

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15499

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるエピジェネティック治療と腫瘍免疫のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between epigenetic therapy and anti-tumor immunity in the treatment of hematopoietic neoplasms

研究代表者

合山 進 (Goyama, Susumu)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80431849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：新しいがんの治療法としてエピジェネティック治療や腫瘍免疫療法が期待されている。しかしながら、これらの治療法が効果を発揮するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、マウス造血器腫瘍細胞を通常マウスと免疫不全マウスに移植する実験系を用いて、様々な薬剤の治療効果と腫瘍免疫の関係を検証した。その結果、DNAメチル化阻害剤やp53活性化薬の治療効果発現には腫瘍免疫が重要であることが判明した。またマウス骨髄異形成症候群モデルを用いて、ヒストン脱アセチル化阻害剤の有効性を証明した。これらは、今後エピジェネティック制御や腫瘍免疫を活用した新しい造血器腫瘍治療を開発するための基盤となる成果である。

研究成果の概要(英文)：“Epigenetic therapy” and “tumor immunotherapy” have attracted considerable attention in recent years as new therapeutic strategies against tumors. However, how these therapies show anti-tumor effect is not fully understood. In this study, we transplanted murine blood tumors into both immunocompetent C57BL/6 mice and immunodeficient NSG mice, and treated these mice with a variety of drugs. We found that a DNA methylation inhibitor and a p53-activating drug suppressed leukemia progression with the assistance of tumor immunity. Furthermore, we showed the anti-tumor effect of an HDAC inhibitor using a mouse model for myelodysplastic syndrome. These findings will be the basis of future development of new epigenetic therapies and tumor immunotherapies for hematopoietic neoplasms.

研究分野：血液内科学

キーワード：腫瘍免疫 エピジェネティクス p53 DNAメチル化阻害剤 ヒストンアセチル化阻害剤 急性骨髄性白血病 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

新しいがんの治療法として「エピジェネティック治療」や「腫瘍免疫療法」が期待されている。エピジェネティック治療としては、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化(HDAC)阻害剤が一部の造血器腫瘍に有効であることが明らかとなってきた。また腫瘍免疫療法としては、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤や、キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法などの効果が臨床的に証明された。

エピジェネティック治療薬の一つDNAメチル化阻害剤の作用機序は長い間不明であったが、最近、DNAメチル化阻害剤が癌細胞におけるdsRNAの発現を上げ細胞をウイルス感染様の状態にして免疫系を活性化する作用があることがわかってきた[Cell 162(5): 961-973 及び 974-986 (2015)]。また、HDAC阻害剤の治療効果と腫瘍免疫との関連についても研究が進んでいる[Biomed Research International 2016:8797206 (2016)]。エピジェネティック治療薬の効果は、(1)投与後効果発現までに時間がかかる、(2)化学療法が効かない患者に対しても効果を示す、などの点でも免疫療法と共通点があり、エピジェネティクス治療と腫瘍免疫の間に深い関連がある可能性は高い。しかしながら、これらの治療法が効果を発揮するメカニズムについては不明な点が多く、その解明は大きな課題であった。

申請者はこれまでに、白血病遺伝子を導入したマウス骨髄細胞を同系統のレシピエントマウスに移植する「同種移植モデル」と、ヒト白血病細胞を免疫不全マウスに移植する「異種移植」モデルという2つの異なる白血病モデルを用いて研究をおこなってきた。その過程で、同一分子の機能解析の結果が2つのモデルで一致しないという例を何度か経験した。例えば、同種移植モデルの系では転写因子Runx1の欠失誘導がMLL白血病の発症を促進した[Nishimoto N...Goyama S...Kurokawa M. Blood 118(9): 2541-2550, 2011]のに対し、異種移植モデルの系ではRUNX1の発現抑制によりMLL白血病の発症が遅延した[Goyama S...Mulloy JC. Journal of Clinical Investigation 123(9): 3876-3888 (2013)]。また、同種移植の系においてトロンピンレセプターF2rをMLL白血病細胞に過剰発現すると、白血病細胞の増殖は遅くなるものの幹細胞活性は増強するという効果が認められるが、このような効果は

異種移植の系では観察できない [Goyama S et al, Oncogene 36(18): 2589-2598 (2017)]。これらの違いは、免疫不全マウスにおける腫瘍免疫の欠失が関係していると考えられ、この性質を利用することにより、様々な造血器腫瘍治療における腫瘍免疫の役割を調べるのが可能となる。

本研究では、我々の確立した2つの造血器腫瘍モデル:MLL-AF9 導入急性骨髄性白血病(Acute Myeloid Leukemia: AML)モデルと、変異型ASXL1/SETBP1 導入骨髄異形成症候群(Myelodysplastic Syndrom: MDS)モデルを用いて、エピジェネティック治療薬を含む様々な薬剤の治療効果を検証した。また、通常マウスと免疫不全マウスにおける薬剤の治療効果を比較することにより、造血器腫瘍治療における腫瘍免疫の役割を評価した。これにより、エピジェネティック制御と腫瘍免疫を利用した新しい造血器腫瘍治療法の開発を試みた。

2. 研究の目的

マウス造血器腫瘍モデルを用いて、生体内で治療効果を示す薬剤を同定する。その薬剤の効果を通常マウスと免疫不全マウスにおいて比較することにより、腫瘍免疫の役割を評価する。これにより、エピジェネティクス制御と腫瘍免疫を活用した新しい造血器腫瘍治療を開発する。

3. 研究の方法

(1) MLL-AF9 白血病モデル

MLL-AF9 転座はAMLの5%程に認められ、予後不良因子の一つである。また、強い造腫瘍活性を持つことが知られており、マウスAMLモデルの作製に有用である。本研究では、C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞からCD117 MicroBeadsを用いて造血幹前駆細胞を分離した。この細胞にレトロウイルスを用いてMLL-AF9を導入し(GFPでマークする)、同系統(C57BL/6)のレシピエントマウスに移植した。また、免疫不全マウス([NSG(NOD/Shi-scid/IL-2R γ ^{null})マウス])に移植する実験も行い、免疫不全マウス内で発症が早まるかどうかを検証した。

(2) p53-Mdm2 結合阻害剤治療モデル

MLL-AF9 白血病細胞を移植したレシピエントマウスに、移植後3日目からp53-Mdm2結合阻害剤[DS-5272: Bioorganic & Medicinal

Chemistry 23(10): 2360-2367 (2015)]を週3回、100 mg/kg で経口投与した。また、治療後の白血病細胞を用いて RNA-Seq および Single-cell Mass Cytometry(CyTOF)を行い、治療後残存する白血病細胞の性質を調べた。さらに、DS-5272 と Hif1 α 阻害剤 Echinomycin (週5回、100 mg/kg、腹腔内投与)の併用投与も行った。

(3) CRISPR/Cas9 を用いた PD-L1 欠失誘導

MLL-AF9 白血病細胞にレンチウイルスを用いて Cas9 を導入し(lentiCas9-Blast, Addgene #52962)、Blasticidin S 10 μ g/ml 添加下で5日間培養することにより Cas9 導入細胞を選別した。この Cas9 発現 MLL-AF9 白血病細胞をレシピエントマウスに移植し、白血病を発症したマウスの骨髄から MLL-AF9 細胞を採取した。この白血病細胞に、GFP を標的とする gRNA を発現するレンチウイルスベクター pXPR_011 (Puromycin) (Addgene #59702) を導入して GFP が消失すること (=Cas9 が機能していること)を確認した。次に作成した MLL-AF9/Cas9 細胞に、PD-L1 を標的とする2種類の gRNA を導入し、Puromycin 1 μ g/ml で1週間培養することにより導入細胞を選別した。これらの細胞における PD-L1 欠失の誘導は、FACS 解析で確認した。

(4) Decitabine 治療モデル

野生型もしくは p53 欠失 MLL-AF9 白血病細胞を移植したレシピエントマウスに、移植後3日目から DNA メチル化阻害剤 Decitabine を週3回、600 mg/kg で皮下投与した。

(5) 変異型 ASXL1/SETBP1-MDS モデル

ASXL1 および SETBP1 は MDS で高頻度に変異を認める遺伝子で、我々は以前に変異型 ASXL1 と変異型 SETBP1 が協調して MDS/AML の発症を誘導することを明らかにした[Leukemia 29(4): 847-857 (2015)]。上記(1)と同様に変異型 ASXL1/SETBP1 を導入した骨髄幹前駆細胞(GFP でマークする) 1×10^6 個を同系統(C57BL/6)マウスに移植し、マウス MDS モデルを作製した。

(6) HDAC 阻害剤治療モデル

変異型 ASXL1/SETBP1 導入細胞 (combined expression of SETBP1 and ASXL1 Mutations: cSAM 細胞) を移植したレシピエントマウスに、移植後2日目からヒストン脱アセチル化

(HDAC)阻害剤 Vorinostat を 50mg/kg で連日投与した。

4. 研究成果

(1) p53-Mdm2 結合阻害剤は MLL-AF9 白血病細胞の発症を抑制する。

MLL-AF9 白血病細胞を移植したレシピエントマウスに、p53-Mdm2 結合阻害剤 DS-5272 を投与したところ、生存期間が顕著に延長した (Figure 1)。また、骨髄中の白血病細胞数が激減して完全寛解の状態となった。ただし、治療を中止すると全例が再発した。

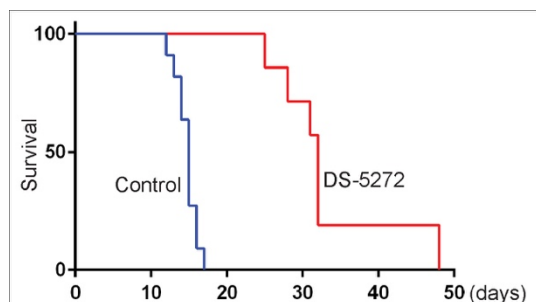


Figure 1. MLL-AF9白血病細胞を移植したレシピエントマウスに、移植3日後より、DS-5272 100mg/kgを週3回経口投与した。DS-5272投与群で生存期間は有意に延長した。

(2) p53-Mdm2 結合阻害剤投与後の白血病細胞における炎症・免疫関連分子の発現上昇

無治療群および DS-5272 投与群の白血病細胞を用いて RNA-Seq 解析を行い、両群で異なる発現を示す遺伝子を同定した。それらの遺伝子を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行なったところ、p53 経路やアポトーシス経路の活性化などの予想された変化に加え、TNF α 経路、インターフェロン経路など、炎症や免疫に関与する遺伝子の発現が上昇していることが判明した (Figure 2)。

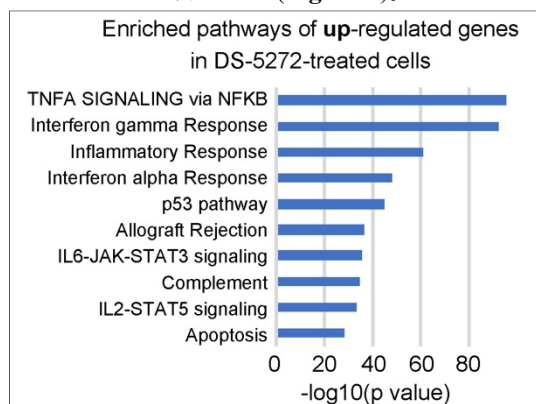


Figure 2. DS-5272 投与後に発現上昇する遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行った。

次に、Single-cell Mass Cytometry (CyTOF)解析を行い、無治療群に比べ DS-5272 投与群にお

いて変化するシグナル経路を探索した。その結果、DS-5272 投与群において Hif1 α の発現が亢進していることを見出した。また、Hif1 α の標的遺伝子の一つである PD-L1 の発現を FACS Verse で調べたところ、DS-5272 投与群で PD-L1 の発現が上昇していることが確認された (Figure 3)。

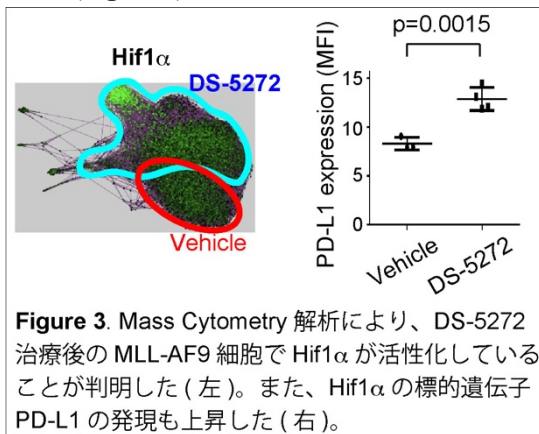


Figure 3. Mass Cytometry 解析により、DS-5272 治療後の MLL-AF9 細胞で Hif1 α が活性化していることが判明した (左)。また、Hif1 α の標的遺伝子 PD-L1 の発現も上昇した (右)。

これらの結果は、DS-5272 の治療効果発現に炎症や免疫が関与していること、また Hif1 α -PD-L1 経路の活性化が白血病細胞の治療抵抗性に貢献していることを示唆している。

(3) p53-Mdm2 結合阻害剤の治療効果発現における腫瘍免疫の関与

上記治療モデルにおける腫瘍免疫の役割を調べるため、同じ MLL-AF9 白血病細胞を通常の C57BL/6 マウスと免疫不全マウス(NSG マウス)に移植し、異なるレシピエントマウスを用いることによる治療効果の違いについて検証した。その結果、通常マウスに白血病細胞を移植した場合に比べて、NSG マウスに移植した場合は DS-5272 の治療効果が著しく減弱することが判明した (Figure 4)。この結果は、MLL-AF9 白血病に対する DS-5272 の治療効果発現において、腫瘍免疫が重要な役割を果たしていることを示している。

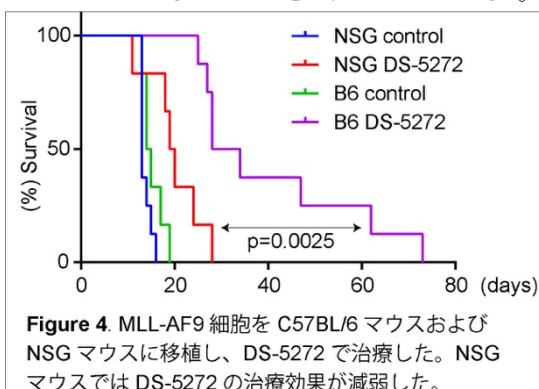


Figure 4. MLL-AF9 細胞を C57BL/6 マウスおよび NSG マウスに移植し、DS-5272 で治療した。NSG マウスでは DS-5272 の治療効果が減弱した。

次に、Hif1 α -PD-L1 経路が白血病の進展や治療抵抗性において果たす役割を以下の実験で検証した。まず、MLL-AF9 白血病細胞において PD-L1 の欠失を CRISPR/Cas9 システムを用いて誘導した。この PD-L1 欠失 MLL-AF9 白血病細胞を移植して DS-5272 で治療したところ、PD-L1 欠失の誘導により白血病細胞に対する DS-5272 の治療効果が増強することが明らかとなった。最後に、MLL-AF9 白血病細胞に対する DS-5272 と Hif1 α 阻害薬 Echinomycin の併用効果を検証した。Echinomycin 単独投与では白血病に対する治療効果は認められなかったが、Echinomycin と DS-5272 を併用すると、DS-5272 単独投与時以上にレシピエントマウスの生存期間が延長した (Figure 5)。また、Echinomycin の併用により、DS-5272 が誘導する白血病細胞における PD-L1 発現上昇が抑制されることも判明した。

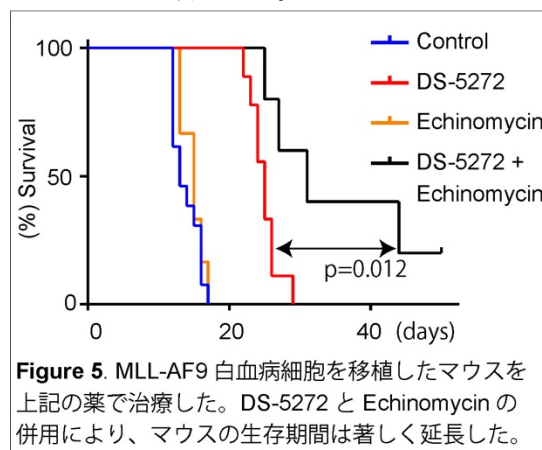


Figure 5. MLL-AF9 白血病細胞を移植したマウスを上記の薬で治療した。DS-5272 と Echinomycin の併用により、マウスの生存期間は著しく延長した。

これらの結果は、p53-Mdm2 結合阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬や Hif1 α 阻害剤を組み合わせが、腫瘍免疫の力を活用した有効な治療戦略になりうることを示唆している。

(4) Decitabine の治療効果における腫瘍免疫の関与

MLL-AF9 白血病細胞を移植したレシピエントマウスに、エピゲノム治療薬 Decitabine を投与したところ、生存期間が有意に延長した。この生存期間延長効果は、免疫不全マウスに移植した場合は認めなかった。また、Decitabine で治療した MLL-AF9 白血病細胞において、dsRNA の発現が上昇する傾向があった (Figure 6)。ただし、このモデルにおける Decitabine の治療効果は限定的であり、他の造血器腫瘍モデルを用いて結果を確認する必要がある。

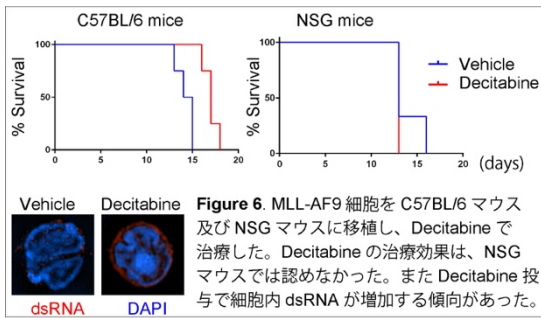


Figure 6. MLL-AF9 細胞を C57BL/6 マウス及び NSG マウスに移植し、Decitabine で治療した。Decitabine の治療効果は、NSG マウスでは認めなかった。また Decitabine 投与で細胞内 dsRNA が増加する傾向があった。

(5) p53 欠失 MLL-AF9 細胞に対する Decitabine の治療効果

最近の臨床研究で、Decitabine 投与により p53 変異を持つ造血器腫瘍細胞が選択的に消失する傾向があることがわかってきた。そこで p53 ノックアウトマウスから採取した骨髓細胞に MLL-AF9 を導入して p53 欠失 MLL-AF9 白血病細胞を作製した。この p53 欠失 MLL-AF9 細胞を移植したレシピエントマウスを Decitabine で治療したところ、有意な延命効果を認めた(Figure 7)。

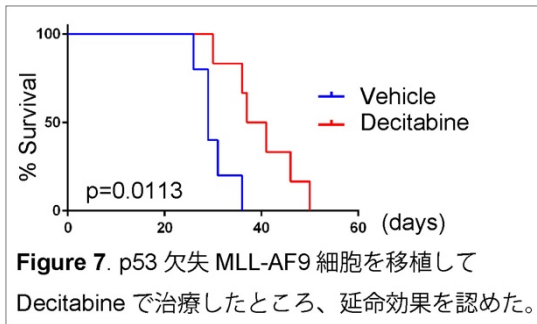


Figure 7. p53 欠失 MLL-AF9 細胞を移植して Decitabine で治療したところ、延命効果を認めた。

また、野生型 MLL-AF9 細胞と p53 欠失 MLL-AF9 白血病細胞を移植競合的に移植し、レシピエントマウスを Decitabine で治療したところ、p53 欠失 MLL-AF9 細胞の増殖が特に強く抑制された。これらの結果は、p53 欠失白血病細胞では Decitabine に対する感受性が亢進していることを示唆しており興味深い。今後 p53 の機能抑制と Decitabine の治療効果との関連を詳細に検討する予定である。

(6) HDAC 阻害剤は TGFβ 経路を活性化し、変異型 ASXL1/SETBP1 導入 MDS 細胞の増殖を抑制する。

我々は以前、変異型 ASXL1/SETBP1 をマウス骨髓細胞に導入して作製した MDS/AML 細胞(cSAM 細胞) では TGFβ 経路遺伝子の発現が下がっていることを明らかにした [Leukemia 29(4): 847-857 (2015)]. 本研究では、TGFβ 経路の強制的活性化により *in vitro* および *in vivo* における cSAM 細胞の増殖が抑制さ

れることを示した。また、TGFβ 経路遺伝子の発現が低下する分子機構として、プロモーター領域のヒストンアセチル化が低下していることを突き止めた。さらに、HDAC 阻害剤 Vorinostat 投与により TGFβ 経路遺伝子の発現が回復すること、cSAM 細胞の増殖が抑制されることを明らかにした(Figure 8)。

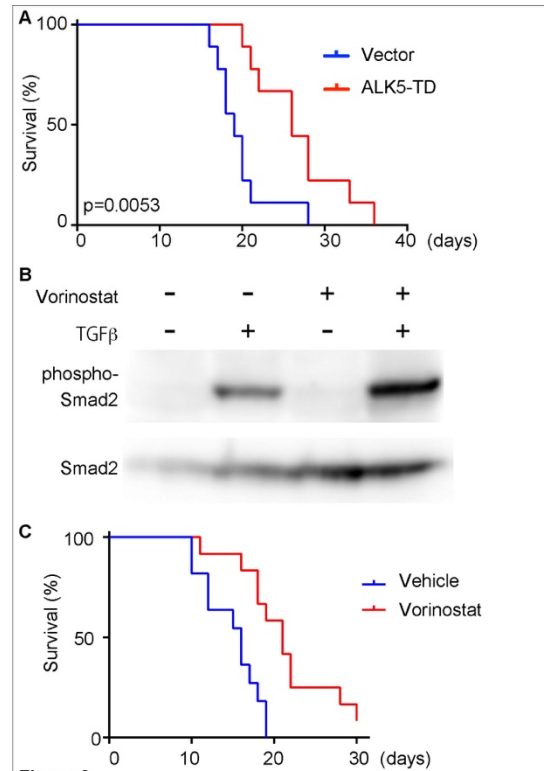


Figure 8. A. cSAM 細胞にベクターもしくは恒常活性化型 ALK5 (ALK5-TG) を導入し、移植した。ALK5-TG を介した TGFβ 経路の人工的活性化により、MDS/AML の発症は遅延した。B. Vorinostat 添加により、cSAM 細胞の TGFβ 刺激に対する反応が上昇した。C. cSAM 細胞を移植したマウスを Vorinostat で治療したところ、延命効果を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Goyama S, Kitamura T. Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: An overview and update 2017. *Cancer Science* 108(4): 553-562 (2017).

[学会発表] (計 4 件)

1. 合山進 『Therapy-resistant myeloid leukemia stem cells.』 *The Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Retreat* (東京、2017)

2. 合山進 『白血病幹細胞の本態』第 19 回新潟血液研究会 (新潟、2017)

3. 合山進、林康貴、劉瀟瀟、四方紫織、田中洋介、福山朋房、山崎智、松本明子、柴田龍弘、北村俊雄 『A p53-MDM2 Interaction Inhibitor, DS-5272, Inhibits the Development of MLL-

Fusion Leukemia with the Assistance of Tumor Immunity』 The 59th American Society of Hematology annual meeting、2017年12月11日 (アメリカ・アトランタ)

4. 合山進 『Tumor suppressor p53 inhibits myeloid leukemogenesis with the assistance of tumor immunity』 Japan Society for the Promotion of Science & National University of Singapore, Joint 2nd symposium、2018年1月20日 (熊本、日本)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合山 進 (Goyama Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：80431849

(2) 研究分担者

北村 俊雄 (Kitamura Toshio)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：20282527

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

林 康貴 (Hayashi Yasutaka)
斎賀 真言 (Saika Makoto)
米澤 大志 (Yonezawa Taishi)
劉 瀟瀟 (Liu XiaoXiao)