

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04312

研究課題名(和文) NOTCHアゴニスト剤を基軸とする急性巨核芽球性白血病に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic method against acute megakaryoblastic leukemia by NOTCH agonists

研究代表者

大里 元美 (Osato, Motomi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：90314286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：白血病の治療成績は化学療法および造血幹細胞移植により改善されたもののまだ治癒率は50%程度であり副作用も多く新規治療法の開発が必要である。本研究は急性巨核芽球性白血病の分子機序解明とそれに基づく分子標的治療法の開発を目指し研究を行った。次世代シーケンス法によりNOTCH系遺伝子の機能消失変異が急性巨核芽球性白血病に多いことを見だし、NOTCHアゴニスト剤PEITCによる薬効を検討したところ強力な細胞死誘導効果を確認した。NOTCHアゴニスト剤は極めて有望な新規薬剤候補と考えられるので今後臨床応用にむけてさらなる開発を続けてゆく予定である

研究成果の概要(英文)：The genetic lesions that drive acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) have not been fully elucidated. To search for AMKL genes, an AMKL mouse model was developed employing retroviral insertional mutagenesis (RIM) on the mouse carrying alterations in two known AMKL genes, Gata-1 and Runx1. RIM screening identified genetic abrogations in Notch and JAK-STAT pathways. Extending these findings in mouse to human, we performed targeted deep sequencing in 34 AMKL patient samples and 8 AMKL cell lines, and detected genetic mutations in Notch and JAK-STAT pathways. NOTCH activator, but not inhibitor, and JAK inhibitor significantly suppressed AMKL cell proliferation by inducing apoptosis individually as a single agent and synergistically as a combination therapy. Notably, this Notch activation is induced in a ligand-independent manner, revealing a novel mechanism that holds a potential of therapeutic application for AMKL.

研究分野：総合生物

キーワード：分子標的治療 癌 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

血液のがん-白血病に対する治療成績は化学療法および造血幹細胞移植(骨髄移植)によりかなり改善されたものの、依然として治癒率は50%程度であり、大量の抗がん剤使用による副作用も大きな問題である。一方で、白血病発症分子機序に基づく分子標的治療[慢性骨髄性白血病に対するイマチニブ、前骨髄球性白血病に対するレチノイン酸(ATRA)など]は、ほぼ100%に迫るかのような劇的な奏効率と、化学療法のそれと比べるとほとんど問題にならない程度の副作用で治療現場を大きく変えた。これらの分子標的療法は、白血病の分子機序の解明 またその結果に基づく分子標的の同定が大事であることを改めて示してくれた。しかし、多くの白血病の分子機序は未だ解明されていない。

急性巨核芽球性白血病は21番染色体トリソミーで起こる先天性異常ダウン症候群において高頻度に見られることが知られている(Osato&Ito, Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2005)。従って、ダウン症候群に関連する急性巨核芽球性白血病には21番染色体上に位置するRUNX1遺伝子のコピー数増加の関与が疑われており、申請者はこれまでRUNX1過剰発現トランスジェニック(RUNX1 Tg)マウスを作製するなどしてこの白血病の研究を行ってきた(Yanagida, Osato et al., Oncogene 2005)。RUNX1遺伝子は巨核球・血小板分化に関わることも良く知られている(Wang, Osato et al., Cell Reports 2014)。

2. 研究の目的

本研究は、急性巨核芽球性白血病の分子機序解明とそれに基づく分子標的治療法の開発を目指し、特に下記の2点を本研究の目的とした。

1) マウスモデルと次世代シーケンスを用いた急性巨核芽球性白血病の主要遺伝子変異(ドライバー変異)の同定(予備的実験によりNOTCH系の機能消失変異を同定している)

2) NOTCHアゴニスト剤を基軸とする急性巨核芽球性白血病に対する新規治療法の開発

3. 研究の方法

1) 急性巨核芽球性白血病の主要遺伝子変異の同定

a) マウスモデルによる候補遺伝子の同定
ダウン症候群関連急性巨核芽球性白血病においては、21番染色体トリソミーに加え、血球分化に関わる転写因子GATA1遺伝子の変異も発症に関与することが知られている。この2つの遺伝子異常に加えてさらなる遺伝子異常(サードヒット)が白血病発症には必要なことが臨床例の解析などにより知られている。Gata1遺伝子変異を、Gata1遺伝子の発現量が正常コントロールに比べ5%しか発現しないGata1.05マウスで模倣し、RUNX1 Tgマウスと交配することで既知の2つの遺伝子異常を導入し、さらに未知のサードヒット遺伝子異常をランダムな付加の変異導入の可能なレトロウイルス挿入変異法を用いることで、急性巨核芽球性白血病マウスモデルの作製を試みた。

b) 次世代シーケンスによりヒト白血病サンプルで遺伝子変異を検索
実際の白血病サンプル34例と細胞株8種について次世代シーケンス法を用い遺伝子変異を網羅的に検索した。Discovery cohort と

して6例の発症時と寛解時の対となるサンプルのある例についてexome sequencingによる検討を行った。この結果などに基づき600個の白血病関連遺伝子を選び、かつマウスモデルの結果より重要と思われたNOTCH系およびJAK/STAT系遺伝子群については検出感度を上げるべくシーケンスの実験デザインを施した上でTargeted deep sequencingをPrevalence cohortとして行った。同定された遺伝子変異はSanger sequencing法により確認した。同一症例より臨床的寛解時のサンプルがある場合(paired cases)は、変異の有無を比べることでsomatic変異であることも確認した。

c) 主要遺伝子変異(ドライバー変異)と言えるだけの生物学的影響があるかの実験的検証

興味深い遺伝子変異(NOTCH変異など)については、これらをretroviral vectorを用いてマウス骨髄細胞へ導入し、その生物学的影響を*in vitro*の細胞培養系を用いて検討した。

2) NOTCHアゴニスト剤を基軸とする急性巨核芽球性白血病に対する新規治療法の開発

a) *in vitro*細胞培養系による検討

複数のNOTCHアゴニスト剤(PEITC, S1P剤、抗体)を検討し、アゴニスト剤単剤およびJAK-STAT阻害剤との併用による細胞増殖抑制効果を検討した。液体培養にくらべ半固形培地は白血病幹細胞分画に対する薬剤効果を評価しやすいため半固形培地による薬剤感受性の検討も行った。

b) *in vivo* xenograftマウスモデル系を用いた検討

急性巨核芽球性白血病細胞をNSGマウスなどの免疫不全マウスに接種し*in vivo* xenograftマウスモデル系としたうえで、*in vitro*で薬効の見られた候補薬剤についてその*in vivo*に於ける細胞増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

1) 急性巨核芽球性白血病の主要遺伝子変異の同定

a) マウスモデルによる候補遺伝子の同定

既知の2つの急性巨核芽球性白血病責任遺伝子変異を導入したRUNX1 Tg; Gata1.05マウスにさらにレトロウイルス挿入変異法を行ったマウスは12匹中5匹(42%)が、巨核芽球マーカー(cKit+CD41+CD61+)陽性、形態的に巨核芽球の特徴であるcytoplasmic blebを持つ白血病を発症した。野生型のコントロールマウス群ではこのタイプの白血病は見られなかった。レトロウイルス挿入変異法の有用な点は、白血病発症に関わった遺伝子異常を簡便で迅速な方法により同定できることである。この方法により同定した遺伝子変異を調べると、Notch1およびJak/Stat系の変異と総括されるIfngr2、RorcがRUNX1 Tg; Gata1.05マウスに多く見られることが分かった。

b) 次世代シーケンスによりヒト白血病サンプルで遺伝子変異を検索

図1に示すようにヒト急性巨核芽球性白血病サンプルにおいてもNOTCH系およびJak/Stat系の遺伝子変異が多く同定された。

c) 主要遺伝子変異(ドライバー変異)と言えるだけの生物学的影響があるかの実験的検証

NOTCH系の機能消失変異がドライバー変異である可能性が示されたので、その逆の状態を

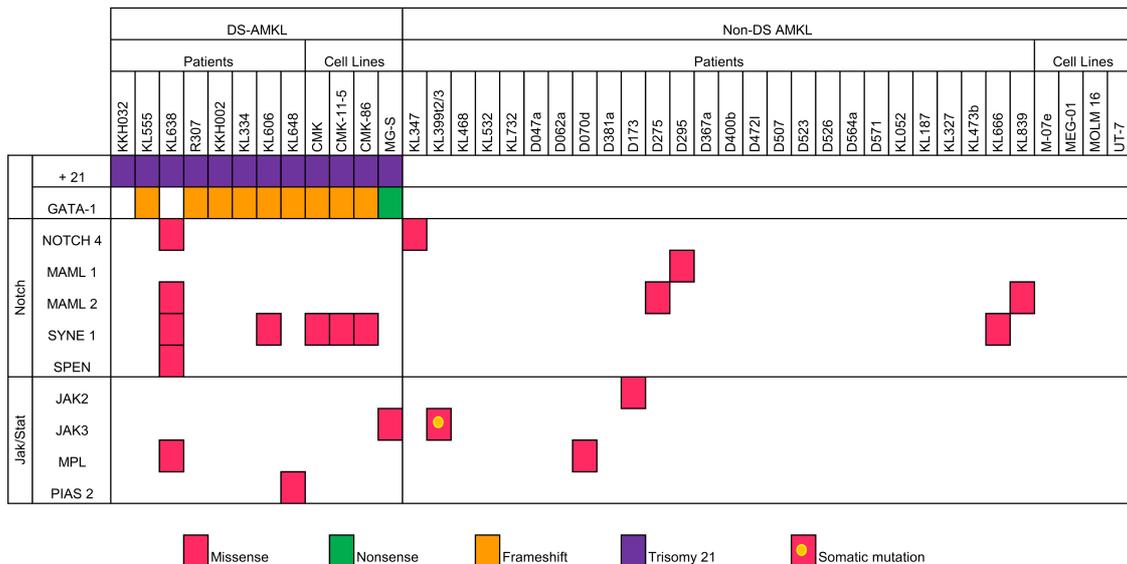


図1 ヒト急性巨核芽球性白血病サンプルにおける遺伝子変異

付加するために活性化型 NOTCH1 を急性巨核芽球性白血病細胞株に導入したところ著明な細胞増殖抑制効果、細胞死誘導が観察された。

2) NOTCH アゴニスト剤を基軸とする急性巨核芽球性白血病に対する新規治療法の開発

a) *in vitro* 細胞培養系による検討
 マウスモデルおよび次世代シーケンスにより示唆され生物学的影響を実験的に確認されたドライバー変異としてNOTCHの機能消失変異が同定された。従って、種々のNOTCH アゴニスト剤の8種類の急性巨核芽球性白血病細胞株に対する薬効を検討したところ、PEITC という薬剤が全ての細胞株に対し細胞増殖抑制効果を示した。またこれはNOTCH系の活性化を介して細胞死が誘導されていることを確認した。

PEITC がどのようにNOTCH系を活性化するのかを検討するために発現マイクロアレイなどを用いて詳細に調べたところ、スフィンゴシン1リン酸S1Pによるリガンド非依存的なNOTCH活性化であることが示唆された(図2)。

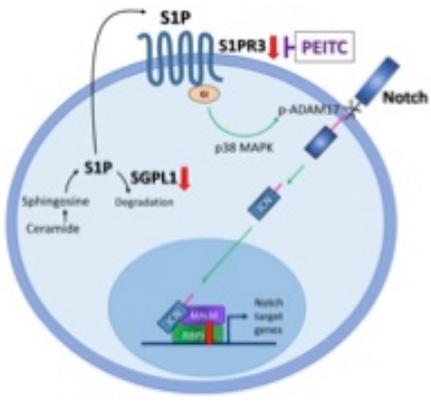


図2 急性巨核芽球性白血病におけるNOTCH機能消失変異とS1P-S1PR3 axisによるリガンド非依存性NOTCH系活性化メカニズム

S1P 関連薬剤は既に臨床で自己免疫疾患の治療などに用いられている。PEITC やS1P 関連薬剤などは今後急性巨核芽球性白血病の治療にも適応される可能性があり、その臨床応用が期待される。

また急性巨核芽球性白血病細胞株に対する抗体を抗体ライブラリーより検索したところ非常に強力な増殖抑制効果をもつ抗体を新たに同定した。これらの液体培養でみられた細胞増殖に対する抑制効果は半固形培地においてさらに明瞭に観察された。

b) *in vivo* xenograft マウスモデル系を用いた検討

急性巨核芽球性白血病細胞株に対し *in vitro* で増殖抑制効果を示した抗体について *in vivo* xenograft マウスモデル系を用いてその薬効を検討した。抗体を投与しないマウスにおいては骨髄・脾臓・肝臓への多数の白血病細胞浸潤を認めたが、抗体投与マウスにおいては全くみられず、*in vivo* においても大変強い薬効を持つことが確認された。今後、臨床応用に向けて、この抗体のヒト化や親和性改善のため antibody crafting mutagenesis を行ってゆく予定である。

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)

3年間の本研究助成中に本研究に関連した論文を28報発表し学会発表を筆頭演者として18回行った。これらの詳細は年度毎の実績報告書に記載してある。下記には主要な発表論文、学会発表のみを挙げる。

[雑誌論文] (計 7 件)

①Wang CQ, Mok MM, Yokomizo T, Tergaonkar V, Osato M*. (*corresponding author) Runx Family Genes in Tissue Stem Cell Dynamics. Adv Exp Med Biol. 査読有、2017;962:117-138. doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_9

② Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, Kohu K, Voon DC, Hiai

H, Unno M, So JB, Zhu F, Srivastava S, Teh M, Yeoh KG, Osato M*, Ito Y*. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. *Gastroenterology*. 査読有、2017 Jan;152(1):218-231. e14. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.018

③ Chin DW, Sakurai M, Nah GS, Du L, Jacob B, Yokomizo T, Matsumura T, Suda T, Huang G, Fu XY, Ito Y, Nakajima H, Osato M*. RUNX1 haploinsufficiency results in granulocyte colony-stimulating factor hypersensitivity. *Blood Cancer J*. 査読有、2016 Jan 8;6:e379. doi: 10.1038/bcj.2015.105

④ Chin DW, Watanabe-Okochi N, Wang CQ, Tergaonkar V, Osato M*. Mouse models for core binding factor leukemia. *Leukemia*. 査読有、2015 Oct;29(10):1970-80. doi: 10.1038/leu.2015.181

⑤ Koh CM, Bezzi M, Low DH, Ang WX, Teo SX, Gay FP, Al-Haddawi M, Tan SY, Osato M, Sabò A, Amati B, Wee KB, Guccione E. MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature*. 査読有、2015 Jul 2;523(7558):96-100. doi: 10.1038/nature14351

⑥ Koh CP, Ng CE, Nah GS, Wang CQ, Tergaonkar V, Matsumura T, Yokomizo T, Suda T, Osato M*. Hematopoietic stem cell enhancer: a powerful tool in stem cell biology. *Histol Histopathol*. 査読有、2015 Jun;30(6):661-72. doi: 10.14670/HH-30.661

⑦ Wang CQ, Chin DW, Chooi JY, Chng WJ, Taniuchi I, Tergaonkar V, Osato M*. Cbfb deficiency results in differentiation blocks and stem/progenitor cell expansion in hematopoiesis. *Leukemia*. 査読有、2015 Mar;29(3):753-7. doi: 10.1038/leu.2014.316

[学会発表] (計 3 件)

① 大里元美、急性巨核芽球性白血病に対する新規治療法、2018年1月26日、第22回造血器腫瘍研究会、横浜シンポジア(神奈川県・横浜)

② 大里元美、スフィンゴシン1リン酸 S1P によるリガンド非依存性 NOTCH 活性化を介した白血病治療、2017年7月14日-16日、第12回スフィンゴセラピー研究会、能登ロイヤルホテル(石川県・羽咋)

③ Osato M. A novel treatment and prevention for acute megakaryoblastic leukemia in Singapore and Malaysia, AIMST International Conference on Non-Communicable Diseases, 2017年11月28日-30日、Kedah (Malaysia)

[その他]
ホームページ等

Identification of Gastric Stem Cells in Mice
<http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/publications/2017/01/identification-of-stem-cells-in-the-epithelium-of-the-stomach-corpus-and-antrum-of-mice.html>

Mouse models for core binding factor leukemia
<http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/publications/2015/07/mouse-models-for-core-binding-factor-leukemia.html>

Cbfb knockout mice
<http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/publications/2015/03/cbfb-knockout-mice.html>

Hematopoietic stem cell enhancer
<http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/publications/2015/01/hematopoietic-stem-cell-enhancer.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大里 元美 (OSATO, Motomi)
熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授
研究者番号：90314286

(2)研究分担者

横溝 智雅 (YOKOMIZO, Tomomasa)
熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員
研究者番号：80590314