

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03560

研究課題名(和文) 難治性白血病モデルを用いた新規標的の診断治療開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis and treatment of novel drug targets using refractory leukemia models

研究代表者

依田 成玄 (Yoda, Akinori)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：70335454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性白血病サンプルをマウスに移植し、患者由来患者腫瘍組織移植モデル(Patient-derived xenografts, PDX)を樹立した。このモデルはがんの遺伝子変異などヒトのがんの特徴を保持している。治療薬候補としてある新規抗がん剤を用いた薬理実験を実施した。標的分子の活性が抑制されているかどうかをリン酸化抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。さらにこのPDXモデルにおいて、薬剤の投与によるマウス生体内での腫瘍の退縮、および、マウスの生存期間の有意な延長を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的薬をはじめとするがんに対する新規治療薬が次々に開発されている。しかしながら、初期治療が有効であっても、多くのがんにおいて耐性が生じ、このことが患者死亡の大きな原因となっている。治療抵抗性の難治性がんの研究は数多くされているが、未だ多くのケースにおいてその分子メカニズムは不明である。治療抵抗性のメカニズムの解明および新たな治療標的分子の同定のための新しい研究アプローチの開発が強く期待されている。本研究により、難治性がんに対する新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established patient-derived xenograft (PDX) models using patient leukemia samples of relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML). PDX models keep original leukemia characteristics including heterogeneous histology, phenotypes and genotypes, and sensitivity of drugs. Treatment of a novel compound showed tumor growth inhibitions and improved survivals in the PDX models. Reduced phosphorylation levels of the targets by the compound were observed in western blot analysis, suggesting an on-target effect of the compound in vivo. These results provide a rationale for a novel therapy in relapsed/refractory AML.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、がん患者由来 cDNA ライブラリーを利用した機能的なスクリーニング方法を開発し、シーケンシングでは同定されなかった急性リンパ性白血病遺伝子 CRLF2 や骨髄異形性症候群遺伝子 GNB1 といった造血器腫瘍の新規がん遺伝子の同定に成功してきた (Yoda, PNAS, 2010; Yoda, Nature Medicine, 2015)。

B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) サンプルを用いた機能的スクリーニングにより、B-ALL の新規がん遺伝子 CRLF2 を同定した。がん変異 CRLF2 F232C を同定し、この変異体が二量体を形成することで恒常的に活性化し細胞をがん化することを明らかにした。また、B-ALL には JAK2 R683 変異が報告されていたが、この変異と CRLF2 の高発現がリンクすることを明らかにした (Yoda, PNAS, 2010; Yoda)。

骨髄系細胞腫瘍サンプル用いたスクリーニングにより、新規がん遺伝子 GNB1/GNB2 を同定した。GNB は三量体 G タンパク質のサブユニットをコードしており、これまでにがん変異は知られていなかった。GNB のがん変異は、骨髄異形成症候群などの造血器腫瘍に多く同定された。GNB 変異体を発現させた骨髄移植実験によりがんモデルマウスを作成し、PI3K/mTOR 阻害剤の *in vivo* におけるがん抑制効果を示した (Yoda, Nature Medicine, 2015)。GNB のがん変異がイマチニブ抵抗性の慢性骨髄性白血病に同定されるなど、分子標的薬耐性の腫瘍に GNB がん変異が存在するケースが複数存在し、実験的にも GNB がん変異が分子標的薬耐性を誘導することを示した。このことは、GNB が治療抵抗性の難治性がんに関与していることを示唆している (Yoda, Nature Medicine, 2015)。

また、この cDNA ライブラリーを用いたがん遺伝子の機能的スクリーニング方法の改良を行った。より少量の RNA からのライブラリー構築を可能にし、効率的にがん遺伝子を同定できるようになった。また、薬剤耐性遺伝子の機能的スクリーニング方法も開発し、実際に、EGFR 阻害剤耐性の細胞株由来ライブラリーより、耐性遺伝子 EGFR T790M 変異をスクリーニングにより同定できた (Shindoh, Yoda, Yoda, PLoS One, 2012)。

これら新規に同定されたがん遺伝子は実際に、クリニカルシーケンスや FACS による造血器腫瘍の診断に利用されており、これらを標的とした創薬研究も行われている。申請者はこれ以外にも、多くのがん遺伝子の機能解析および創薬研究を行ってきており、本研究で行う実験系について十分な経験がある (Wu, Cancer Cell, 2015; Dunford, Nature Genetics, 2017)。

MLL 融合遺伝子 (MLL/AF9) によって誘導された急性骨髄性白血病 (AML) マウスモデルにおいて、治療抵抗性に関与する新規の Gnb2 G77R 変異を同定した。さらに、ヒト AML 患者サンプルにおいて GNB2 が高発現することを示すとともに、ヒト MLL-AML 細胞株の増殖に GNB2 が必要であることも明らかにした。以上の結果は、治療抵抗性を示す MLL-AML において GNB2 が重要な役割を担っていることを示唆している。(Kotani, Yoda, Kon, Kataoka, Leukemia, 2018)。

以上のこれまでの研究をベースにして、GNB 分子に焦点を当て治療抵抗性の難治性がんの研究を行う本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

分子標的薬をはじめとするがんに対する新規治療薬が次々に開発されている。しかしながら、初期治療が有効であっても、多くのがんにおいて耐性が生じ、このことが患者死亡の大きな原因となっている。治療抵抗性の難治性がんの研究は数多くされているが、未だ多くのケースにおいてその分子メカニズムは不明である。治療抵抗性のメカニズムの解明および新たな治療標的分子の同定のための新しい研究アプローチの開発が強く期待されている。

MLL 遺伝子転座を伴う急性骨髄性白血病 (MLL-AML) は強い抗がん剤を用いた治療や骨髄移植をおこなっても再発しやすい治療抵抗性を示し、予後は不良である。MLL-AML の治療抵抗性メカニズムの解明および新たな治療標的分子の同定が強く期待されている。申請者らは治療抵抗性を獲得した MLL-AML モデルマウスを作成し、白血病細胞のゲノム解析により、新規遺伝子変異 GNB2 G77R を同定した。GNB は、3 量体 G タンパク質の サブユニットであり、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の下流で機能するシグナル分子である。本研究では、MLL-AML マウスおよび GNB 遺伝子をモデルとして利用し、難治性がんに対する新規の診断法・治療法の開発システムを構築する。また本研究では、がんの遺伝子変異などヒトのがんの特徴を保持しているモデルである、患者由来患者腫瘍組織移植モデル (Patient-derived xenografts, PDX) を利用した研究も行う。難治性白血病サンプルをマウスに移植することでヒト白血病細胞をマウスに生着させ、この PDX モデルを利用して新規治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) GNB の相互作用分子の同定: GNB と関連する分子の新規会合分子を同定するために、免疫沈降及び質量分析実験を行う。GNB 関連分子と結合する分子の同定に成功した場合は、得られた結合分子について機能的な解析を行う。

(2) GNB の下流シグナルの同定: GNB の下流で活性化しているシグナルを同定するためにリン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の解析を行う。GNB と関連する分子について、その分子及び結合分子のタンパク質リン酸化動態を質量分析により同定する。得られたリン酸化タンパク質について、その機能について検討を行う。

(3) GNB を標的とする阻害剤の探索: 目的によって同定された標的分子に関して、その分子を直接またはそのシグナル経路の阻害剤が利用可能かどうか PDX モデルを利用して検討する。PDX のジェノタイプと薬効との関連について検討し、新規バイオマーカーの探索を行う。

4. 研究成果

(1) GNB の相互作用分子の同定: GNB と関連する分子の新規会合分子を同定するために、免疫沈降及び質量分析実験を行った。GNB 関連分子と結合する分子の同定に成功した。さらに、ウエスタンブロット法により実際に会合していることを確認した。

(2) GNB の下流シグナルの同定: GNB の下流で活性化しているシグナルを同定するためにリン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の解析を行った。GNB と関連する分子について、その分子及び結合分子のタンパク質リン酸化動態を質量分析により同定した。さらに、得られたリン酸化タンパク質の一部はリン酸化特異的抗体が利用可能であることから、これを利用してリン酸

レベルの確認を行った。

(3) GNB を標的とする阻害剤の探索：GNB と関連する分子に関して、その分子を直接またはそのシグナル経路の阻害剤が利用可能かどうか検討を行った。GNB 変異を有する PDX モデルを樹立し、治療薬候補の同定を行う目的でこのモデルを用いた薬理実験を実施した。標的分子の活性が抑制されているかどうかをリン酸化抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。いくつかの PDX モデルにおいて、薬剤の投与により、マウス生体内での腫瘍の退縮が認められた。また、GNB 変異を有する PDX モデルにおいて、薬剤の投与によるマウス生体内での腫瘍の退縮、および、マウスの生存の有意な延長を確認した。

本研究により、難治性がんに対する新規治療法の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ochi Yotaro, Kon Ayana, Sakata Toyonori, Nakagawa Masahiro M, Nakazawa Naotaka, Kakuta Masanori, Kataoka Keisuke, Koseki Haruhiko, Nakayama Manabu, Morishita Daisuke, Tsuruyama Tatsuaki, Saiki Ryunosuke, Yoda Akinori, et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Cohesin?RUNX1 Deficiency Synergistically Perturbs Chromatin Looping and Causes Myelodysplastic Syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 836 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-19-0982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Noriaki, Shigemori Kay, Donaldson Nicholas, Trevisani Christopher, Cordero Nicolas A., Stevenson Kristen E., Bu Xia, Arakawa Fumiko, Takeuchi Mai, Ohshima Koichi, Yoda Akinori, Ng Samuel Y., Weinstock David M.	4. 巻 135
2. 論文標題 Genomic landscape of young ATLL patients identifies frequent targetable CD28 fusions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakiuchi Nobuyuki, et al	4. 巻 577
2. 論文標題 Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1856-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Akio Mizutani, Yotaro Ochi, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, June Takeda, Yasuhito Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel CLK inhibitor targeting myeloid neoplasms with SRSF2 mutation
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Akio Mizutani, Yotaro Ochi, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, June Takeda, Yasuhiro Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel CLK inhibitor targeting myeloid neoplasms with SRSF2 mutation
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Yoda
2. 発表標題 CTX-712, a Novel Clk Inhibitor Targeting Myeloid Neoplasms with SRSF2 Mutation
3. 学会等名 61st American Society of Hematology (ASH 2019) Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Yotaro Ochi, Akio Mizutani, June Takeda, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, Yasuhiro Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel CLK inhibitor targeting myeloid neoplasms with SRSF2 mutation
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Yotaro Ochi, Akio Mizutani, June Takeda, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, Yasuhiro Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel CLK inhibitor targeting myeloid neoplasms with SRSF2 mutation
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Yotaro Ochi, Akio Mizutani, June Takeda, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, Yasuhito Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel CLK inhibitor targeting myeloid neoplasms with SRSF2 mutation
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Yoda, Daisuke Morishita, Yotaro Ochi, Akio Mizutani, Takuto Mori, June Takeda, Hirokazu Tozaki, Yoshihiko Satoh, Yasuhito Nannya, Hideki Makishima, Hiroshi Miyake, Seishi Ogawa
2. 発表標題 CTX-712, a novel splicing modulator targeting myeloid neoplasms
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関