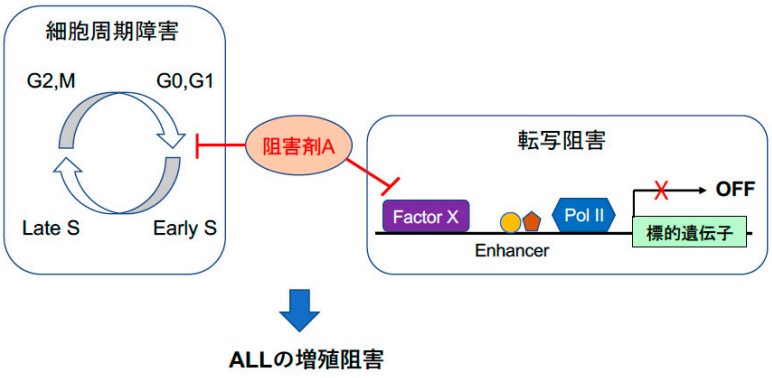
19　急性リンパ性白血病の新規治療薬の開発	伊川　友活

【目的】急性リンパ性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia：ALL）は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、その大半を B 細胞性 ALL（B-ALL）が占める。小児 ALL のうち約 3／4 は何らかの染色体転座を有し、転座の結果生じる融合遺伝子が B-ALL の一因であることが知られているが、発症メカニズムの詳細は明らかでない。17;19 転座型（*TCF3-HLF* 型）ALL は B-ALL の 0.5%を占める比較的稀な転座型であるが、近年の強化された化学療法においても大部分の症例が 1 年以内に再発しており、新たな治療法の開発が急務である。そこで *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株および正常血液前駆細胞を用いて、B-ALL 細胞の増殖を特異的に阻害する化合物（約 3,000 個）を探索したところ、免疫プロテアソーム阻害剤やエポキシケトン阻害剤など約 10 種類の阻害候補薬が同定された。そこで本研究では、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株における阻害候補薬の増殖抑制効果を *in vitro* のアッセイ系を用いて詳細に検討するとともに阻害剤の作用機序を明らかにすることを目的とする。

【方法】化合物スクリーニングによって同定された阻害候補化合物の有効性を検討した。まず、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株を用いて、IC_{50}を算出した。次に、同じ培養系を用いて、化合物添加後の細胞周期およびアポトーシスを検討した。続いて阻害メカニズムを解明するために、化合物を添加した細胞としていない細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。

【結果】候補化合物のうち阻害剤 A は *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株に対して高い増殖抑制効果を示した。そこで、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株（YCUB2、Endokun）、1;19 転座型（*TCF3-PBX1* 型）ALL 細胞株（697）および正常細胞としてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて阻害効果を検証した。具体的には、これら細胞株の培養液中に様々な濃度で阻害剤を添加し 48 時間培養すると、わずか 40 nM でいずれの細胞株に対しても 80%以上の増殖阻害効果が認められた。細胞株に対する IC_{50} はいずれも 20 nM 以下であった。また、この阻害剤は *TCF3-PBX1* 型 ALL 細胞株（697）に対しても有効であった。次に、阻害剤 A を 40 nM 添加して *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株を 8 時間培養した後に細胞を回収し、細胞周期およびアポトーシス解析を行ったところ、驚いたことに S 期の細胞が完全に消失し、アポトーシスが亢進していた。従って、阻害剤 A は低濃度でも B-ALL 細胞選択的に細胞周期を G0/G1 期で完全に停止させることが示された。続いて、阻害剤 A による遺伝子発現への影響を RNA-seq を用いて解析したところ、コントロールに比べて発現が 2 倍以上上昇する遺伝子が 856 個、低下する遺伝子が 2,644 個認められた。発現が低下した遺伝子群には、*TCF3-HLF* 型 ALL で高発現している *LMO2* や *EP300*、JAK2/3 だけでなく、細胞周期（*CDK12*、*CDC6* など）、アポトーシス（*BCL2L1*、*BAK* など）、BCR シグナル伝達（*BLNK*、*PTPN4* など）、転写・エピゲノム制御（*IKZF2*、*PAX5* など）、NF κ B シグナル（*RELA*、*TAB1* など）などが含まれており、こうした B-ALL の生存・増殖に関わる数多くの遺伝子の発現が顕著に低下していた。このことから、阻害剤 A は難治性 ALL に対する新規治療薬としての可能性があることが示唆された。

ALL の増殖を特異的に阻害する化合物



19. 急性リンパ性白血病の新規治療薬の開発

伊川　友活

*東京理科大学 生命医科学研究所 免疫生物学研究部門

Key words：B-ALL，leukemia，chemical compound screening，hematopoietic stem cell，B cell

緒　言

急性リンパ性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia：ALL）は小児白血病の中で最も高頻度であり、約 3／4 の症例で何らかの転座を有する。現在では多剤併用化学療法による集学的治療の進歩により、治療成績は向上しているものの、20%の患者は再発し、化学療法では対処できない予後不良因子もいまだに存在する。こうした難治性あるいは再発性 B-ALL に対してはキメラ抗原受容体 T 細胞療法（chimeric antigen receptor-T cell therapy：CAR-T 療法）が開発されている。CAR-T 療法は保険適用されているものの、まだ適用範囲が限られていること、製造に 5〜6 週間かかること、患者によって CAR-T 細胞が十分に増えず投与が行えない場合があること、薬価が 1 患者あたり約 3,350 万円と非常に高額であることなどが問題となっている。したがって、こうした難治性・再発性 ALL に対する新規治療法の開発が望まれている。

本研究では 17;19 転座型 ALL をモデルとして用いる。17;19 転座型 ALL は ALL の 0.5%を占める比較的まれな転座型であるが、近年の強化された化学療法においても大部分の症例が 1 年以内に再発しており、新たな治療法の開発が急務である。

この転座型では、17 番染色体に由来する leucine zipper 型転写因子である HLF の二量体形成／DNA 結合領域が 19 番染色体に由来する basic helix-loop-helix（bHLH）型転写因子である TCF3（E2A）の転写活性領域と融合することにより *TCF3-HLF* が形成される［1］。この *TCF3-HLF* 型 ALL では、*PAX5*、*VPREB* など B 細胞関連遺伝子の欠失・変異、*RAS*、*MYC* の活性型変異、アポトーシスの抑制などが報告されている［2, 3］。一方、*TCF3-HLF* 型 ALL の病態解明のため、マウスモデルを作製する試みがなされている。レトロウイルスを用いて造血幹・前駆細胞へ *TCF3-HLF* を導入する方法やトランスジェニックマウスの作製などが試みられているが、いずれも AML や T-ALL を発症するなど B-ALL を発症するモデルは確立されていない［4〜6］。

そこで *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株および正常血液前駆細胞を用いて、B-ALL 細胞の増殖を特異的に阻害する化合物（約 3,000 個）を探索したところ、免疫プロテアソーム阻害剤やエポキシケトン阻害剤など約 10 種類の阻害候補薬が同定された。これらは 1 μM 以下の低濃度で高い増殖阻害率を示した。また、これらの化合物はこれまでに B-ALL の治療薬としては用いられていない新規化合物であった。そこで本研究では、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株における阻害候補薬の増殖抑制効果を様々な評価系を用いて詳細に検討するとともに阻害剤の作用機序を明らかにすることを目的とする。

方　法

1. 阻害化合物の有効性

化合物スクリーニングにより同定した阻害剤 A は *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株に対して高い増殖抑制効果を示した。そこで、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株（YCUB2、Endokun）、1;19 転座型（*TCF3-PBX1* 型）ALL 細胞株（697）および正常細胞としてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて有効性を検証した。具体的には、これら細胞株の培養液中に様々な濃度で阻害剤 A を添加し 48 時間後に細胞生存率を解析した。

*現在の所属：東京理科大学 生命医科学研究所 免疫アレルギー部門

2. 細胞周期、アポトーシス解析

阻害剤 A を 40 nM 添加して TCF3-HLF 型 ALL 細胞株を 8 時間培養した後に細胞を回収し、細胞周期およびアポトーシスを、フローサイトメーターを用いて解析した。

3. RNA-seq 解析

阻害剤 A による増殖阻害の作用機序を明らかにするため、阻害剤 A を 40 nM 添加して *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株を 8 時間培養した後に細胞を回収し、RNA を精製後、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を行った。

結果および考察

1. 阻害化合物の有効性

細胞株の培養液中に様々な濃度で阻害剤 A を添加し 48 時間培養すると、わずか 40 nM でいずれの細胞株に対しても 80%以上の増殖阻害効果が認められた（図 1）。細胞株に対する IC_{50} はいずれも 20 nM 以下であった。興味深いことに、この阻害剤は *TCF3-PBX1* 型 ALL 細胞株（697）に対しても有意に増殖阻害を示した。したがって、*TCF3-HLF* 型 ALL だけでなく、*TCF3-PBX1* 型 ALL にも有効であることが明らかとなった。一方、阻害剤 A は臍帯血 CD34 陽性造血幹・前駆細胞に対しては影響が限定的であったことから、正常な血液細胞への毒性は低いと考えられる。特に、40 nM において B-ALL 細胞株と正常細胞とのマージンが 1 番大きく得られることが明らかとなった。

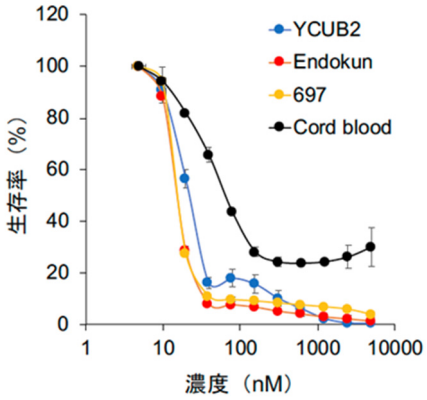


図1. 阻害剤AによるB-ALL細胞の増殖抑制

阻害剤Aの濃度と細胞の生存率との関係を示す。正常な造血幹・前駆細胞（Cord blood）に比べて白血病細胞株はいずれも感受性が高かった。

2. 細胞周期、アポトーシス解析

驚いたことに、阻害剤 A を作用させた *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株ではわずか 8 時間後に S 期の細胞が完全に消失し、アポトーシスが亢進していた。従って、阻害剤 A は低濃度でも B-ALL 細胞選択的に細胞周期を G0/G1 期で完全に停止させることが示された。

3. 阻害化合物の作用機序の解析

コントロールに比べて発現が 2 倍以上上昇する遺伝子が 856 個、低下する遺伝子が 2,644 個認められた（図 2）。発現が低下した遺伝子群には、*TCF3-HLF* 型 ALL で高発現している *LMO2* や *EP300*、*JAK2/3* だけでなく、細胞周期（*CDK12*、*CDC6* など）、アポトーシス（*BCL2L1*、*BAK* など）、BCR シグナル伝達（*BLNK*、*PTPN4* など）、転写・エピゲノム制御（*IKZF2*、*PAX5* など）、NF κ B シグナル（*RELA*、*TAB1* など）などが含まれており、こうした B-ALL の生存・増殖に関わる数多くの遺伝子の発現が顕著に低下していた。これらの結果から、阻害剤 A は ALL の細胞周期および転写に作用し、*TCF3-HLF* 型 ALL だけでなく他の難治性 B-ALL にも有効であることが示唆された（図 3）。

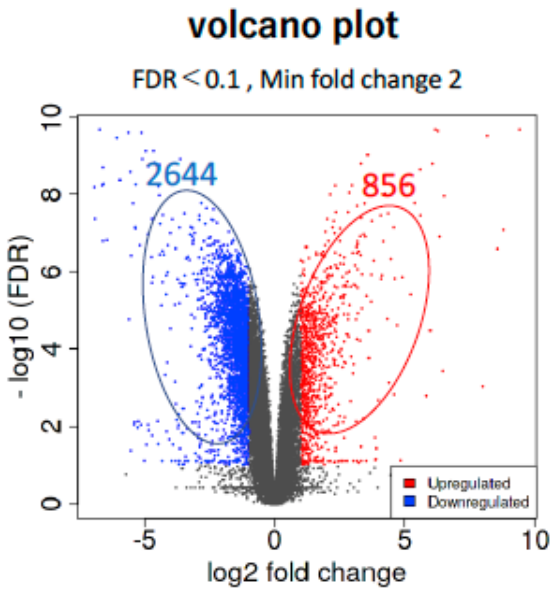


図2. 阻害剤Aの添加による発現変動遺伝子

RNA-seqにより阻害剤Aによって発現が変動する遺伝子を解析した。発現が上昇した遺伝子は856個、減少した遺伝子は2,644個であった。FDR＜0.1。

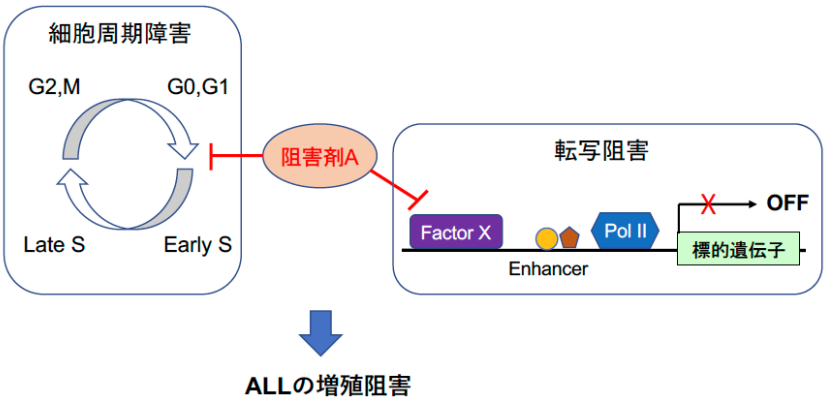


図3. 阻害剤AによるALL増殖抑制のモデル

阻害剤Aは細胞周期と転写を抑制することにより、ALLの増殖を阻害することが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、山梨大学医学部小児科の犬飼岳史教授、東京理科大学生命医科学研究所の松島綱治教授、寺島裕也講師である。

文　献

1) Inaba T, Roberts WM, Shapiro LH, Jolly KW, Raimondi SC, Smith SD, et al. Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. Science (80-). 1992;257(5069):531–4. PMID: 1386162 DOI: 10.1126/science.1386162.

2) Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz HJ, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLFâ 'positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. Nat Genet. 2015;47(9):1020–9. PMID: 26214592 DOI: 10.1038/ng.3362

3) Li JF, Dai YT, Lilljebjörn H, Shen SH, Cui BW, Bai L, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(50):E11711–20. MID: 30487223 DOI: 10.1073/pnas.1814397115.

4) Smith KS, Rhee JW, Naumovski L, Cleary ML. Disrupted Differentiation and Oncogenic Transformation of Lymphoid Progenitors in E2A-HLFTransgenic Mice. Mol Cell Biol. 1999;19(6):4443–51. PMID: 10330184 DOI: 10.1128/mcb.19.6.4443.

5) Honda H, Inaba T, Suzuki T, Oda H, Ebihara Y, Tsuiji K, et al. Expression of E2A-HLF chimeric protein induced T-cell apoptosis, B-cell maturation arrest, and development of acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1999;93(9):2780–90. PMID: 10216071

6) Duque-Afonso J, Smith KS, Cleary ML. Conditional expression of E2A-HLF induces bcell precursor death and myeloproliferative-like disease in knock-in mice. PLoS One. 2015;10(11):1–14. PMID: 26588248 DOI.org/10.1371/journal.pone.0143216