

令和 2 年 5 月 3 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 201860742

氏名 西田有毅

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: テキサス大学 MD アンダーソンがんセンター (国名: 米国)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
BMI-1 阻害と PTEN 核内誘導の相乗作用による急性骨髄性白血病幹細胞の根絶
3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 4 日 ~ 令和 2 年 4 月 3 日
4. 受入機関名及び部局名
テキサス大学 MD アンダーソンがんセンター 白血病科 分子血液治療部 (マイケル・アンドリーフ)
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

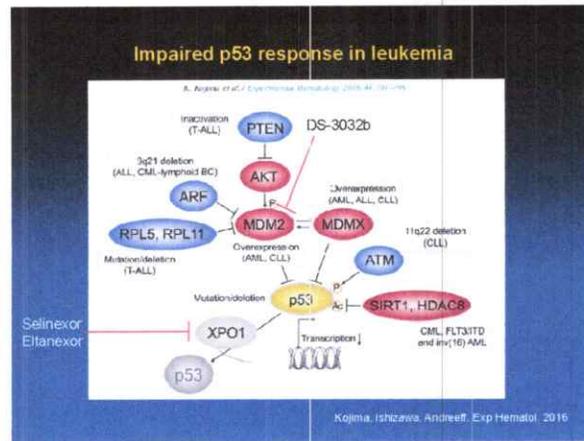
BMI-1, PTEN 及び XPO1 の生物学的関連性の検討

XPO1/CRM1 (以下 XPO1) は、核輸送シグナル (Nuclear export signal, NES) を認識し、様々なタンパクを核内から核外へ輸送する働きを持つ。現在までに、約 290 種類のタンパクが NES により核外へ輸送されることが明らかにされている (<http://prodata.swmed.edu/LRNes/index.php>)。また、XPO1 には、5' -UTR 領域に m7G-cap と呼ばれるキャップ構造を、3' -UTR 領域に、翻訳開始因子である eIF4E により認識される塩基配列 (eIF4E-sensitive element, 4E-SE) を持つ mRNA を選択的に核外輸送する働きも報告されている (引用)。筆者は XPO1 阻害剤である KPT 化合物を AML 細胞 (細胞株、及び患者 AML 細胞) へ暴露させ、BMI-1 タンパク量の変化を観察すると、KPT 化合物により BMI-1 タンパクは低下していた。筆者らは既に、BMI-1 阻害が AML 細胞の生存に重要な MCL-1 タンパクを抑制し、アポトーシスを誘導することを示してきた。一方、MCL-1 及び c-Myc の mRNA は、前述の XPO1 及び eIF4E による核外輸送の対象としても知られている。そこで KPT 化合物による MCL-1 及び c-Myc のタンパクレベルの変化を観察すると、上記の AML 細胞において、MCL-1 の低下 (一部では c-Myc の低下) も認められた。なお PTEN タンパクレベルには変化は認められなかった。KPT 化合物による BMI-1 の変化は当初の仮説では想定していなかった。次に、BMI-1, PTEN の核内外の輸送が XPO1 によって調節されているかを、OCI-AML3 細胞、MOLM-13 細胞を KPT 化合物へ暴露し、細胞成分分画を用いたウエスタンブロット法で検討した。ところが、BMI-1, PTEN タンパクは主に細胞質に存在し、XPO1 阻害による核内蓄積は確認されなかった。

次に、KPT 及び PTC 化合物の併用によりアポトーシス誘導効果が増強されるかどうか検討した。BMI-1 及び XPO1 阻害化合物 (PTC, KPT) を OCI-AML3 及び HL-60 細胞に 72 時間暴露させ、アポトーシス誘導

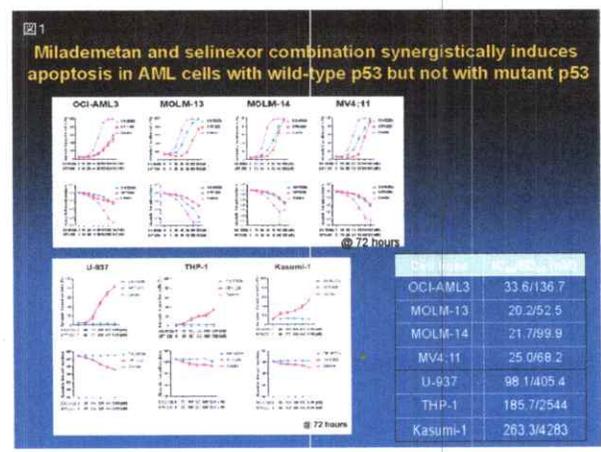
効果を Annexin V/DAPI 陽性細胞、及び生細胞数の定量で評価した。OCI-AML3 における ED50 (50%のアポトーシスを誘導する濃度)、ED75, ED90 における combination index は、それぞれ 1 を上回り、antagonistic な効果をもたらすことが示唆された。これは HL-60 細胞においても同様であった。OCI-AML3 細胞において、PTC と KPT の併用による BMI-1 及び MCL-1 タンパクの変化をウエスタンブロットにより検討すると、BMI-1 タンパクレベルは PTC 及び KPT 単独暴露によって低下するものの、PTC と KPT 併用ではその作用が減弱し、MCL-1 タンパクでは PTC 単独と KPT との併用において、タンパクレベルは同等であった。この結果から、PTC 及び KPT の併用によって、BMI-1 及び MCL-1 タンパクレベルの低下が増強はされず、特に BMI-1 においては KPT と PTC を併用すると、PTC 単独での BMI-1 抑制効果を相殺してしまう可能性があると考えられた (以上、中間報告より抜粋)。

「中間報告 3」今後の展開について」に XP01 阻害剤の他の血液悪性腫瘍への展望について記載したが、まさにこの間、2019 年 7 月に、selinexor が多発性骨髄腫治療薬として FDA 承認された。これは XP01 化合物の臨床応用に拍車をかける出来事である。筆者が所属する研究室 (以下、当研究室) では、AML における治療戦略として、E3 コピキチンリガーゼである MDM2 を阻害し、p53 を再活性化すること長年主要なプロジェクトとしてきた (Kojima, Blood 2005, Andreeff, Clin Cancer Res 2016, Ishizawa, Cancer Res 2018)。一方 XP01 は、AML において高発現しており、XP01 高発現は AML における独立した予後不良因子である。XP01 の核外輸送対象となるタンパクには p53 も含まれる。MDM2 阻害下に XP01 阻害を加えることによって、p53 タンパクの安定化とともに p53 の核外輸送が阻害され、核内に蓄積することで、がん抑制遺伝子としての働きを最大化する、という治療戦略が、当研究室から報告されている (Kojima, Blood 2013, コンセプト右図)。これをもとに、臨床試験で用いられている MDM2 阻害剤 (DS-3032b, milademetan) 及び XP01 阻害剤 (selinexor, eltanexor) を用いて、早期臨床試験を視野に入れた新規プロジェクト”Dual inhibition of MDM2 and XP01 in acute myeloid leukemia” (邦題:MDM2 及び XP01 の共阻害による AML 治療戦略の確立) が開始された。筆者は主要な研究従事者としてこのプロジェクトに従事した。以下はその報告を行う。



1. milademetan, selinexor 併用療法は p53 野生型 AML において相乗作用をもたらす

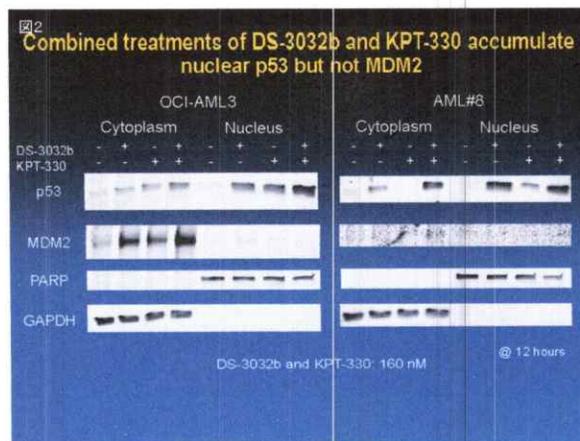
まず我々は 4 種類の p53 野生型 AML 細胞株 (OCI-AML3, MOLM-13, MOLM-14, MV4;11)、3 種類の p53 変異 AML 細胞株 (U-937, THP-1, Kasumi-1) を用いて 72 時間における併用療法の抗白血病効果 (annexin V/DAPI + Counting beads) を検討した。p53 野生型の細胞株に対しては、milademetan (M), selinexor (S) 併用療法 (以下 MS 療法) は相乗的に (定義:Calculusyn software における Combination Index < 1.0) アポトーシスを誘導し、3 - 4 log₁₀ の生細胞抑制効果を示した。対照的に、p53 変異細胞においては、相乗効果は認められず、また各薬剤の効果も低かった (図 1)。



p53 依存性のアポトーシス誘導効果を確認するために、isogenic 細胞として、OCI-AML3 ShC, Shp53 (short-hairpin によるコントロール、及び p53 ノックダウン) 細胞において効果を見ると、OCI-AML3 ShC 細胞においては強い相乗効果 (Calculus software による解析) を認めたが、OCI-AML3 Shp53 細胞において相乗効果は認められなかった。さらに、MDM2 阻害剤 (idasanutlin) の長期暴露によって得られた MOLM-13 p53 変異株 (p. R248W/R213*) (筆者が樹立) を、親株 MOLM-13 細胞で MS 療法の効果を見ると、MOLM-13 親株で認められた相乗効果は p53 変異株においては認められなかった。

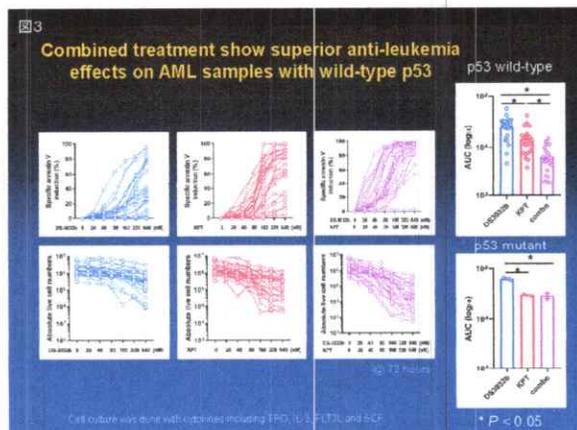
次に、p53 の核内蓄積を見るために、M, S 単独療法及び MS 療法に暴露させた OCI-AML3 細胞及び患者由来 AML 細胞を、細胞成分分画を用いたウエスタンブロット法で検討した。MS 療法は未治療、単独療法に比べて p53 タンパクを核内に有意に蓄積した (図 2)。

そこで p53 の転写因子としての働きを p53 標的遺伝子で検討すると、CDKN1A, MDM2, PMAIP1 において、併用療法で有意な発現上昇が認められた。OCI-AML3 p53 ノックダウンで同様の検討を行うと、OCI-AML3 Shp53 細胞では上記の標的遺伝子の発現上昇は軽微であった。以上より、MS 併用療法は p53 核内蓄積及び転写因子としての活性を有意に上昇させ、相乗的なアポトーシス誘導効果を示すと考えられた。



2. Milademetan, selinexor 併用療法は p53 野生型の患者由来 AML 細胞でも高度のシナジー効果をもたらす一方で、正常造血幹細胞への影響は白血病細胞より小さい

次に、我々は患者由来 AML 細胞における MS 療法の効果として、27 例の患者サンプルに 72 時間暴露し、相乗効果について検討した (annexin V/CD45/CD34/CD38/CD123/DAPI + counting beads)。27 例のうち、20 例は ELN 基準 (Blood 2017) で危険リスク群に分類された。15 例は前治療として BCL-2 阻害剤である venetoclax を含む治療レジメンが実施され、12 例ではその治療に抵抗性となっていた。2 例は p53 機能喪失変異、1 例は p53 機能正常変異があった (IARC p53 database)。各薬剤濃度における生細胞数のグラフにおける area under curve (AUC) を算出した。これを治療ごとに比較すると、p53 野生型においては、MS 併用療法は、単独治療よりも有意に AUC を減少させたが、p53 機能喪失変異では、MS 療法での AUC は selinexor と同等であり、併用による優位性は認めなかった (図 3)。相乗効果は前述の p53 機能喪失変異を持つ 2 例を除き、全てのサンプルにおいて認められ (25/27, 93%)、さらに 12 例の venetoclax 抵抗性サンプルのうち、11 例で相乗効果が認められた (11/12, 92%)。



MS 療法は、未分化な CD34+CD38-AML 細胞において、CD34+細胞に比べて有意なアポトーシス誘導効果が認められた。また臍帯血由来 CD34+正常造血細胞は、CD34+CD38- AML 細胞に比して有意に高い ED95 (95%をアポトーシスへ誘導する濃度) を示し、未分化 AML 細胞と造血幹細胞の間に Therapeutic index が存在することが示された。

3. Milademetan, selinexor 併用療法は、
c-Myc mRNA 及びタンパク量を、p53 依存的
に減少させ、c-Myc タンパク量は併用療法
の効果予測因子となりうる

c-Myc は AML における予後規定因子とする報告
があり (Leuk & Lymphoma 2018)、また p53 は MYC
遺伝子の遠位プロモーター領域に直接結合し MYC
の転写を抑制する。さらに MYC mRNA は m7G-cap,
4E-SE 領域を持つ XPO1 のターゲットであり、XPO1
阻害によって c-Myc が転写及び翻訳レベルで抑
制されるという仮説のもと、MS 療法による c-Myc
タンパクレベルの変化を検討した。OCI-AML3 Shc
細胞において、MS 療法は c-Myc タンパクレベル
を有意に減少させたが、一方 OCI-AML3 Shp53 細
胞では c-Myc 減少は認められなかった。この結
果は、上述の MOLM-13 親株、p53 変異株のペアで
も同様であった (図4)。患者由来 AML 細胞にお
いても、c-Myc 低下は p53 野生型細胞では認めら
れたが、p53 機能喪失変異細胞では認められな
かった。この結果から、MS 療法による c-Myc 低下
は p53 に依存すると考えられた。また c-Myc 発
現量が MS 療法の効果に与える影響について、
OCI-AML3 細胞に c-Myc を過剰発現させ効果を検討した。興味深いことに、c-Myc 過剰発現細胞はコン
トロール細胞に比べて MS 療法により感受性が高
まった。さらに患者細胞における c-Myc 基礎発
現量と治療効果 (ED50) との間に、有意な負の
相関 (Spearman $r = -0.45$, $P = 0.046$) が認め
られた (図5)。

4. Milademetan, selinexor 併用療法は、BCL-2 阻害剤 venetoclax 抵抗性を示す AML においても有
効である

患者由来 AML 細胞において、venetoclax 抵抗
性となった細胞においても MS 療法は相乗的にア
ポトーシスを誘導したことから、次に我々は、
venetoclax 抵抗性細胞において MS 療法を検討し
た。MV4;11 細胞に venetoclax を長期暴露させ樹
立した (Pan, Cancer Cell 2017) MV4;11
venetoclax resistance (VR) 細胞を用いた。
MV4;11 VR 細胞は、親株に比べて有意に c-Myc 発
現レベルが高く、さらに MS 療法に対してより高
い感受性を示した (図6)。

以上の内容は、米国血液学会年次集会 (ASH
annual meeting 2019) にてポスター発表した。
MV4;11 VR 細胞を用いて、現在 xenograft model による in vivo 実験を実施中である。

