

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違わ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)

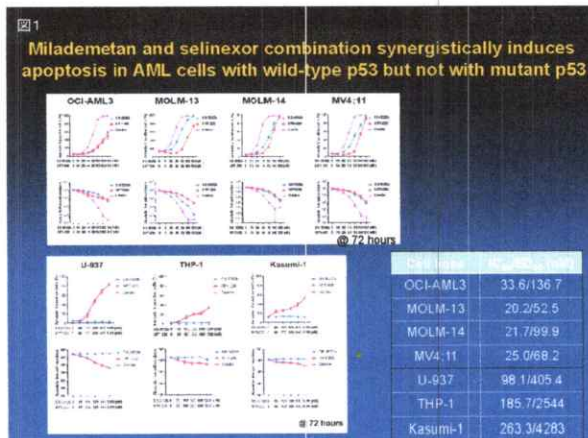
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(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 XP01 の生物学的関連性の検討

XP01/CRM1 (以下 XP01) 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、XP01 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 XP01 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 XP01 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 XP01 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ェ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、XP01 阻害による核内蓄積は確認されなかった。

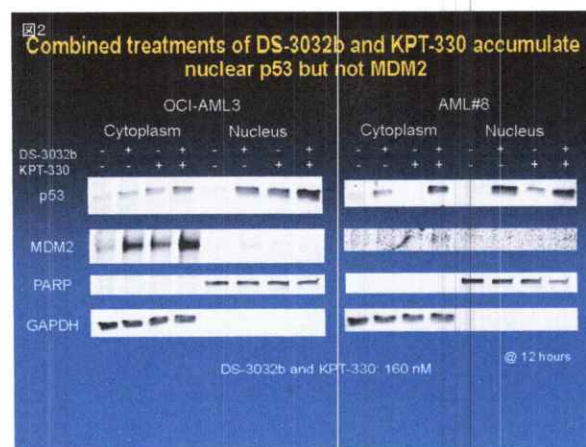
次に、KPT 及び PTC 化合物の併用によりアポトーシス誘導効果が増強されるかどうか検討した。BMI-1 及び XP01 阻害化合物 (PTC, KPT) を OCI-AML3 及び HL-60 細胞に 72 時間暴露させ、アポトーシス誘導



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ェ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)。

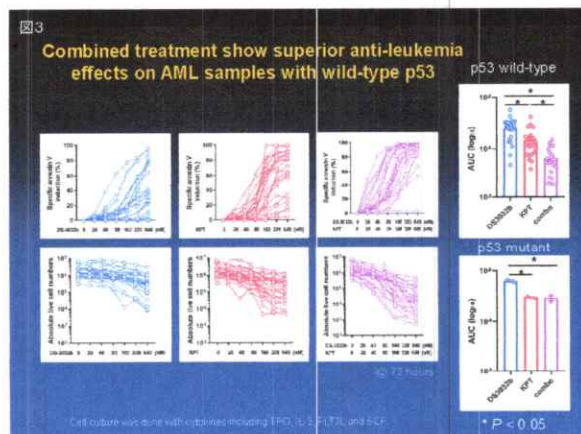
そこで p53 の転写因子としての働きを p53 標的遺伝子で検討すると、CDKN1A, MDM2, PMAIP1 において、併用療法で有意な発現上昇が認められた。OCI-AML3 p53 ノックダウンで同様の検討を行うと、OCI-AML3 Shp53 細胞では上記の標的遺伝子の発現上昇は軽微であった。以上より、MS 併用療法は p53 核内蓄積及び転写因子としての活性を有意に上昇させ、相乗的なアポトーシス誘導効果を示すと考えられた。



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 XP01 のターゲットであり、XP01 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)。以上から、c-Myc 発現量は MS 療法への効果予測因子となりうると考えられた。

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。

