

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04805

研究課題名（和文）難治性白血病の制御機構解明に基づく革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapies for Refractory Leukemia Based on Mechanistic Insights

研究代表者

黒川 峰夫（Kurokawa, Mineo）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では難治性白血病であるEVI1高発現白血病モデルマウスにおけるCCND1およびIFN- γ 経路の意義について詳細な解析を行った。EVI1高発現モデルマウスを活用した実験から、CCND1-IFN- γ -STAT1軸がT細胞の疲弊を介してEVI1高発現白血病の難治性病態に寄与していることが明らかとなった。EVI1高発現白血病細胞においてはCCND1によって発現が促進されるケモカインがこの形質に関与していると考えられ、治療標的となりうるケモカインCCL2の同定にまで至った。本研究を通してEVI1高発現白血病に対する革新的な治療戦略の提唱をするための基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はCCND1-IFN- γ -STAT1軸の異常が腫瘍免疫の異常を誘導しており、これがEVI1高発現白血病の治療標的となりうることを見出した。今後はIFN- γ 、IFN- γ 受容体、STAT1などの欠失マウスを用いて、EVI1高発現白血病をはじめとする難治性白血病における同様の腫瘍免疫の異常が広く急性骨髄性白血病の治療標的となるか検証を行う。本治療戦略が有効な白血病サブタイプの同定を行い、急性骨髄性白血病の新たな治療法の確立を目指す。本研究成果は将来的に、予後不良の難治性白血病患者に対する全く新しい治療法の開発のための基礎的知見の集積に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：We conducted a detailed analysis of the significance of the CCND1 and IFN- γ pathways in a mouse model of difficult-to-treat leukemia with high expression of EVI1. We found that inhibition of CCND1 suppresses proliferation in EVI1-high leukemia, with a more pronounced effect observed in vivo compared to in vitro. Inhibition of CCND1 led to decreased expression of genes involved in chemokine production and interferon response, as well as decreased expression of PD-L1 in EVI1-high leukemia cells. Mice with EVI1-high leukemia treated with inhibitors of CCND1, interferon-gamma receptor, and the downstream signaling hub molecule STAT1 showed delayed onset of the disease. Infiltrating T cells in the spleens of these mice showed reduced exhaustion markers. Combined with the detailed analysis on the related chemokine, our observation indicate that the CCND1-IFN- γ -STAT1 axis contributes to the refractory nature of EVI1-high leukemia via T cell exhaustion.

研究分野：血液内科

キーワード：難治性白血病 EVI1 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ecotropic viral integration site 1(EVI1)は3番染色体長腕3q26に存在し、正常造血においては造血幹細胞の維持に必須の遺伝子である。しかしながら EVI1 遺伝子の高発を認める急性骨髄性白血病(AML)の予後は極めて悪いことが広く知られており、その難治化のメカニズムに関しては不明な点が多い。我々は、マウス AML モデル及び EVI1 高発現ヒト AML サンプルを用いた分子生物学的実験手法を駆使することで、EVI1 高発現 AML の病態およびその治療標的を明らかにすることを試みることにした。

2. 研究の目的

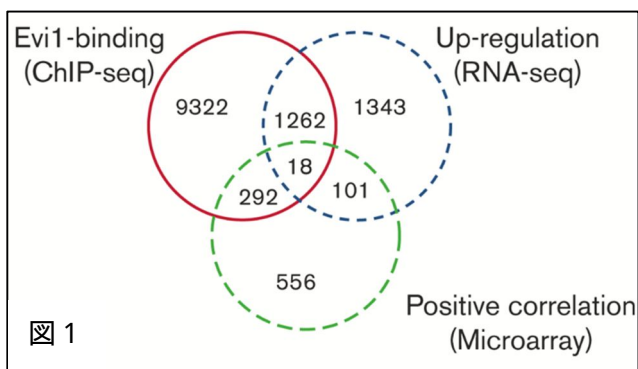
難治性 AML の治療開発では、遺伝子異常の同定に加え、エピジェネティクス、代謝、骨髄造血環境など、難治性病態を形成する異常の相互作用を適切なモデルを用いて明らかにし、治療標的化する必要がある。本研究は特に、最も難治性の白血病サブタイプである EVI1 高発現 AML の発症・難治化機構の解明と新規治療法の開発を中心に、難治性白血病の病態解明と治療標的の探索を行うことを目的とした。本研究を完遂することで、EVI1 高発現の難治性 AML に対する革新的な治療開発の基盤を確立することを目指した。

3. 研究の方法

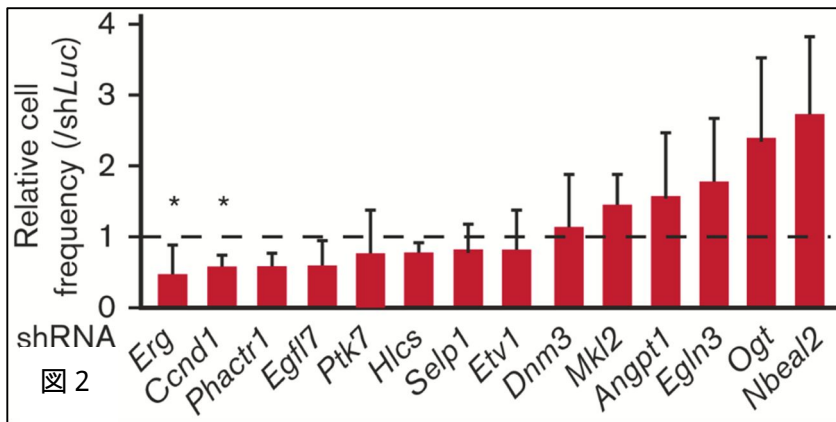
EVI1 高発現 AML 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降法による EVI1 結合部位の網羅的な同定、EVI1 導入マウス造血前駆細胞のトランスクリプトーム解析、EVI1 高発現ヒト AML サンプルにおける EVI1 との発現が相関する遺伝子群などから、EVI1 の真の標的遺伝子を抽出し、ショートヘアピン RNA(shRNA)による機能的な評価を行うことで、EVI1 の生物学的な標的の同定と、その治療標的化を試みた。

4. 研究成果

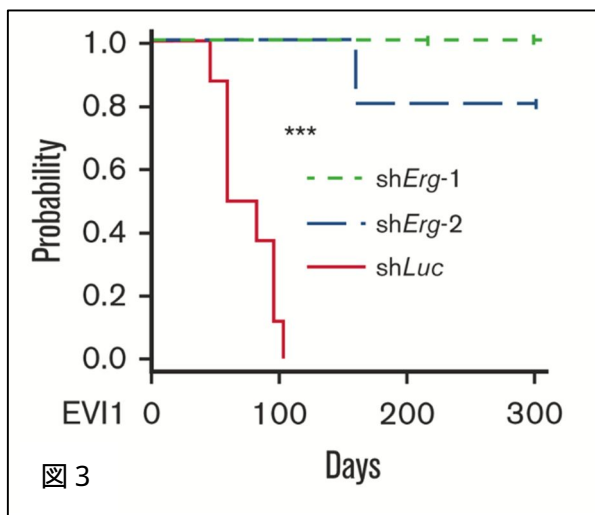
EVI1 高発現 AML 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法による EVI1 結合部位の網羅的な解析、EVI1 導入マウス造血前駆細胞のトランスクリプトーム解析、EVI1 高発現ヒト AML サンプルにおける EVI1 との発現が相関する遺伝子群の全てに当てはまる遺伝子群を抽出したところ、EVI1 高発現 AML の下流標的および治療標的候補として18の遺伝子群が同定された(図1)。



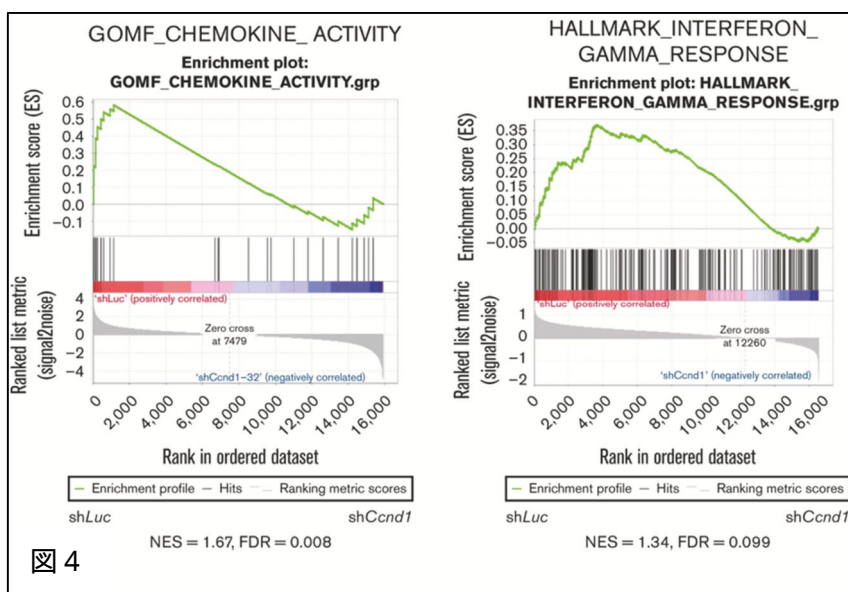
同定された18の遺伝子それぞれについて shRNA を用いた遺伝子ノックダウンを EVI1 高発現マウス AML 細胞において実施し、細胞増殖率を指標にそれぞれの遺伝子の生物学的な重要性に重みづけを行なった結果、EVI1 の真の標的遺伝子として ETS ファミリー転写因子である ERG と、細胞周期制御因子である cyclin D1(CCND1)が同定された(図2)。



In vitro で ERG および cyclin D1 の阻害は EVI1 高発現 AML 細胞の増殖およびコロニー形成活性を抑制したが、in vivo における影響はより顕著で、EVI1 高発現 AML モデルマウスの白血病発症能を損なわせた (図 3)。



Ccnd1 遺伝子サイレンシングを施した EVI1 高発現 AML 細胞のトランスクリプトーム解析では、細胞周期関連遺伝子ではなく、ケモカイン産生やインターフェロン (IFN) への反応に関わる遺伝子のダウンレギュレーションが確認された (図 4)。



Ccnd1 をノックダウン (shCcnd1) した EVI1 高発現 AML 細胞では、I 型および II 型 IFN の主要なシグナルメディエーターである Stat1 だけでなく、Cd274 (PD-L1) の発現が低下していた。それに伴い、EVI1 高発現 shCcnd1 AML マウスの浸潤 T 細胞は、疲弊マーカーの発現が減少していることが示された。EVI1 高発現 AML 細胞における Stat1 と IFN- γ 受容体 IfngR のサ

イレンシングは、in vivo での EVI1 高発現 AML の白血病発症能を低下させ、疲弊 T 細胞を減少させた。ヒト AML のデータでも EVI1 と CCND1 の過剰発現は、IFN- γ シグネチャーとケモカインの発現増加と関連しており、T 細胞における疲弊関連遺伝子の発現増加が見られた。これらのデータは、cyclin D1 が IFN- γ シグネチャーと疲弊した T 細胞の表現型の形成を通じて EVI1 高発現 AML の発症・病態に関与していることを示唆しており、これを標的とすることで難治性病態を克服できる可能性があると考えられた。

引用文献

Blood Adv. 2023 Apr 25;7(8):1577-1593. Yosuke Masamoto, et al.

EVI1 exerts distinct roles in AML via ERG and cyclin D1 promoting a chemoresistant and immune-suppressive environment.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Masamoto Yosuke, Chiba Akira, Mizuno Hideaki, Hino Toshiya, Hayashida Hiroki, Sato Tomohiko, Bando Masashige, Shirahige Katsuhiko, Kurokawa Mineo | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 EVI1 exerts distinct roles in AML via ERG and cyclin D1 promoting a chemoresistant and immune-suppressive environment | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Blood Advances | 6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1593 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008018 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miyuchi M, Sasaki K, Kagoya Y, Taoka K, Masamoto Y, Yamazaki S, Arai S, Mizuno H, Kurokawa M. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 CAMK2G is identified as a novel therapeutic target for myelofibrosis. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Blood Advances | 6. 最初と最後の頁 1585-1597 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003303. | 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 Higo T, Suzuki Y, Sato M, Koya J, Mizuno H, Miyuchi M, Masamoto Y, Kataoka K, Sumitomo Y, Tsuruta-Kishino T, Sato T, Kurokawa M | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Heterozygous Dnmt3a R878C induces expansion of quiescent hematopoietic stem cell pool. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.02.006. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno H, Koya J, Masamoto Y, Kagoya Y, Kurokawa M. | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Evi1 upregulates Fbp1 and supports progression of acute myeloid leukemia through pentose phosphate pathway activation. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 4112-4116 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15098. | 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 Miyachi M, Ito Y, Nakahara F, Hino T, Nakamura F, Iwasaki Y, Kawagoshi T, Koya J, Yoshimi A, Arai S, Kagoya Y, Kurokawa M | 4. 巻 138 |
| 2. 論文標題 Efficient production of human neutrophils from iPSCs that prevent murine lethal infection with immune cell recruitment. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Blood | 6. 最初と最後の頁 2555-2569 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011576. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kurihara Y, Mizuno H, Honda A, Shimura A, Fujioka Y, Maki H, Kurokawa M | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 CCDC88C-FLT3 gene fusion in CD34-positive haematopoietic stem and multilineage cells in myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 journal of cellular and molecular medicine | 6. 最初と最後の頁 950-952 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.17143. | 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 Honda A, Koya J, Yoshimi A, Miyachi M, Taoka K, Kataoka K, Arai S, Kurokawa M | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Loss-of-function mutations in BCOR contribute to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2021.07.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Maki H, Yoshimi A, Shimada T, Arai S, Morita K, Kamikubo Y, Ikegawa M, Kurokawa M | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Physical interaction between BAALC and DBN1 induces chemoresistance in leukemia. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2020.12.003. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Akira Chiba, Toshiya Hino, Hiroki Hayashida, Hideaki Mizuno, Tomohiko Sato, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 EVI1 Promotes Immune-Evasive Microenvironment Via Cyclin D1 in Acute Myeloid Leukemia |
| 3. 学会等名 64th ASH annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masami Ohzu, Kazutoshi Ebisawa, Ken Morita, Yosuke Masamoto, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 Cooperative inhibitory effect of IDH1 mutation and ASXL1 mutation on normal myeloid differentiation |
| 3. 学会等名 64th ASH annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ken Sasaki, Tadayuki Ogawa, Yosuke Masamoto, Hideaki Mizuno, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 Interactions between eIF4B and CAMK2G promote proliferation of malignant cells in myelofibrosis |
| 3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 正本庸介、千葉晶輝、水野秀明、日野俊哉、林田裕樹、黒川峰夫 |
| 2. 発表標題 EVI1はAMLマウスモデルでcyclinD1を介して免疫回避的な微小環境を形成する |
| 3. 学会等名 第84回 日本血液学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐々木謙、小川覚之、正本庸介、水野秀明、黒川峰夫 |
| 2. 発表標題 eIF4BはCAMK2Gと相互作用し、骨髄線維症の進展に寄与する |
| 3. 学会等名 第84回 日本血液学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yosuke Masamoto, Akira Chiba, Toshiaki Takezaki, Hiroki Hayashida, Hideaki Mizuno, Tomohiko Sato, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 EV11-Positive AML Cells Show Distinct Features and High Dependency on ETS Transcription Factor ERG |
| 3. 学会等名 63rd ASH annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hideaki Mizuno, Akira Honda, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 Inpatient Complex Transcriptional Responses to Conventional Chemotherapy in Relapsed Acute Myeloid Leukemia Revealed By Single Cell RNA-Seq Analysis |
| 3. 学会等名 63rd ASH annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ken Sasaki, Tadayuki Ogawa, Hideaki Mizuno, Mineo Kurokawa |
| 2. 発表標題 eIF4B is a novel target of CAMK2G and promotes proliferation of malignant cells in myelofibrosis |
| 3. 学会等名 63rd ASH annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野秀明、本田晃、黒川峰夫 |
| 2. 発表標題 シングルセルRNAシーケンスに基づくAMLの治療反応の多様性 |
| 3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 千葉晶輝、正本庸介、水野秀明、黒川峰夫 |
| 2. 発表標題 正常造血においてGF11はEV11の下流標的である |
| 3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
| | |