

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09938

研究課題名(和文) 中枢神経白血病に対するエピジェネティック療法の開発

研究課題名(英文) Development of epigenetic therapies for CNS leukemias

研究代表者

古川 雄祐 (Furukawa, Yusuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00199431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の治療成績は未だ不良で、新たな治療戦略が必要とされている。とくに予後の悪化に直結する中枢神経再発を予防・治療する分子標的薬は高い有用性が期待される。最近、申請者らはヒストン脱メチル化酵素LSD1がT-ALL発症のドライバー遺伝子であることを見いだした。そこで理化学研究所・梅原崇史博士との共同研究によって新規のLSD1阻害薬を多数合成、T-ALLに対する有効性をスクリーニングし、臨床応用レベルの効果と特異性・安全性を有する化合物を同定した。LSD1阻害剤は経口投与が可能で、かつCNS移行の良好なものが多く、T-ALLの治療に高い優位性を有すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規LSD1阻害剤S2157は、T-ALLに対して臨床応用可能なレベルの力価を有し、今まで治療が困難とされてきたCNS病変に対しても有効である可能性が示された。現在、T-ALLに対する分子標的薬として臨床応用されているものではなく、LSD1阻害剤はその第1号として既存の治療戦略への組み込みが期待される。

研究成果の概要(英文)：Treatment outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is still worse than that of other hematologic malignancies. Despite the fundamental role of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in T-cell leukemogenesis, conventional LSD1 inhibitors, such as tranylcypromine (TCP), were shown to be ineffective for T-ALL cells in several preclinical studies. We therefore modified TCP to develop novel LSD1 inhibitors with higher activity and specificity for T-ALL. One of the newly developed inhibitors, S2157, showed robust cytotoxicity against TCP-resistant T-ALL cells both in vitro and in xenotransplanted mice. Notably, S2157 could eradicate CNS leukemia because of its ability to efficiently pass through the blood-brain barrier. This brain-permeable LSD1 inhibitor is promising as a novel therapeutic agent for T-ALL with CNS involvement.

研究分野：血液内科学

キーワード：分子標的療法 LSD1阻害剤 急性Tリンパ性白血病 中枢神経白血病 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) の中で、T細胞由来の T-ALL は小児で 15%、成人で 25% を占める。近年、集学的治療によって治療成績は改善しつつあるが、B-ALL に比較するとまだ充分とは言えない。JALSG でまとめた我が国における成人 T-ALL の集計によると、1990 年から 2001 年に治療した 66 例の 5 年生存率は 35% であり、同時期に治療した Ph 陰性 B-ALL と比べて劣っていた (Yanada et al. Leuk. Res. 31: 907, 2007)。とくに中枢神経 (CNS) 病変の存在は重大な予後不良因子であり、診断時に CNS 病変を有する症例の 5 年生存率は 0% であった。また T-ALL においては CNS 再発のリスクも高く、放射線照射・methotrexate/Ara-C/hydrocortisone の髄注・大量 methotrexate/Ara-C 療法による予防が行われるが、それでも約 10% の頻度で CNS 病変は出現する。CNS 再発をおこした患者の 5 年生存率はやはり 0% である (Blood 109: 944, 2007)。

それまで ALL の中で最も予後が不良であった Ph 陽性 B-ALL の治療成績が imatinib の併用によって劇的に改善したように (Yanada et al. JCO 24: 460, 2006)、T-ALL の治療戦略にも分子病態に立脚した新規薬剤の導入が必須と考えられる。その際に考慮すべき条件として、1) T-ALL 治療の key drug である cyclophosphamide・Ara-C・L-asparaginase・ステロイド剤の効果を増強すること、2) 中枢神経移行が良好で、CNS 病変に有効であること、3) 経口投与も可能であること、の 3 点が挙げられる。申請者は LSD1 阻害剤がこの 3 つの条件を満たしており、T-ALL に対する新規分子標的薬の有力な候補である基礎的知見を得ている。

LSD1 (lysine-specific demethylase 1) は FAD を補因子とするヒストン脱メチル化酵素で、histone H3-lysine 4 (H3K4) と histone H3-lysine 9 (H3K9) を基質とし、context-dependent に転写制御を行っている。LSD1 は造血幹細胞の自己複製・分化に不可欠で、とくに Hox 遺伝子群の制御に重要な役割を果たすことが知られている (Tsai et al. Science 329: 689, 2010 ほか)。そこで LSD1 の発現を種々の血液細胞でスクリーニングしたところ、正常造血前駆細胞に比べ急性白血病とくに T-ALL において強発現していた。LSD1 強発現が T-ALL 発症の原因となっていることを確認するため、LSD1 を造血幹細胞特異的に強発現するトランスジェニック・マウスを作製した。このマウスにおいては、造血幹細胞の自己複製亢進が認められたが、分化能は正常に保たれており、前白血病性幹細胞 (pre-leukemic stem cell) の状態と考えられた。実際、1 年半以上観察しても、白血病の発症や造血障害は見られなかった。そこで放射線照射を行ってみると、野生型に比べ高率かつ早期に T-ALL を発症した。発症した腫瘍には T-ALL で最も高頻度に見られる Notch1 遺伝子の点突然変異が検出された。以上より、LSD1 は造血幹細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その発現異常は 1 次的遺伝子異常 (1st hit) として前白血病性幹細胞の形成に関与することが明らかになった。そこに Notch 遺伝子変異などの 2nd hit が加わると T-ALL が発症すると考えられる (Wada et al. Blood 125: 3731, 2015)。この結果は LSD1 が T-ALL の早期発見と発症予防さらには治療の標的分子として臨床応用できる可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究は上記の成果を発展させ、T-ALL とくに CNS 病変の治療への応用が可能なレベルの新規治療薬を開発しようとするものである。具体的には、理化学研究所・梅原崇史博士と共同で LSD1 を特異的に阻害する新規化合物を創成し、*in vitro* でのスクリーニングの後、マウス T-ALL モデルを用いて臨床応用レベルの有効性・安全性の確認を行い、とくに CNS 病変に効果を有する LSD1 阻害剤の開発を試みた。現在、T-ALL に対する分子標的薬として臨床応用されているものではなく、LSD1 阻害剤はその第 1 号として、既存の治療戦略への組み込みが期待される。また LSD1 阻害剤は中枢神経移行の良好なものが多く、現在有効な対策に乏しい CNS 再発予防や治療への応用も期待される。また経口での bioavailability が高いのも特徴で、経口薬としての持続的な投与も可能と考えられ、多様な臨床展開に耐えられる薬剤として開発を進める。

3. 研究の方法

1) LSD1 は FAD (フラビン) 依存的にヒストン H3-Lys4/9 のアミノ基を酸化して脱メチル化を行う。FAD との結合により LSD1 活性を競合的に阻害する低分子化合物を多数合成、T-ALL 細胞に対する効果を *in vitro* でスクリーニングした。

2) 引き続き、マウス白血病モデルを用いて *in vivo* における薬効と安全性の検証を行った。マウス白血病モデルとして、luciferase 遺伝子を導入した細胞株を免疫不全マウスに経静脈的に移植する xenograft T-ALL model を用いた。

3) LSD1 阻害剤を T-ALL 細胞に作用させた際に発現が変動する遺伝子を次世代シーケンシング (RNA-Seq) にて網羅的に解析し、抗白血病作用のエフェクター分子をスクリーニングした。

4) LSD1 阻害剤と既存の抗がん剤とくに T-ALL 治療の key drug である cyclophosphamide・Ara-C・ステロイド剤との相乗効果について isobologram 法を用いて解析した。

4. 研究成果

1) T-ALL に有効な新規 LSD1 阻害剤のスクリーニング

これまで前臨床研究に頻用され、commercial に入手可能である tranilcypropromine・RN-1・OG-L002 の造血器腫瘍に対する殺細胞効果について細胞株を用いてスクリーニングしたところ、急性骨髄性白血病や多発性骨髄腫に比べ T-ALL に対して高い効果を有することがわかった。しかしながら IC₅₀ は 5~10 μM であり、臨床応用レベルに達していなかった。そこで tranilcypropromine を改変して LSD1 阻害活性と特異性を増強した S2101 およびその誘導体 4 種類を用いて同様の実験を行った。その結果、S2116 と S2157 の 2 つが T-ALL に対し臨床応用可能なレベルの IC₅₀ (1~5 μM) を有することが確認できた (特許申請済: WO/2019/009412)。

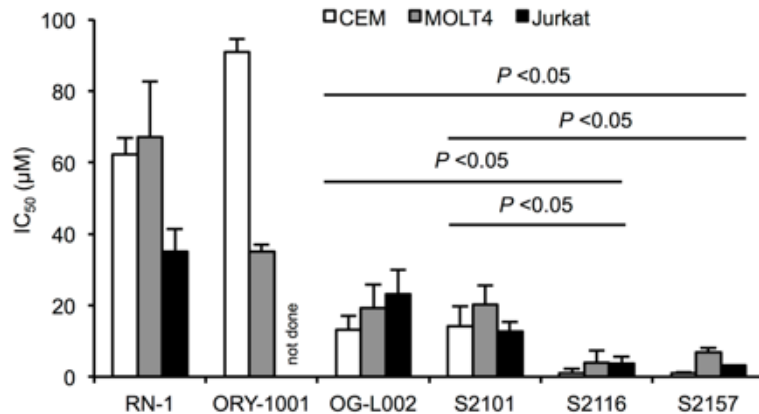


図1 LSD 阻害剤の T-ALL 細胞下部に対する殺細胞効果の比較

2) マウス T-ALL モデルを用いた *in vivo* における有効性と副作用の確認

NOD-SCID マウスの尾静脈から luciferase 遺伝子を組み込んだ T-ALL 細胞株 MOLT4-Luc を移植し、体内動態を非観血的にモニターすることが可能なマウス T-ALL モデルを作製した。T-ALL の生着を確認した後 (Day 0)、S2157 を 30mg/kg ないし 50mg/kg で週 2 回腹腔内に投与したところ、量依存性に腫瘍の増殖抑制が観察され、生存率も有意に改善した (図 2)。

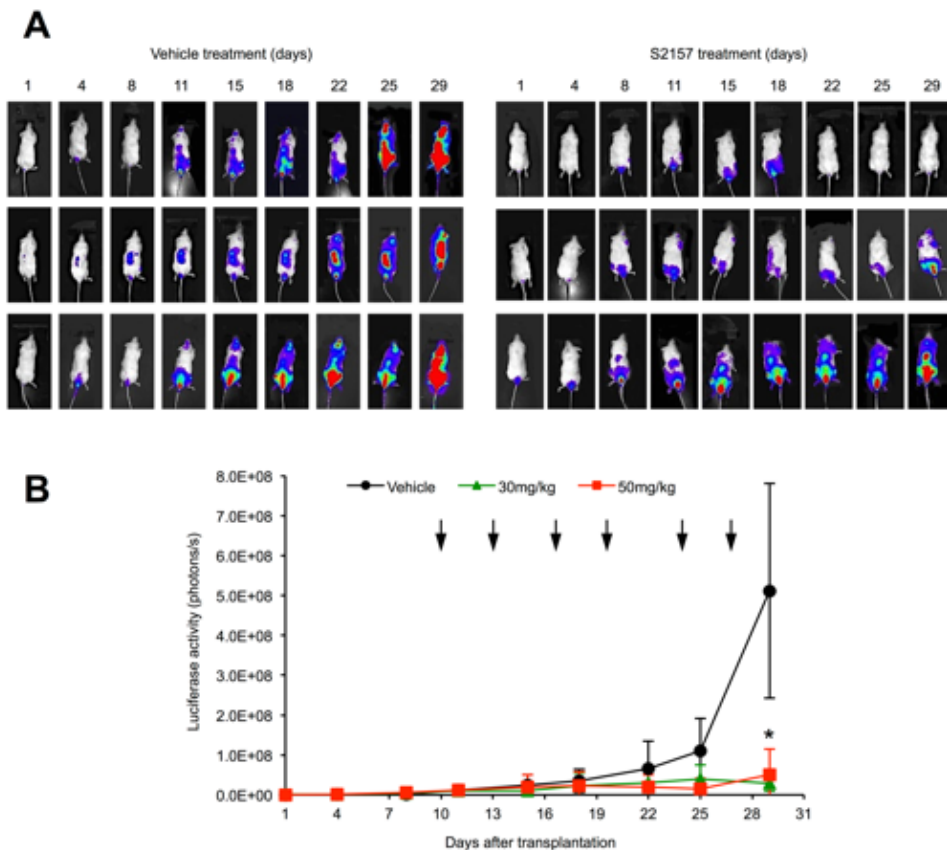


図2 マウス T-ALL モデルにおける新規 LSD1 阻害剤 S2157 の有効性

Day 21 にマウスの脳を摘出し、病理組織検査を行ったところ、S2101B 投与群において CNS に浸潤した腫瘍細胞がアポトーシスを起こしていることが確認された (図3)。

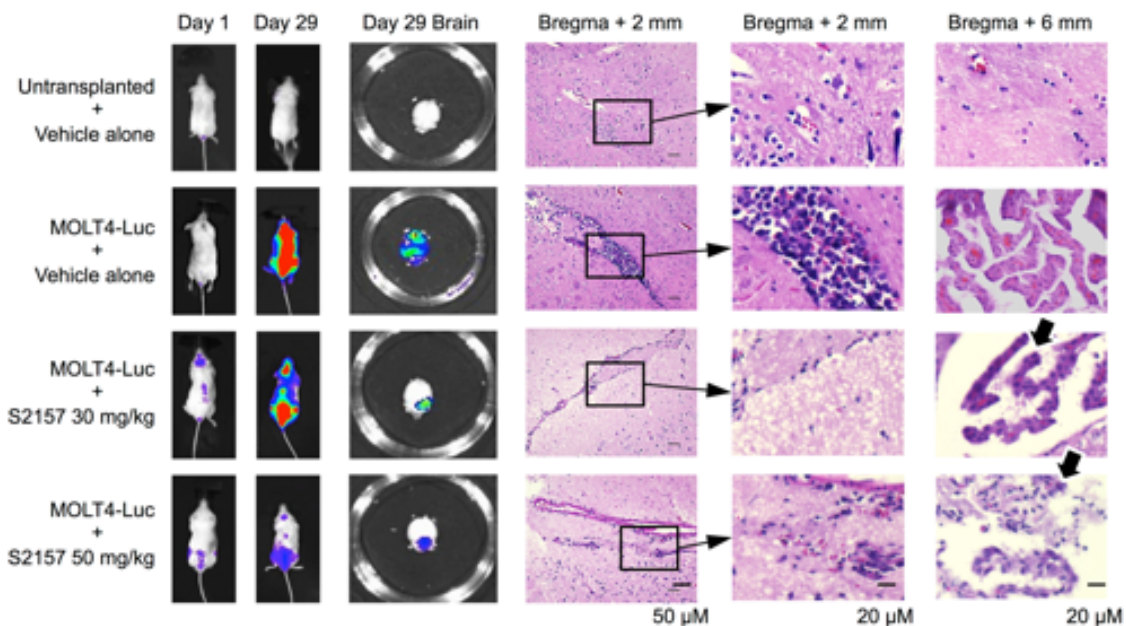


図3 新規 LSD1 阻害剤の中中枢神経白血病に対する効果

3) LSD1 阻害剤の T-ALL に対する作用機序の解明

LSD1 阻害剤が Notch1 シグナル伝達経路を抑制する可能性についてマイクロアレイ解析を行って確認したが、HES1・CYLD・GATA3・RUNX3 等の Notch1 標的遺伝子の抑制は観察されなかった。すなわち今回合成した新規の LSD1 阻害剤は、Notch1 シグナルを介さずに T-ALL に殺細胞効果を発揮する可能性が示唆された。そこで他の T-ALL 関連遺伝子について調べたところ、NOTCH3・TAL1・c-MYB の発現が抑制されていた (図4)。この3つが LSD1 阻害剤の標的分子であることを確認するため、T-ALL 細胞株にそれぞれを強発現したところ、殺細胞効果が有意に抑制された。

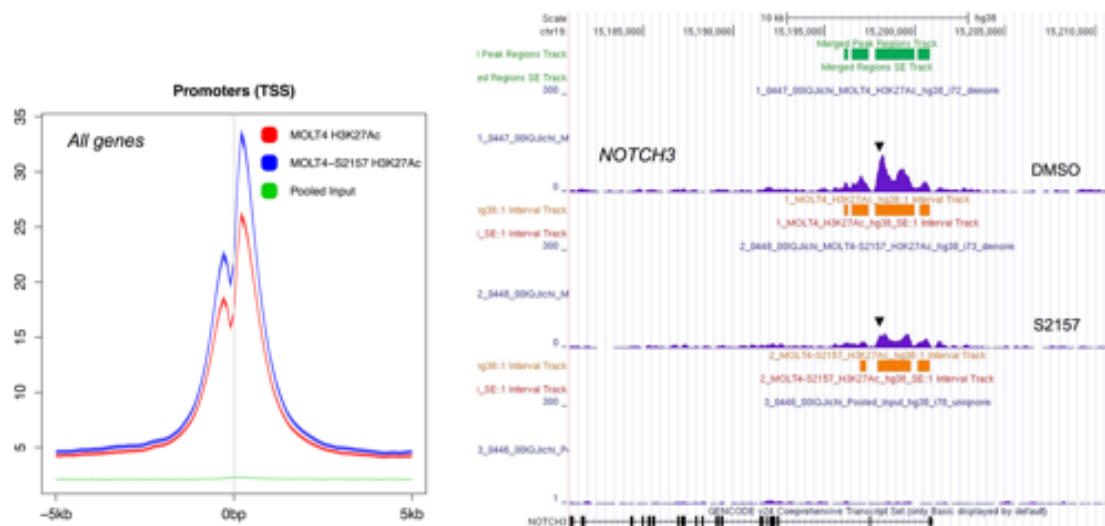


図4 新規 LSD1 阻害剤による NOTCH3 遺伝子の転写抑制

4) 新規 LSD1 阻害剤と既存の T-ALL 治療薬の併用効果の解析

S2157 と 4-OHCY・Ara-C・dexamethasone の併用効果を isobologram 法にて解析したところ、S2157 と dexamethasone が最も強い相乗効果を示した。マウス T-ALL モデルにおいても S2157 と dexamethasone の併用により、単剤投与と比較して有意の生存期間の延長が確認された (図5)。

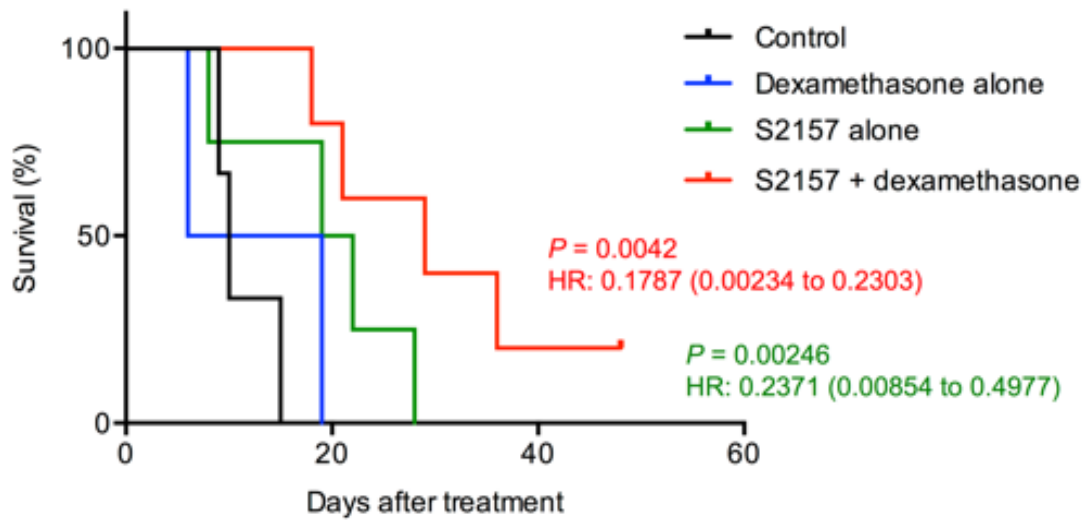


図5 T-ALL モデル・マウスに対する治療効果

今回の研究で同定した新規 LSD1 阻害剤 S2157 は、T-ALL に対して臨床応用可能なレベルの力価を有し、今まで治療が困難とされてきた CNS 病変に対しても有効である可能性が示された。引き続き、ラットおよび非齧歯類動物（イヌ・サル）を用いた安全性試験と薬物動態試験を実施して非臨床 POC を取得し、GMP 基準での化合物の製造に関する具体的方針を固めて、近い将来に臨床試験へ展開することが可能なレベルの基礎データを取得する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Saito Shiori, Kikuchi Jiro, Koyama Daisuke, Sato Shin, Koyama Hiroo, Osada Naoki, Kuroda Yoshiaki, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Umehara Takashi, Furukawa Yusuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Eradication of central nervous system leukemia of T-cell origin with a brain-permeable LSD1 inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1601-1611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-0919	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 Wada Taeko, Kikuchi Jiro, Koyama Daisuke, Honda Hiroaki, Furukawa Yusuke	4. 巻 82
2. 論文標題 Lysine-specific demethylase 1 accelerates oncogenesis in p53 heterozygous mice via transcriptional repression of the residual Trp53 allele	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 29 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2019.05.008	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 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Umehara Takashi, Sato Shin, Urabe Masashi, Abe Tomoyuki, Hayashi Nakanobu, Sugitani Masahiko, Hanazono Yutaka, Furukawa Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Lysine-specific demethylase 1 inhibitors prevent teratoma development from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 6450-6462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24030	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 Kikuchi Jiro, Hori Mitsuo, Iha Hidekatsu, Toyama-Sorimachi Noriko, Hagiwara Shotaro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Suzuki Atsushi, Furukawa Yusuke	4. 巻 34
2. 論文標題 Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 180 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0525-6	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 Suzuki Atsushi, Kakugawa Satoshi, Miyoshi Masafumi, Hori Mitsuo, Suzuki Kenshi, Furukawa Yusuke, Ohta Kensuke	4. 巻 35
2. 論文標題 Soluble SLAMF7 is a predictive biomarker for elotuzumab therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-0860-7	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 Nagamachi Akiko, Kikuchi Jiro, Kanai Akinori, Furukawa Yusuke, Inaba Toshiya	4. 巻 105
2. 論文標題 Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions affects growth of neighboring blood cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.232959	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 Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Osada Naoki, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Kawase Takakazu, Ichinohe Tatsuo, Furukawa Yusuke	4. 巻 78
2. 論文標題 Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1766 ~ 1778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-2446	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 Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Furukawa Yusuke	4. 巻 107
2. 論文標題 Cell adhesion-induced phosphorylation and inactivation of EZH2 confer drug resistance to acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2376-0	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 Furukawa Yusuke, Kikuchi Jiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 496-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02829-6	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 リジン特異的脱メチル化酵素 1 阻害活性を有する新規化合物、その製造方法及びその用途	発明者 梅原崇史ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/025702	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

http://www.jichi.ac.jp/laboratory/molecula/stem/index.html http://kyouingyousekidb.jichi.ac.jp/profile/ja.19723c1b44620901.html http://www.jichi.ac.jp/stem/index.html

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
連携研究者	梅原 崇史 (Umehara Takashi) (20415095)	理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニット・リーダー (82401)	