

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度  
課題番号：20H05699  
研究課題名：白血病難治性の分子機構解明と新規治療法の開発

研究代表者氏名（ローマ字）：前田高宏（MAEDA Takahiro）  
所属研究機関・部局・職：九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：00791972

研究の概要：

本研究の目的は、白血病難治性の分子メカニズムを解明し、新規治療法開発に向けた知見を創出することである。具体的には1)遺伝子異常と合成致死関係にある遺伝子を同定し、その分子機構を解明する;2)薬剤存在下でスクリーニングを行い、薬剤耐性に関わる遺伝子や、薬剤併用療法の標的となる遺伝子を網羅的に同定する;3)同定分子を標的とした新規白血病治療薬の開発にむけた POC を創出する。

研究分野：血液内科学、腫瘍細胞生物学

キーワード：急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、CRISPR/Cas9 遺伝子編集、TP53、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年のがんゲノム解析により、がん難治性の背景には、細胞および個体レベルでの遺伝子異常があることが明らかとなった。細胞レベルでの難治性を規定する遺伝子異常として、急性骨髄性白血病(AML: acute myeloid leukemia)においては、TP53 の機能欠失型変異、リンパ性白血病 (ALL) においては、フィラデルフィア染色体陰性(Ph-)にもかかわらず、Ph 陽性 ALL に類似した mRNA 発現パターンを示す、いわゆる“Ph-like signature”が代表的であり、なかでも、Ph-like ALL の約 60%でみられる IgH-CRLF2 再構成を有する ALL は極めて治療反応性が悪い。個体レベルでの難治性を規定する要因として、患者個体内での白血病クローンの多様性がある。遺伝子異常の種類が異なる多種のクローンが個体内に存在することで、治療抵抗性クローンの出現頻度が高まる。従って、細胞・個体レベルの遺伝子異常を背景とする白血病の難治性を克服するためには、各クローンの遺伝子背景に則した薬剤選択、多種のクローンをもれなく駆逐するための、薬剤併用療法の“rational design”が必要である。

特定の遺伝子変異をもつがん細胞に特異的な治療標的分子、薬剤耐性因子を網羅的に同定することは、ごく最近まで不可能であった。申請者らは、CRISPR/Cas9 遺伝子改変技術にいち早く着目し、この技術をコーディング、非コーディング領域に応用し、各種のアッセイ系、解析法を開発した。

2. 研究の目的

目的 1：白血病難治性を規定する遺伝子異常と合成致死関係にある遺伝子の同定とその分子機構の解明：TP53 変異 AML、IgH-CRLF2 再構成 ALL 細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 スクリーンを行い、遺伝子異常と合成致死関係にある遺伝子を同定し、その分子機構を CRISPR/Cas9 saturation mutagenesis による機能的アミノ酸残基の同定、proteomics 解析等の手法を用いて解明する。さらに、その機能的、臨床的意義を、1 細胞 RNA/タンパク発現解析、PDX モデル、公的臨床ゲノムデータを用いて検証する。

目的 2：白血病キードラッグに対する耐性機構の解明と、新規併用療法開発に向けた標的分子の同定：各種の抗白血病薬存在下で CRISPR/Cas9 スクリーンを行い、薬剤耐性に関わる分子の同定、薬剤と合成致死関係にある分子を同定する。分子機構、機能的意義の検討は目的 1 と同様に行う。

目的 3：同定分子に対する阻害剤、PROTAC の開発に向けた POC の創出：上記目的で同定した分子を治療標的とする、POC 獲得のため、変異 FKBP12 タグと dTAG 化合物を用いたデグロンによる標的タンパク分解システムを利用する。阻害剤、ケミカルプローブが入手可能であれば、PROTAC 合成をおこなひ、その薬効を評価する

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変技術の進歩により、タンパクをコードする全ゲノムをターゲットとした、細胞の表現系（増殖、分化など）に基づいた責任遺伝子のスクリーニングが可能となった

(Shalem: Science 2014)。従来の siRNA をベースにしたスクリーニングに比べて効率の良い遺伝子改変が起り、次世代シーケンシング技術の発展と相まって、盲目的アプローチによる責任遺伝子の同定が低コストで可能となった。このアッセイ系は、遺伝子の合成致死関係、薬剤耐性遺伝子、薬剤併用療法の標的遺伝子を網羅的、かつ機能的に同定可能なシステムであり、上記研究目的の 1,2 の基盤技術となっている。スクリーニングによって同定した候補分子の機能解析には、一般的な分子生物学的手法に加えて、各種 1 細胞実験系、ヒト化マウスモデルを使用している。研究目的 3 に関しては、dTAG を使用した実験系を使用し、さらに DCPS 阻害剤 RG3039 (Yamauchi; Cancer Cell 2018) をベースとした VHL E3 リガーゼに結合する PROTAC を Yale 大学の Craig Crews 博士らと共同開発する。

#### 4. これまでの成果

##### ■ AML に対する新規薬剤標的分子 PAICS の同定と PAICS 阻害剤の開発

独自に樹立したマウス AML 細胞を使用した全ゲノムスクリーニング法を用いて、AML に対する新規薬剤標的分子 PAICS を同定し、PAICS 欠失による AML 細胞の生存に及ぼす影響を分子細胞学的手法を用いて明らかにした。さらに、英国の LifeArc 社で開発中であった PAICS 阻害剤 (化学構造式は未発表) を入手し、PAICS 阻害剤の *in vitro*, *in vivo* での抗白血病効果を証明した。本研究は 2022 年に *Leukemia* 誌に論文発表した (Yamauchi. *Leukemia*, 2022)。

##### ■ IGH-CRLF2 再構成 ALL の生存に必須の分子経路の同定と新規薬剤併用療法の開発

急性リンパ性白血病 (ALL) においては、フィラデルフィア染色体陰性(Ph-)にもかかわらず、Ph 陽性 ALL に類似した mRNA 発現パターンを示す、いわゆる“Ph-like signature”が最も頻度の高いサブタイプである。Ph-like ALL の約 60% でみられる IGH-CRLF2 再構成を有する ALL は極めて治療反応性が悪く、新規治療法の開発が喫緊の課題である。IGH-CRLF2 再構成を有する ALL 細胞株に対する全ゲノムスクリーニングは、そのレンチウイルスの感染高率の低さから今まで不可能であった。申請者らはフランスのグループとの共同研究で、baboon envelope pseudotyped system を用いることで、世界で初めてスクリーニングに成功した。IGH-CRLF2 ALL 細胞では STAT5 が恒常的にリン酸化していることから、JAK-STAT 系路が細胞の増殖に必要と考えられており、JAK 阻害剤 Ruxolitinib が各種の臨床試験で使用されてきたものの、芳しい結果が得られていない。本スクリーニングより、1) STAT5 はリン酸化しているものの、STAT5 の欠失は細胞生存に影響を及ぼさず、RAS/MTOR 系路が重要である; 2) Ruxolitinib は STAT5 リン酸を抑制するが、IGH-CRLF2 ALL 細胞の増殖抑制効果は限定的である; 3) Ruxolitinib 存在下での CRISPR スクリーンにより、FLT3/CRKL 系路の阻害が RAS 変異がない場合に限って Ruxolitinib の治療効果を増強する; 4) FLT3 阻害剤 Gilteritinib と Ruxolitinib の併用は RAS 野生型の IGH-CRLF2 ALL 細胞に有効である; 5) RAS 変異を有する IGH-CRLF2 ALL 細胞に対しては Gilteritinib と Trametinib の併用が有効であることを発見した。本研究は 2022 年に *Blood* 誌に論文発表した (Sasaki. *Blood*, 2022)。

#### 5. 今後の計画

- ・ TP53 欠損・変異状態と合成致死関係にある因子を同定しており、その分子機構のさらなる解明と、*in vivo* ヒト化白血病マウスモデルを用いて治療薬開発に向けた POC を創出する。
- ・ BCL2 阻害剤の感受性を高めるミトコンドリア局在ユビキチン複合体を同定しており、その基質となる分子、さらにアポトーシス誘導の分子機構のさらなる解明をおこなう。さらに、ユビキチン経路を標的とした薬剤開発を行う。
- ・ ALL 細胞における Dexamethasone の感受性を制御する因子を同定しており、その分子機構を解明する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

s 1. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies rationally designed combination therapies for CRLF2-rearranged Ph-like ALL. Sasaki K, Yamauchi T, Semba Y, Nogami J, Imanaga H, Terasaki T, Nakao F, Akahane K, Inukai T, Verhoeyen E, Akashi K, Maeda T. *Blood*. 2022 Feb 3;139(5):748-760. doi: 10.1182/blood.2021012976. PMID: 34587248.

2. Targeting leukemia-specific dependence on the de novo purine synthesis pathway.

Yamauchi T, Miyawaki K, Semba Y, Takahashi M, Izumi Y, Nogami J, Nakao F, Sugio T, Sasaki K, Pinello L, Bauer DE, Bamba T, Akashi K, Maeda T. *Leukemia*. 2022 Feb;36(2):383-393. doi: 10.1038/s41375-021-01369-0. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34344987.

#### 7. ホームページ等

<https://precision.kyushu-u.ac.jp>