

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07780

研究課題名(和文) 白血病の遺伝子パネル検査とシグナル蛋白解析を統合した分子標的薬感受性検査法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeted drug sensitivity tests that integrate gene panel testing and signaling protein analysis for leukemia

研究代表者

東田 修二 (TOHDA, Shuji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞の遺伝子変異の情報、白血病細胞の培養系を用いた細胞レベルでの薬剤の効果、薬剤が細胞に曝露された時の細胞内シグナル蛋白レベルでの解析結果を統合した検査法を開発した。さらにこの検査法を用いて、新規の分子標的薬の候補となる低分子化合物の探索した。この3年間に4編の英文原著論文を発表した。1) SIRT1活性化剤のNOTCHとNF- κ Bシグナルの抑制を介したTリンパ芽球性白血病細胞の増殖抑制、2) メトホルミンのAXL受容体の発現を抑制した骨髄性白血病細胞の増殖抑制、3) HOXA9阻害剤の急性骨髄性白血病細胞の増殖抑制、4) TYR03ノックダウンによる骨髄性白血病細胞の増殖抑制

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、急性白血病では遺伝子パネル検査は行われておらず、使用できる分子標的薬もごく限られている。一方、固形がんでは、遺伝子パネル検査が保険診療でも行われているが、パネル検査で得られた遺伝子変異の情報が、分子標的薬の効果予測に直ちに結びつくわけではない。遺伝子変異の情報、培養系を用いた細胞レベルでの効果、細胞内シグナル蛋白レベルでの解析結果を統合した本研究の成果は、効果予測能力の高い薬剤感受性検査法の確立の足がかりとなるとともに、本研究を通じて新たな分子標的薬の候補を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：We have developed drug sensitivity tests that integrate information on genetic mutations in leukemia cells, the effects of drugs at the cell level using a cell culture system, and the analysis of the intracellular signaling proteins in cells exposed to drugs. Furthermore, using this method, we searched for low-molecular-weight compounds that are candidates for new molecular-targeted drugs. In the last three years, I have published four original articles. 1) Sirtuin 1 activation suppresses the growth of T-lymphoblastic leukemia cells by inhibiting NOTCH and NF- κ B pathways. 2) Metformin suppresses the growth of leukemia cells partly through downregulation of AXL receptor tyrosine kinase. 3) Effects of HOXA9 inhibitor DB818 on the growth of acute myeloid leukaemia cells. 4) TYR03 knockdown suppresses the growth of myeloid leukaemia cells.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：薬剤感受性検査 分子標的薬 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性白血病に対する従来型の抗がん剤治療の成績は頭打ちであり、各症例ごとの分子病態に応じた分子標的治療が必要である。肺がんや大腸がんなどの固形がんでは、遺伝子パネル検査が保険診療でも行われ、さまざまな分子標的治療薬が用いられているが、急性白血病では遺伝子パネル検査は行われておらず、使用できる分子標的薬もごく限られている。一方、パネル検査で得られた遺伝子変異の情報が、分子標的薬の効果予測に直ちに結びつくわけではなく、新たな薬剤感受性検査法の確立が必要である。

私はこれまでに、白血病の分子病態の解明、新たな遺伝子検査法の開発、分子標的薬の候補となる増殖シグナルの探索、そのシグナル阻害剤の効果を予測する検査法の開発を行ってきた。こうした経緯から、これまでの研究成果を統合し発展させて、新たな標的薬感受性検査法の開発を目指した。

2. 研究の目的

白血病に対する分子標的薬の効果の予測能力の高い薬剤感受性検査法を新たに開発することが本研究の目的である。そのため、白血病細胞の遺伝子変異の情報だけでなく、白血病細胞の培養系を用いた細胞レベルでの薬剤の効果、薬剤が細胞に曝露された時の細胞内シグナルの蛋白レベルでの解析結果を統合した検査法を開発する。さらにこの統合的な検査法を用いて、新規の分子標的薬の候補となる低分子化合物の探索を行うことも研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) 検体：急性白血病由来の細胞株、および、研究利用の同意を得た白血病患者の血液検体の残余から分離した白血病細胞を用いる。

2) 遺伝子変異解析：次世代シーケンサと白血病関連遺伝パネルキットを用いて、各白血病細胞検体における変異遺伝子の検索を行う。

3) 分子標的薬の候補(シグナル阻害剤)の細胞増殖に対する効果：標的薬となりうるシグナル阻害剤を添加して白血病細胞を培養し、細胞増殖、アポトーシスや分化の誘導を評価して、阻害剤の効果を判定する。

4) 阻害剤によるシグナル伝達蛋白の解析：阻害剤添加によるシグナル蛋白の発現や活性(リン酸化や切断による活性化など)をイムプロット法を中心とした方法で解析する。

5) 阻害剤の効果の分子生物学的機序の検討：阻害剤の効果をより詳細に解析するため、マイクロアレイ解析で、阻害剤添加に伴う網羅的な遺伝子の発現の変化を調べる。さらに、その阻害剤の on-target 作用として効果が現れたことの確認として、阻害剤の標的蛋白を産生する遺伝子をノックダウンして、同じ効果が得られるかを確認する。

6) 総括：上記で得られた知見を統合して、統合的で効果予測能力の高い薬剤感受性検査法を構築するとともに、新たな分子標的薬の候補となる低分子化合物を探索する。

4. 研究成果

この3年間に当研究室で行なった研究成果をもとに4編の英文原著論文を発表した。なお、臨床応用に結びつく検査法の開発や薬剤探索には、白血病患者検体を用いた実験結果が重要であるが、これはまだ途上で、まとまった結果が得られていないため、下記の論文内容は白血病細胞株を材料としたものである。また、遺伝子変異解析は、当ラボで樹立した細胞株についてはすでに実施済みの全エクソン解析の結果を利用している。世界で広く用いられている細胞株については公開されているデータを用いた。また、上記4編以外にMYC阻害剤の白血病細胞の増殖抑制効果に関する論文が出版準備中である。

以下、4編の英文原著論文の概略を記載する。

1) SIRT1 活性化剤は NOTCH と NF- κ B シグナルの抑制を介して T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する

白血病細胞の培養系に SIRT1 阻害剤や SIRT1 活性化剤を添加し、あるいは、SIRT1 をノックダウン、もしくは強制発現させて、細胞増殖やシグナル蛋白への効果を観察した。T リンパ芽球性白血病細胞株では SIRT1 の活性化剤や強制発現により細胞増殖が抑制した。これらによる NOTCH1、NF- κ B、mTOR シグナルの抑制がその機序であると考えられた。急性骨髄性白血病細胞には効果はなかった。

2) メトホルミンはチロシンキナーゼ活性を持つ AXL 受容体の発現を抑制して骨髄性白血病細胞の増殖を抑制する

糖尿病薬であるメトホルミンを白血病細胞の培養系に添加すると細胞増殖が抑制することを見出した。メトホルミンが mTOR 蛋白を阻害することは知られていたが、これ以外に AXL 受容体の発現とそのリン酸化を抑制し、その下流のシグナル伝達蛋白である STAT3 のリン酸化を抑制することにより、白血病細胞の増殖を抑制すると考えた。また、メトホルミンは、AXL とファミリーを形成する TYRO3 や MERTK 蛋白のリン酸化も抑制し、これも増殖抑制に関与すると考えた。

3) HOXA9 阻害剤は急性骨髄性白血病細胞の増殖を抑制する

次世代シーケンサ解析の結果より、*HOXA9* 遺伝子発現を増強させる遺伝子変異を持つ 3 種の急性骨髄性白血病細胞株を選んだ。また、比較のために、この遺伝子変異のない細胞株 8 種と研究利用の承諾を得た健常人のリンパ球を対照として用いた。細胞の培養系に *HOXA9* 阻害剤 DB818 を添加し、あるいは、*HOXA9* 遺伝子を siRNA を用いてノックダウンさせて、細胞増殖やシグナル蛋白への効果を観察した。*HOXA9* タンパクを高発現する 3 種の AML 細胞株では、DB818 処理や *HOXA9* ノックダウンにより細胞増殖が抑制し、アポトーシスが誘導された。また、*HOXA9* の下流のあるシグナル伝達蛋白の抑制が、免疫プロット法によって確かめられた。よって、これらの効果は *HOXA9* シグナルの抑制がその機序であると考えた。

比較対照である他の細胞株への DB818 処理や *HOXA9* ノックダウンの効果は弱く、健常人のリンパ球の有意な抑制はみられなかった。これらより、*HOXA9* 阻害剤は白血病に対する新たな分子標的薬の候補となりうることを明らかにし、事前に遺伝子解析をして、*HOXA9* の発現を亢進させる変異を見出すことはコンパニオン診断検査となりうるということがわかった。また、ここで用いた培養法は、この薬剤の感受性検査として利用できることがわかった。

4) TYR03 のノックダウンは骨髄性白血病細胞の増殖を抑制する

TYR03 を高発現をしている 3 種の白血病細胞株に対して、*TYR03* を選択的に阻害する低分子化合物が存在しないため、small interfering RNA を導入して *TYR03* をノックダウンすると、細胞増殖が抑制された。抑制の分子機序として、網羅的遺伝子発現解析や免疫プロット解析を行い、*TYR03* ノックダウンにより、ERK や STAT3 のリン酸化が抑制され、MYC や Survivin の発現が減少した。この事実は、*TYR03* は新たな分子標的治療の標的分子となりうることを示し、白血病細胞における *TYR03* の mRNA や蛋白の発現解析が、その感受性を予測しうる検査法となる可能性を示した。

以上の知見より、白血病に対する新たな分子標的薬となりうる化合物を見出した。また、これらの効果を予測するために、どのような、遺伝子レベル、細胞レベル、蛋白レベルの情報が有用であるかを示し、新たな薬剤感受性検査法の足がかりを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 SONODA YURI、 ITOH MAI、 TOHDA SHUJI	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of HOXA9 Inhibitor DB818 on the Growth of Acute Myeloid Leukaemia Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1841 ~ 1847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14950	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 OKASHA SALWA M.、 ITOH MAI、 TOHDA SHUJI	4. 巻 40
2. 論文標題 Sirtuin 1 Activation Suppresses the Growth of T-lymphoblastic Leukemia Cells by Inhibiting NOTCH and NF- B Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14297	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 Saito Tatsuya、 Itoh Mai、 Tohda Shuji	4. 巻 94
2. 論文標題 Metformin suppresses the growth of leukemia cells partly through downregulation of AXL receptor tyrosine kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 106383 ~ 106383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.leukres.2020.106383	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 SAITO TATSUYA、 ITOH MAI、 TOHDA SHUJI	4. 巻 42
2. 論文標題 <i>TYR03</i> Knockdown Suppresses the Growth of Myeloid Leukaemia Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1757 ~ 1761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15652	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤千紗, 伊藤真以, 東田修二
2. 発表標題 NOTCH阻害剤SAHM1のTリンパ球性白血病細胞の増殖に対する効果
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園田由莉, 伊藤真以, 東田修二
2. 発表標題 HOXA9阻害剤による白血病細胞株の増殖抑制作用
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤真以, 東田修二
2. 発表標題 白血病細胞の増殖におけるレニン・アンジオテンシン系の作用と治療への応用
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口琴未, 東田修二, 伊藤真以
2. 発表標題 c-MYC阻害剤の白血病細胞の増殖に対する効果
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤千紗、東田修二、伊藤真以
2. 発表標題 NOTCH阻害剤IMR-1AのTリンパ芽球性白血病細胞の増殖に対する効果
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

臨床検査医学分野 http://www.tmd.ac.jp/med/mlab/mlab-J.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
研究協力者	伊藤 真以 (ITOHI Mai)		
研究協力者	斎藤 達也 (SAITO Tatsuya)		
研究協力者	サルワ ムハンマド (Salwa Mohammad)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	園田 由莉 (SONODA Yuri)		
研究協力者	伊藤 千紗 (ITO Chisuzu)		
研究協力者	野口 琴美 (NOGUCHI Kotomi)		

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