MLL変異白血病細胞にMLL複合体形成阻害剤とDOT1L酵素活性阻害剤を併用すると、AF4とDOT1Lの活性が同時に阻害され、その結果白血病細胞を著しく減少させることがマウスモデルを用いて示された。現行の治療法ではMLL遺伝子の変異を持つ白血病は予後不良であり、将来的にこの二つの分子標的薬の併用療法が有効な治療法として確立され、治療に役立つことが期待される。近年、より良いがん治療を目指して新しい分子標的薬の創製が様々な分子を標的として試みられている。我々研究者は病気の分子メカニズムを深く理解することで、様々ながん種でより効果的な治療法を今後も新たに提案していく事ができると展望される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. *[Yokoyama, A.](#) RNA polymerase II-dependent transcription initiated by selectivity factor 1: a central mechanism used by MLL fusion proteins in leukemic transformation **Frontiers in Genetics (RNA)** 9:722 (2019) [REVIEW]
2. Asada S, Goyama S, Inoue D, Shikata S, Takeda R, Fukushima T, Yonezawa T, Fujino T, Hayashi Y, Kawabata K, Fukuyama T, Tanaka Y, [Yokoyama A](#), Yamazaki S, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kojima S, Kawazu M, Mano H, Kitamura T Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukaemogenesis **Nature Communications** 9:2733 (2018)
3. Inoue D, Fujino T, Sheridan P, Y Zhang Y, Nagase R, Horikawa S, Li Z, Matsui H, Kanai A, Saika M, Yamaguchi R, Kozuka-Hata H, Kawabata K, [Yokoyama A](#), Goyama S, Inaba T, Imoto S, Miyano S, Xu M, Yang F, Oyama M, and Kitamura T. A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies **Leukemia** 32:1327-1337 (2018)
4. Okuda H, and *[Yokoyama A](#). In vivo leukemogenesis model using retrovirus transduction **Bio-protocol** 7:23, e2627 (2017)
5. Okuda H, and *[Yokoyama A](#). Myeloid progenitor transformation assay **Bio-protocol** 7:23, e2626 (2017)
6. Chen Y, Anastassiadis K, Kranz A, Stewart AF, Arndt K, Waskow C, [Yokoyama A](#), Jones K, Neff T, Lee Y, Ernst P. MLL2, Not MLL1, Plays a Major Role in Sustaining MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. **Cancer Cell** 31:6, p755-770 (2017)
7. #Okuda H, #Stanojevic B, Kanai A, Kawamura T, Takahashi S, Matsui H, Takaori-Kondo A, *[Yokoyama A](#). Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia. **J. Clin. Invest.** 127(5) 1918-1931 #co-first author (2017)
8. *[Yokoyama, A.](#) Transcriptional activation by MLL fusion proteins in leukemogenesis. **Experimental. Hematology** 6:21-30 (2017) [REVIEW]

〔学会発表〕(計3件)

1. 第9回 日本血液学会国際シンポジウム "Transcriptional mechanism that drives MLL-rearranged leukemia" (2018.7.27-28)
2. 第79回 日本血液学会学術集会ープレナリーセッション "Molecular mechanisms of leukemia stem cell maintenance by MLL fusion proteins" (2017.10.21)
3. 第56回 臨床化学学会年次学術集会ー教育講演 「11q23転座白血病の発症機序」 (2016.12.04)

〔図書〕(計5件)

1. 横山明彦、「MLLキメラによる白血病発症機構」(血液内科 Vol.77, No.2, p260-266) 科学評論社 (2018)
2. 横山明彦、「MLL転座白血病における治療標的の現状と展望」(血液内科 Vol.75, No.3, p369-374) 科学評論社 (2017)
3. 横山明彦、「MLL遺伝子を標的とする染色体転座」(血液内科 73 巻第6号 p725-31) 科学評論社 (2016)
4. 横山明彦、「11q23転座とMLL」(日本臨床 74巻増刊号8 白血病学(上) p266-72) 日本臨床社 (2016)
5. 横山明彦、「MLLによる造血器腫瘍の発症機構」(造血器腫瘍アトラス 改訂第5版 p216-223) 日本医事新報社 (2016)〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：光学活性な架橋型環状2級アミン誘導体
 発明者：上岡正児、島田尚 明、広瀬亘、坂仁 志、横山明彦
 権利者：大日本住友製薬 株式会社
 種類：特許
 番号：特願 2018-067187
 出願年：2018
 国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
 国立がん研究センター鶴岡連携研究拠点ホームページ <https://www.tml.ncc.go.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。