

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461420

研究課題名(和文)造血器悪性腫瘍共通発症機構の解明とそれに基づいた抗癌剤開発

研究課題名(英文)Elucidating common oncogenic pathway and generating anti-cancer agents

研究代表者

上久保 靖彦 (Kamikubo, Yasuhiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60548527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くの白血病が、因子AとB、及びCにより制御されていることを解明した。Aを制御可能な抑制剤Dなどを作成した。抑制剤Dは、ピトロ、ピボモデルにおいてPhALL(TKI耐性)、MLL-AF4+FLT3-ITDマウスモデルでは、既存のTKI抵抗性を克服し、現在臨床におけるKey Drugより大幅なSurvivalの改善を認めた。固形腫瘍では、EGFR抑制剤抵抗性肺癌、Her2陽性胃癌マウスモデルでの治療でも劇的なSurvivalの改善を認めた。これをもとにスーパーコンピューターシミュレーションによる低分子化合物構造の同定を行い、候補コンパウンドHITを取得した。それを用いた実験を展開する

研究成果の概要(英文)：I have elucidated that transcription factor A and its co-factor B are required for almost all leukemogenesis. It is quite important findings to isolate one of the best targets for leukemia therapy. I have generated novel anti-leukemia drugs D which extend the life spans of mice models such as PhALL(T3151) and MLL-AF4+FLT3-ITD dramatically, suggesting the transcription factor A is novel pro-oncogenic factor for leukemogenesis. On the other hand, Solid tumors such as EGFR Inhibitor resistant NSCLC, Her2 positive gastric cancer, neuroblastoma were also down-regulated by drug D in xeno-grafted mice models. We have already isolated several small molecules(HITS) through Super-computational simulation(MD)

研究分野：血液・腫瘍学

キーワード：白血病 低分子化合物 転写因子創薬 担癌マウスモデル 肺癌 胃癌

1. 研究開始当初の背景

白血病・悪性リンパ腫など造血器悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（以後 CML: BCR-ABL 白血病）に対するチロシンキナーゼ阻害剤（以後 TKI）、急性前骨髄急性白血病（以後 APL）に対する ATRA や亜ヒ素に代表される個別化された分子標的療法の開発がなされてきたが、白血病及びリンパ腫は多彩な染色体転座により発症する疾患であるため、新規分子標的薬開発はその後停滞傾向にあることは否めない。また固形腫瘍においてもその腫瘍幹細胞は組織によりバラエティーに富んでいるため、多種固形癌に奏功する抗癌剤の開発は極めて難しい。そこでメチレーション阻害剤 (5AZA) や HDAC 抑制剤などエピジェネティック制御を志向した薬剤開発がなされてきたが、未だ疾患の根治には結びついていない。

癌遺伝子 C-Myc は正常細胞において、細胞内で活性化しているほとんど全ての遺伝子へ移動し可変抵抗器のように生理的範囲内で遺伝子増幅させるが、一方腫瘍細胞では高発現 C-Myc が腫瘍細胞内で発現増強されている全ての遺伝子のエンハンサー、プロモーターの一定モチーフに結合し、その遺伝子発現をさらに増強する機構が見いだされている。多彩な癌腫で活性化する Ras Gene Module(古典的 Ras-MAPK 経路, JAK-STAT 経路, PI3-AKT 経路, NFκB 経路等: 以後 RGM)はそのエフェクターの一つである C-Myc や NFκB を誘導するため、C-Myc を上流より抑制する薬剤は、腫瘍高発現遺伝子群を包括的に抑制可能であることから次世代創薬と考えられている。

また、RGM 系-C-Myc, NFκB, mTOR 経路などは Hypoxia Inducible Factors (以後 HIFs) を誘導し、ほぼ全ての腫瘍における腫瘍ニッチ共通の Hypoxia Signature(低酸素状態)を整えて腫瘍増殖における好環境を整える。それに対して mTOR 抑制剤などが考慮されているが依然解決には至っていない。

2. 研究の目的

TKI 耐性 CML、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病:以後 Ph1ALL など融合遺伝子 BCR-ABL による難治性白血病や、ATRA (ベサノイド) や As2O3(亜ヒ素)耐性 APL、難治性 Mixed Lineage Leukemia: 以後 MLL 白血病は現状の薬剤には抵抗性が強く、骨髄移植療法が必須となるが根治率は十分ではない。また固形腫瘍に奏功する抗癌剤は未だ存在しない。そのためより安全で副作用のない強力な抗癌剤の開発が望まれている。

申請者が世界で最初に提唱した CBF(コアバインディングファクター) 白血病新規発症機構 (RUNX1-HAT コンプレックス強抑制非依存性白血病発症機構) は、従来の発症機構 (RUNX1-HAT コンプレックス強抑制的白血病発症機構) とは大きく異なりきわめて独創的であり、最近急速に認知されつつある。

それに基づいた「RUNX1-HAT コンプレックス抑制コンセプト」は、下流のエフェクター C-Myc や NFκB を効率的に抑制することが可能である、様々な難治性白血病、固形腫瘍、その腫瘍ニッチ共通低酸素機構に対する次世代最有力治療戦略の一つになることが期待されている。

本研究では

○各種白血病における RUNX1-HAT コンプレックスの白血病及び各種固形腫瘍における重要性の解明

○RUNX1-HAT コンプレックス抑制による造血器悪性腫瘍 RAS Gene Module (RGM) 抑制プロファイルの解明

○造血器悪性腫瘍共通治療薬候補としての RUNX-HAT 阻害剤開発

○腫瘍共通ニッチ(低酸素環境)機構の解明を中心に新規エピジェネティック薬剤開発及び独創的治療戦略提唱することを研究目的とする。

3. 研究の方法

Project1: 白血病発症機構におけるエピジェネティクス修飾機構の解明

Project2:

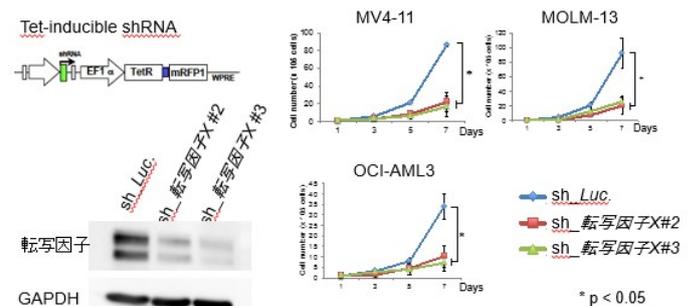
人工遺伝子スイッチ法を用いた悪性腫瘍共通治療薬候補としての RUNX 類縁転写因子阻害剤開発

Project3: スーパーコンピュータ京を用いたシミュレーション創薬: 新規低分子の開発

4. 研究成果

RUNX 類縁転写因子 (転写因子 X) の Conditional shRNAi 結果

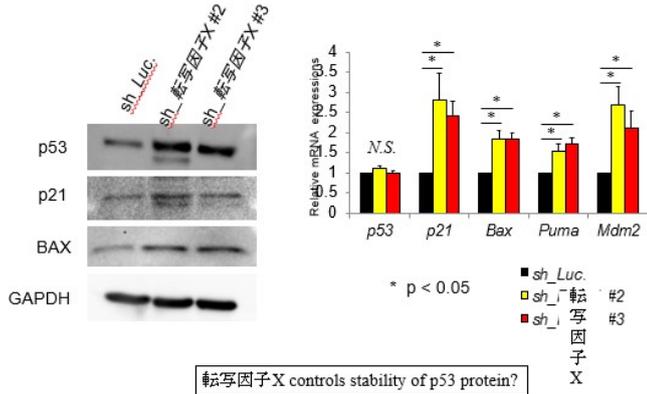
転写因子X knockdown exerts anti-proliferative effect on AML cells.



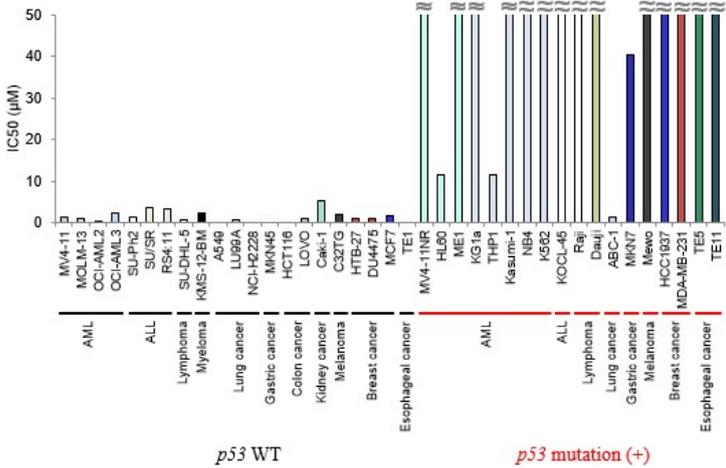
評価したすべての白血病及び固形腫瘍で、腫瘍増殖は著しく抑制された。また、その抗腫瘍活性の原因が何か検討したところ、p53 が安定化し、その下流の細胞周期制御因子及びアポトーシス因子が転写レベルで活性化していたことから、本抗腫瘍活性は、p53 経路依存的であることが判明した。そのため p53 にミューテーションがあったり、p53 が欠失している癌腫には、抗腫瘍活性がない。この p53 安定化機構をさらに検討したところ、p53 抑制因子である、BCL11 や TRIM24 が転写因子 X により制御されていることが示された。すなわち転写因子 X が転写レベルで BCL11 及び TRIM24 を正に制御しているため、転写因子 X のダウンレギュレーションにより、

BCL11 及び TRIM24 が抑制され、p53 が安定化されることが判明した。それにより各種癌腫共通に抗腫瘍活性が惹起される。

転写因子X inhibition activates p53 pathway.



X-PIP exerts strong antitumor effect against various types of cancers

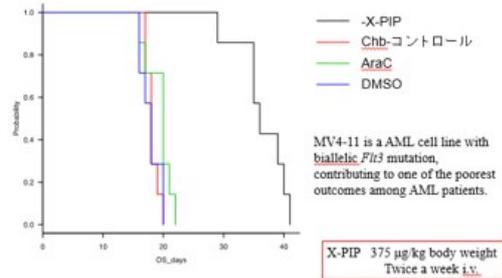


白血病: PhALL、CML、MLL-ALL、MLL-AF4-AML、CBF 白血病 (RUNX-ETO、Cbfβ-SMMHC)、MDS 由来 AML、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫肺癌 (非小細胞性肺癌: 腺癌、大細胞がん、扁平上皮癌)、Her2 胃癌、スキルス胃癌、大腸癌、皮膚がん (メラノーマ)、膀胱癌、腎がん、卵巣がん、乳癌パネル

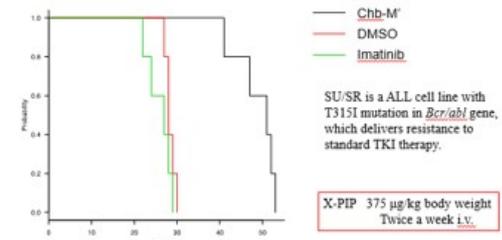
下記にその IC50 計測 (腫瘍抑制効果) を示す。p53 がワイルドタイプであれば、ほぼ全ての癌腫は抑制される。

X-PIP による生体内効果を検討した。

Acute myeloid leukemia model with MV4-11



Acute lymphoblastic leukemia model with SU/SR



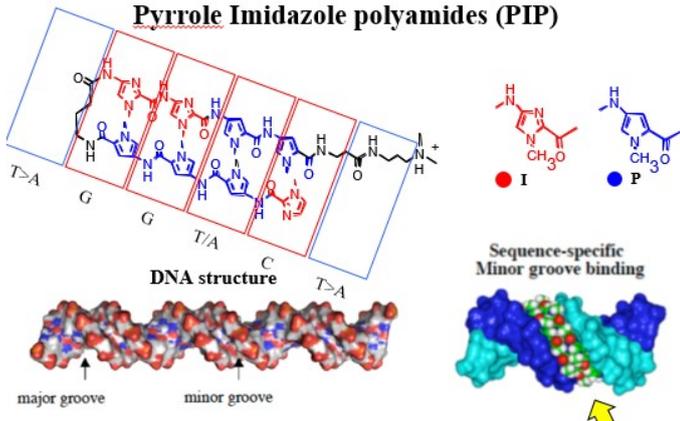
MLL-AML+FLT3-ITD (骨髄移植しても 5 年生存率 20%以下の超難治性白血病) にて、現在臨床で使用されている Cytarabine より抗腫瘍活性は優れており、生存率は大幅に改善した。TKI (チロシンキナーゼ阻害剤) 耐性 PhALL マウスモデルでは、TKI (イマチニブ投与) 群の生存期間は延長しなかったが、X-PIP 投与群では劇的に生存期間は延長したことから、X-PIP は、既存薬より効果が大であることが示唆され、おまけに TKI 耐性を「克服していることが示唆された。

固形腫瘍マウスモデルの検討を行った。EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ) 耐性肺癌の移植モデルでは、ゲフィチニブ投与群は全く生存期間を延長しないが、X-PIP 投与群では、延長されたことから、ゲフィチニブ耐性を克服していることが示唆された。

また Her2 阻害剤耐性胃癌の移植モデルでは、X-PIP 投与により劇的な腫瘍抑制効果を示し、Her2 阻害剤耐性を克服していることが示唆された。

このことから転写因子 X は、様々な癌促進因子を転写レベルで正に制御していることがビトロ、ビボ両方で示唆された。

Pyrrole Imidazole polyamides (PIP)

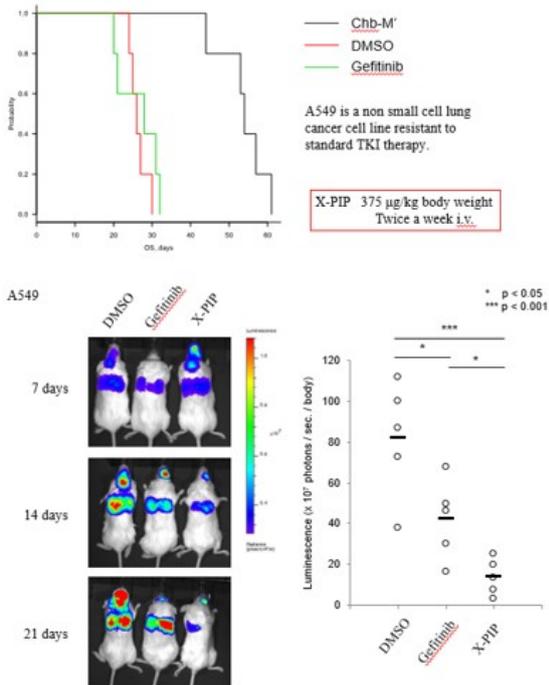


転写因子 X が結合するコンセンサス配列に結合し、その遺伝子クラスターを負に制御可能な人工転写因子を開発した。(上図)

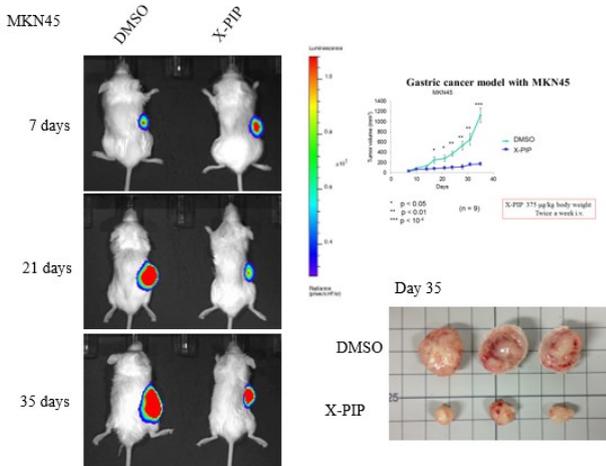
X-PIP: 革新的バイオ医薬品創出基盤拠点) の抽出に成功し開発した。

X-PIP と名付け、ビトロでの抗腫瘍活性を様々な癌腫で評価完了した。(上図)

Lung cancer model with A549



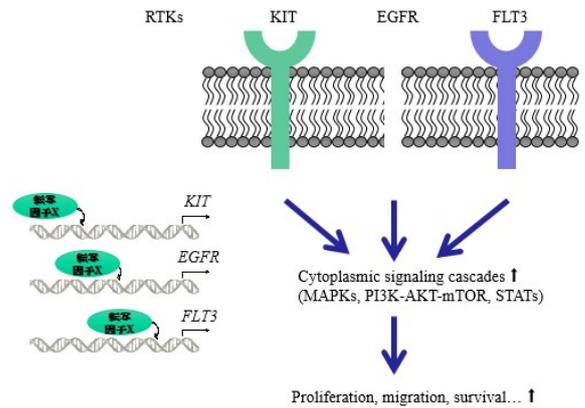
上記 EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ) 耐性肺癌移植モデルにおける X-PIP 投与解析 劇的に肺癌が抑制され、EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ) 耐性が克服された。



上図 X-PIPにより Her2 阻害剤耐性胃癌が生体内で抑制されたことから、X-PIPは Her2 耐性を克服している可能性が示唆された。現在様々な難治性白血病、固形腫瘍マウス POC を取得中。

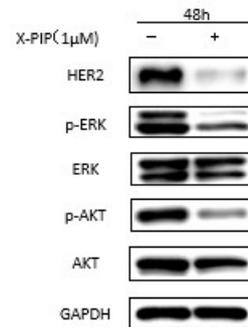
<抗腫瘍メカニズムのさらなる検討>

転写因子 X は、癌において p53 を、BCL11、TRIM24 といった p53 抑制因子の正の制御により、抑制していることが判明した、また各種 RTK (レセプターチロシンキナーゼ) を正に制御していることが判明した。



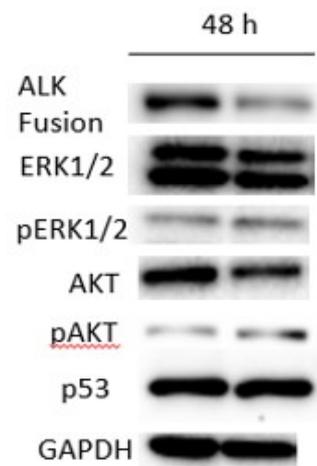
転写因子 X は各種 RTK や CTK (Cytoplasmic Tyrosine Kinase: BCR-ABL、ML4-ALK) のプロモーターに結合し (ChIP、レポーターアッセイで検証済)、それを正に制御していることから、X-PIPにより、その転写が抑制され、RTK 蛋白自身が消失することにより抗腫瘍活性が惹起されることが示唆された。

Her2 阻害剤耐性胃癌



上図: Her2 耐性胃癌にて Her2 が消失

右図: MLA4-ALK 肺腺癌にて、ALK ヒュージョン蛋白が転写レベルで消失 ALK 抑制剤耐性を克服することが示唆された。



また、BCR-ABL のプロモーターに転写因子 X のコンセンサス、FLT3-ITD のプロモーターに転写因子 X のコンセンサス配列が存在し、X-PIP や転写因子 X のコンディショナール shRNAi (ノックダウン) により、それら癌促進蛋白は転写レベルで抑制されたことから、イマチニブ、ソラフェニブなどの分子標的療法の耐性機構が克服されることが可能と考えられた。

現在スーパーコンピュータ京により、転写因子 X に対する低分子化合物のドッキングシミュレーションを行い、シミュレーション HIT を 217 個取得した。

遺伝子スイッチ法は、直接塩基配列にアクセスすることから、長期的には遺伝子毒性があるかもしれないことから、低分子化合物による、転写因子 X のターゲティングは極めて有効と考えられる。

これら転写因子 X によるエピジェネティックな効果については、様々な HTA 活性を抑制できることが示唆された、様々な癌遺伝子の Histon アセチル化、遺伝子のアセチル化も同時に制御されていることが示唆された。

このことより、本課題のエピジェネティック制御と連動する転写因子 X の抑制により、過剰なエピジェネティックな腫瘍活性が抑制されることが判明した。

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)

[雑誌論文] (計 11 件)

1: Matsuo H, Nakamura N, Tomizawa D, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Nishinaka-Arai Y, Tokumasu M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S.

CXCR4 Overexpression is a Poor Prognostic Factor in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Low Risk: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatric Blood & Cancer* Volume 63, Issue 8, pages 1394-1399, August 2016 査読あり

2: Matsuo H, Itoh H, Kitamura N, Kamikubo Y, Higuchi T, Shiga S, Ichiyama S, Kondo T, Takaori-Kondo A, Adachi S.

Intravenous immunoglobulin enhances the killing activity and autophagy of neutrophils isolated from immunocompromised patients against multidrug-resistant bacteria.

Biochem Biophys Res Commun. 2015 Aug 14;464(1):94-9. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.004. Epub 2015 Jun 25. 査読あり

3: Tokumasu M, Murata C, Shimada A, Ohki K, Hayashi Y, Saito MA, Fujimoto J, Horibe K, Nagao M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Tanaka S, Heike T, Adachi S. Leukemia. Adverse Prognostic Impact of KIT Mutations in Childhood CBF-AML: the Results of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. *Leukemia* (2015) 29, 2438-2441; doi:10.1038/leu.2015.121; published online 9 June 2015 査読あり

4: Itoh H, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, Kamikubo Y, Kondo T, Yamashita K, Sasada M,

Takaori-Kondo A, Adachi S. Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains. *J Leukoc Biol.* 2015 Apr 23. pii: jlb.4A0813-422RRR. 査読あり

5: Matsuo H, Goyama S, Kamikubo Y, Adachi S. The subtype-specific features of EVI1 and PRDM16 in acute myeloid leukemia.

Haematologica. 2015 Mar;100(3):e116-7. doi: 10.3324/haematol.2015.124396. 査読あり

6: Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples.

Exp Hematol. 2014 Sep;42(9):816-25. doi: 10.1016/j.exphem.2014.03.010. Epub 2014 May 20. 査読あり

7: Kogure Y, Nakamura F, Nukina A, Kamikubo Y, Ichikawa M, Kurokawa M, Kamikubo Y, Kurokawa M. Catheter-related septic shock by Micrococcus in an autologous hematopoietic stem cell transplantation recipient. *Am J Infect Control.* 2014 Jan;42(1):87. doi:10.1016/j.ajic.2013.07.010. 査読あり

8: Komatsu N, Kawase-Koga Y, Mori Y, Kamikubo Y, Kurokawa M, Takato T. HIV-associated Burkitt lymphoma in a Japanese patient with early submandibular swelling. *BMC Res Notes.* 2013 Dec 26;6:557. doi: 10.1186/1756-0500-6-557. 査読あり

9: Kamata M, Sugaya M, Miyagaki T, Sonoda K, Ichimura Y, Mitsui H, Sato S, Kamikubo Y, Kurokawa M. A case of CD20-positive peripheral T-cell lymphoma treated with rituximab and multiagent chemotherapy.

Int J Dermatol. 2014 Jan;53(1):e24-6. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05483.x. Epub 2013 Mar 3. 査読あり

10: Hangai S, Nakamura F, Kamikubo Y, Ichikawa M, Suzuki H, Yoshida S, Yamada A, Takazawa Y, Fukayama M, Koike K, Kurokawa M. Primary gastrointestinal follicular lymphoma with histological transformation.

Ann Hematol. 2013 Jul;92(7):993-4. doi: 10.1007/s00277-012-1654-4. Epub 2012 Dec 28. 査読あり

11: Kobayashi T, Ichikawa M, Kamikubo Y, Kurokawa M. Acute myeloid leukemia with cryptic CBFβ-MYH11 type D. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(1):110-2. Epub 2012 Nov 20. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

○平成 27 年 10 月 16 日 第 77 回日本血液学会学術集会 上久保指導の修士の発表 金

沢

1.OS-1-53 The mechanism and the effect of p300 inhibitor on MLL-rearranged ALL cells

2.OS-1-54 Induction of cell cycle arrest and apoptosis in ph+ALL cells through inhibition of p300

3.OS-2-51 Prognostic significance of CXCR4 overexpression in pediatric AML: the JPLSG AML-05 study

4.OS-2-185 Modeling Shwachman Diamond syndrome using patient-specific induced pluripotent stem cells

○平成 27 年 9 月 13 日薬剤師生涯研修認定制度（神戸薬科大学エクステンションセンター認定）特別講演

5.「免疫療法と抗癌剤開発の最前線」上久保靖彦

○平成 27 年 2 月 28 日

6.上久保靖彦；「小児がんへの挑戦：夢の創薬 日米～アジア小児がん学術ネットワークの創生」西日本小児がんセミナー 特別基調講演 口演 大阪

○平成 27 年 2 月 21 日 第 33 回 京都大学小児血液腫瘍研究会 基調講演 口演 京都

7. ※上久保靖彦；「白血病診療の現状と未来」

○平成 26 年 3 月 7 日 第 27 回京都がん研究会 京都市

8: 上久保靖彦 「各種造血器悪性腫瘍及び RGM：Ras Gene Module 高発現癌に奏功する新規抗癌剤開発」

○平成 25 年 11 月 9 日 第 71 回兵庫県白血病懇話会 特別講演 神戸市

9. ※上久保靖彦 「白血病・リンパ腫共通増殖機構解明の試み及び新規治療薬開発」

〔図書〕(計 1 件)

MPH(マスター・オブ・パブリックヘルス)留学へのパスポート：世界を目指すヘルスプロフェッション 日米医学医療交流財団 編 遙かなるワシントン DC / 上久保靖彦 著はる書房 出版年 2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0303/

<http://adachilab.web.fc2.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上久保 靖彦 (KAMIKUBO, Yasuhiko)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60548527

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし