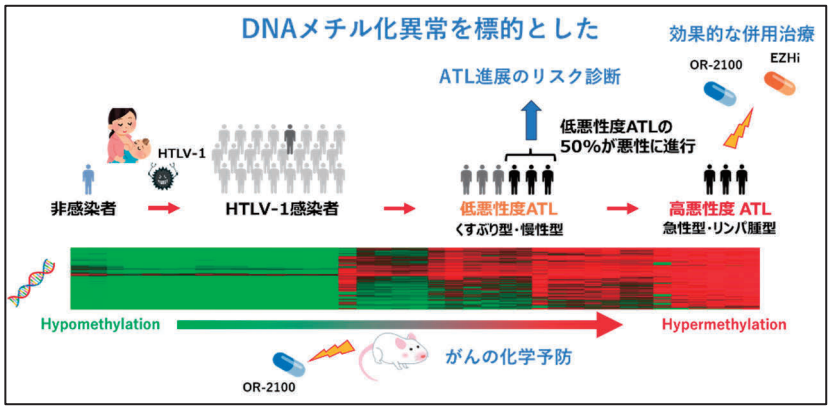
54　成人T細胞白血病の新しい診断法および治療法の確立	木村　晋也

【目的】成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）はレトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）に感染した T 細胞がクローン性の増殖能を獲得することで発症する予後不良の血液腫瘍である。ATL 発がんは、HTLV-1 感染から数十年の潜伏期間において感染細胞にゲノム異常やエピゲノム異常が蓄積することで、一部の感染者から発症し、病態が進展すると考えられており、ATL の発症、病態の進展リスク診断法や効果的な治療法、あるいは予防法の開発が求められている。我々は最近、ATL の発がん、病態の進行に伴い、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞に特徴的な DNA メチル化亢進異常が蓄積することを明らかにした。また、共同研究にて開発を進めている新規経口脱メチル化薬 OR-2100 は抗 ATL 作用を発揮した。以上より、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞で認められる特徴的な DNA メチル化亢進異常が ATL 発がんに機能的に関与していると考え、本研究では DNA メチル化を標的にした、ATL の新しい診断法、OR-2100 をベースとした治療法を確立するため、ATL の病態が進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を同定するとともに、ATL 細胞に対して効果的に作用する DNA 脱メチル化薬の併用療法を開発することを目的とした。また、リンパ腫自然発症マウスモデルを用いて OR-2100 がん予防効果を検証した。

【方法】ATL の病態が進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を探索するため、筆者らがすでに公開している健常人、HTLV-1 感染者、ATL 患者の正常 T 細胞、及び HTLV-1 感染細胞のメチル化プロファイル（GSE136189）を再解析した。得られたメチル化異常部位について、HTLV 1 感染者コホート共同研究班（JSPFAD）より提供されたくすぶり型 ATL 患者由来の DNA を用いて、メチル化の程度がその後の病態の進行を反映するか、バイサルファイト - パイロシーケンスにて検討した。また、DNA 脱メチル化薬と EZH タンパク質阻害薬の併用による抗腫瘍効果について、培養細胞株を用いた *in vitro* 解析、及び、異種移植マウスモデルを用いた *in vivo* 解析から検証した。さらに、OR-2100 のがん予防効果について、内在性レトロウイルスがリンパ腫の自然発がんに関与するとされる AKR マウスを用いて検討した。

【結果】HTLV-1 感染細胞において急性型 ATL で特に強くメチル化が亢進している CpG 部位について、くすぶり型 ATL 患者 DNA を用いて解析したところ、いくつかの遺伝子の CpG 部位のメチル化において、病態がその後に進展したくすぶり型患者では優位にメチル化が高い傾向が認められ、病態リスク診断に有用な部位と考えられた。OR-2100 は EZH 阻害薬との併用により ERK 脱リン酸化酵素 DUSP5 の発現誘導を伴い、ATL 細胞の増殖を強く抑制し、DNA メチル化とヒストンメチル化を標的にした併用 ATL 治療は、ATL 治療成績の向上に貢献できると考えられる。また、リンパ腫を高頻度に自然発症する AKR マウスにおいて、OR-2100 は安定した長期投与が可能であり、個体の生存を大きく延長したため、レトロウイルスが関与するリンパ腫の発がんにおいて、がん予防にも効果が期待される。以上の結果より、DNA メチル化異常は、ATL の診断、治療、予防において有用な標的であると考える。

DNA メチル化異常を標的とした ATL の診断・治療・予防法の開発



54. 成人 T 細胞白血病の新しい診断法および治療法の確立

木村　晋也

佐賀大学 医学部 内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科

Key words：成人 T 細胞白血病，DNA メチル化，バイオマーカー，DNA 脱メチル化薬

緒　言

成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）に感染した T 細胞が形質転換し、クローン性の増殖能を獲得することで発症する極めて予後不良の血液腫瘍である。日本は HTLV-1 の感染流行地であり、80 万人程の感染者がいるとされる。ほとんどの感染者は生涯を通じて ATL を発症しないが、2～5%の感染者が ATL を発症する。ATL はその臨床病態から、4 つに分類される。くすぶり型 ATL や予後不良因子を持たない慢性型 ATL は比較的低悪性度で日本では積極的な治療は実施されず、経過観察が一般的である。一方、急性型 ATL やリンパ腫型 ATL は極めて予後不良であり、治療の必要を有する。しかしながら、低悪性度型の ATL 患者のおよそ半数がその後、高悪性度型の ATL に進展することが知られており、病態の進展を予測する診断法や効果的な治療法が求められている。

我々は、臨床検体を用いた網羅的 DNA メチル化解析から、ATL の発症、病態の進展に伴い、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞に特徴的な DNA メチル化亢進異常が蓄積することを最近報告した［1］。DNA のメチル化は遺伝子発現の制御や染色体の安定性などに関与する代表的なエピゲノム修飾の一つであるが、様々な腫瘍細胞においてその異常が認められ、治療標的として注目されている。実際に、骨髄異形成症候群（MDS）や急性骨髄性白血病（AML）など、一部の血液腫瘍の治療において、DNA 脱メチル化薬としてアザシチジンやデシタビンが用いられてきた。また、2020 年には、第二世代の DNA 脱メチル化薬として CC-486 や ASTX727 が米国 FDA に承認された。さらに、単剤の使用に限らず様々な分子標的薬との併用によるがん治療が臨床、前臨床試験にて広く研究されている。我々は、新しい DNA 脱メチル化薬として経口投与可能なデシタビンのプロドラッグ OR-2100 を共同開発し、ATL［1］や MDS、AML［2］などに対する抗腫瘍効果を明らかにしてきた。

そこで本研究では、DNA メチル化異常を標的にした、ATL の新しい診断法、OR-2100 をベースとした治療法を確立するため、高悪性度 ATL に進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を同定するとともに、ATL 細胞に対して効果的に作用する DNA 脱メチル化薬の併用療法を開発することを目的とした。また、リンパ腫自然発症マウスモデルを用いて OR-2100 がん予防効果を検証した。

方　法

1. バイサルファイト - パイロシーケンス

HTLV1 感染者コホート共同研究班（JSPFAD）より提供されたくすぶり型 ATL 患者由来の DNA について EZ DNA Methylation Kit（Zymo Research）を用いてバイサルファイト変換した後、6 遺伝子のリスク診断用の候補 CpG 部位メチル化を PyroMark Q24 により定量した。

2. TL-Om1 異種移植マウスモデル

NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Sugl}/ShiJic（NOG マウス）は実験動物中央研究所より購入した。TL-Om1 細胞を 6 週齢の NOG マウスの皮下に移植し、移植部位に形成される腫瘍がおよそ 100 mm^{3}になった時点を Day0 とし、投薬を開始

した。OR-2100 は、週に 2 回、3.39 mg/kg を腹腔内投与し、EPZ-6438 は連日、100 mg/kg を経口投与した。投薬開始 21 日後まで腫瘍の大きさを経時的に測定した。

3. 遺伝子導入

ヒト *DUSP5* 遺伝子のクローニング、発現用レンチウイルスの調製は vector builder 社にて行われた。ウイルスは RetroNectin（タカラバイオ）を用いて ATL 細胞株に感染させ、遺伝子導入を行った。*DUSP5* 遺伝子と *GFP* 遺伝子がバイシストロニックに発現するため、GFP を指標に感染細胞（DUSP5 発現細胞）を検出した。

4. AKR マウスモデル

AKR/NSIc（AKR マウス）は日本 SLC より購入した。6 週齢から OR-2100 を週に 2 回、1 mg/kg あるいは 2 mg/kg 腹腔内投与した。

結　果

1. DNA メチル化異常を標的とした ATL 進展リスク診断法の開発

低悪性度 ATL 患者のおよそ半数はその後、高悪性度型 ATL に進展することが知られている。そこで、DNA メチル化異常を指標とした進展リスクの評価系を確立するため、著者らがすでに公開している健常人、HTLV-1 感染者、ATL 患者の正常 T 細胞、及び HTLV-1 感染細胞のメチル化プロファイル（GSE136189）を再解析し、感染細胞において急性型 ATL で特に強くメチル化が亢進している 1,633 CpG を抽出した（図 1a）。続いて、EWAS Atlas data hub（http://bigd.big.ac.cn/ewas/datahub）に収録されている健常人の末梢血単核球由来（PBMC）と全血由来の DNA メチル化プロファイルを参照し、健常人の PBMC あるいは全血由来の DNA では非メチル化状態の CpG をさらに抽出した。

JSPFAD より提供されたくすぶり型 ATL 患者の PBMC 由来 DNA について、得られた進展リスク評価 CpG 部位のメチル化解析を行い、その後の病態の進展に分けて比較した（図 1b）。その結果、いくつかの遺伝子の CpG 部位のメチル化において、病態がその後進展したくすぶり型患者では優位にメチル化が高い傾向が認められた（図 1c）。

2. DNA メチル化とヒストンメチル化を標的とした併用療法

ATL の発がんにおいて、DNA メチル化異常だけでなく、ヒストンのメチル化異常、特に H3K27 のトリメチル化（H3K27me3）の異常な亢進が認められている。日本では、H3K27me3 修飾を触媒する EZH タンパク質に対する分子標的薬が 2022 年に再発・難治 ATL に対して承認されている。そこで、DNA 脱メチル化薬の併用薬として EZH タンパク質阻害剤である EPZ-6438 について検討した（図 2a）。

免疫不全マウスの皮下に ATL 細胞株を移植した異種移植マウスモデルにおいて、OR-2100 と EPZ-6438 の併用は、それぞれの単剤の投与に比べてより強く腫瘍の増殖を抑制した（図 2b）[3]。併用による抗 ATL 効果の増強における分子機序を明らかにするため、網羅的な DNA メチル化解析、遺伝子発現解析、ヒストンメチル化解析（データベース解析）を行い、併用処理により DUSP5 の発現が亢進することを見出した（図 2c）[3]。DUSP5 は細胞の増殖や生存に関与する ERK タンパク質の脱リン酸化を触媒する腫瘍抑制因子であり、予想通り、DUSP5 を遺伝子導入すると細胞増殖が抑制された（図 2d）[3]。

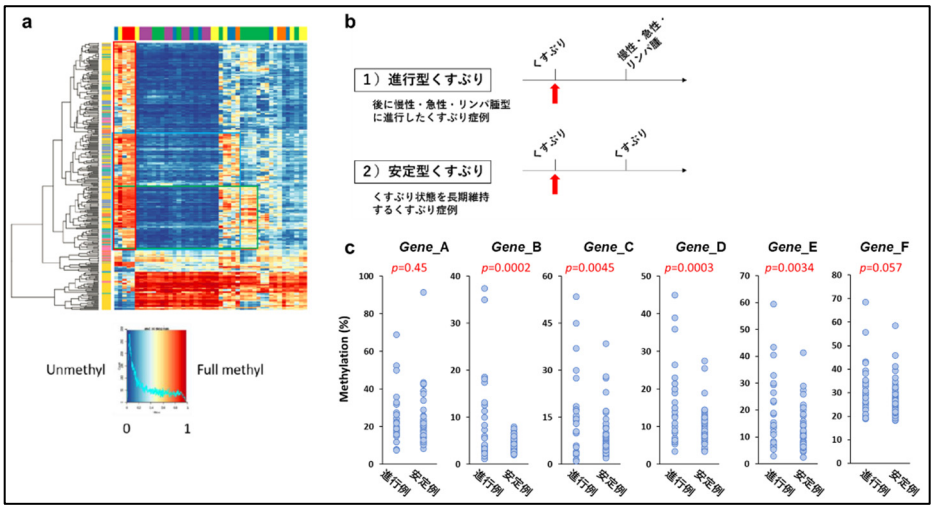


図 1. ATL の進展リスクを評価可能な DNA メチル化部位の探索

a) HTLV-1 感染者、ATL 患者の正常 T 細胞、及び HTLV-1 感染細胞のメチル化プロファイル（GSE136189）を解析し、感染細胞において急性型 ATL で特に強くメチル化が亢進した CpG 部位を探索した。

b) 病態の安定したくすぶり型 ATL 患者（安定例）と病態が進展した ATL 患者（進展例）について、それぞれの患者がくすぶり型 ATL と診断された時点（赤矢印）での DNA メチル化を測定した。

c) 各遺伝子の CpG におけるメチル化をバイサルファイト - パイロシーケンスにて測定し、安定例と進行例について Student の t 検定を行った。

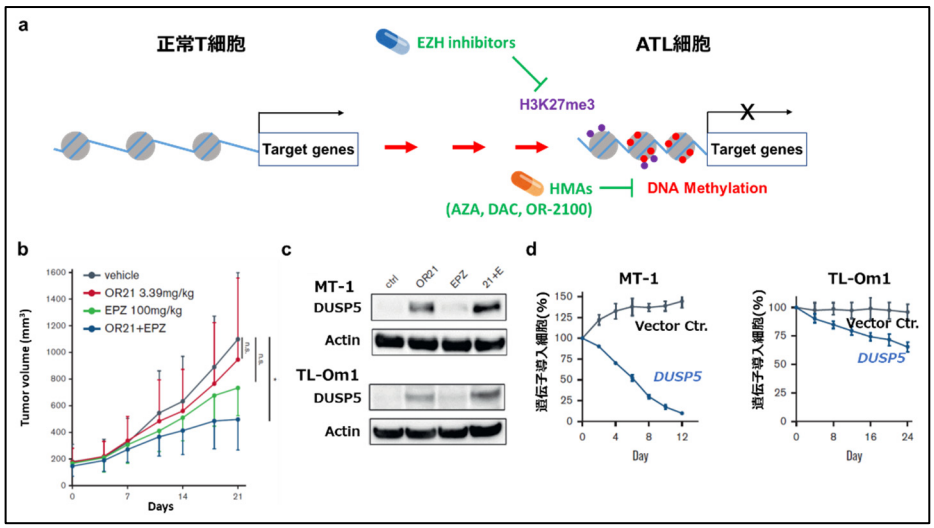


図 2. DNA メチル化とヒストンメチル化を標的とした併用療法

a) ATL 発がんにおけるエピゲノム異常と標的治療。

b) NOG マウスに TL-Om1 細胞を皮下移植し、OR-2100 3.39 mg/kg を週二回、腹腔内投与、EPZ-6438 100 mg/kg を連日経口投与した。経時的に腫瘍の大きさを測定した。

c) MT-1、TL-Om1 細胞に *in vitro* にて OR-2100 と EPZ-6438 を 4 日間処理し、DUSP5 の発現をウェスタンブロットにて解析した。

d) MT-1 細胞、TL-Om1 細胞にレンチウイルスにより *DUSP5* 遺伝子を導入し、*DUSP5* 遺伝子発現細胞の割合をバイシストロニックに発現する GFP を指標に経時的に測定した。

3. DNA 脱メチル化薬によるリンパ腫自然発症マウスの発がん予防

ATL は HTLV-1 に起因するヒトの疾患であるため、高度免疫不全マウスにヒトの造血システムを移植したモデル系が樹立されているが、作製は容易ではない。そこで、内在性レトロウイルス AKV が関与するリンパ腫を生後 6 カ月頃から極めて高頻度（9 割以上の個体）に自然発症する AKR マウス（図 3a）に、DNA 脱メチル化薬として OR-2100 を長期投与することで、レトロウイルス関連リンパ腫の発症が予防できるか検討した。

リンパ腫を発症した個体の肥大した胸腺（腫瘍）とリンパ腫を発症する前の若齢マウスの胸腺から調製した各分化段階の T 細胞のメチル化を網羅的に比較解析したところ、ATL で認められたメチル化変化と同様に、腫瘍細胞では、ゲノム全体としては脱メチル化傾向を示し（図 3b）、遺伝子発現制御に重要とされるプロモーター近傍においてメチル化亢進異常が認められた（図 3c）。また、生後 6 週齢より OR-2100 を連続投与したところ、目立った毒性は観察されず、最大で 400 日以上の長期投与が可能であり、生存期間も大きく延長した（図 3d）。また、AKR マウス腫瘍細胞から樹立された細胞株 BW5147.G.1.4.OUA-R.1 に *in vitro* にて DNA 脱メチル化薬を処理すると濃度依存的に細胞増殖が抑制され（図 3e）、DNA の脱メチル化が認められた（図 3f）。

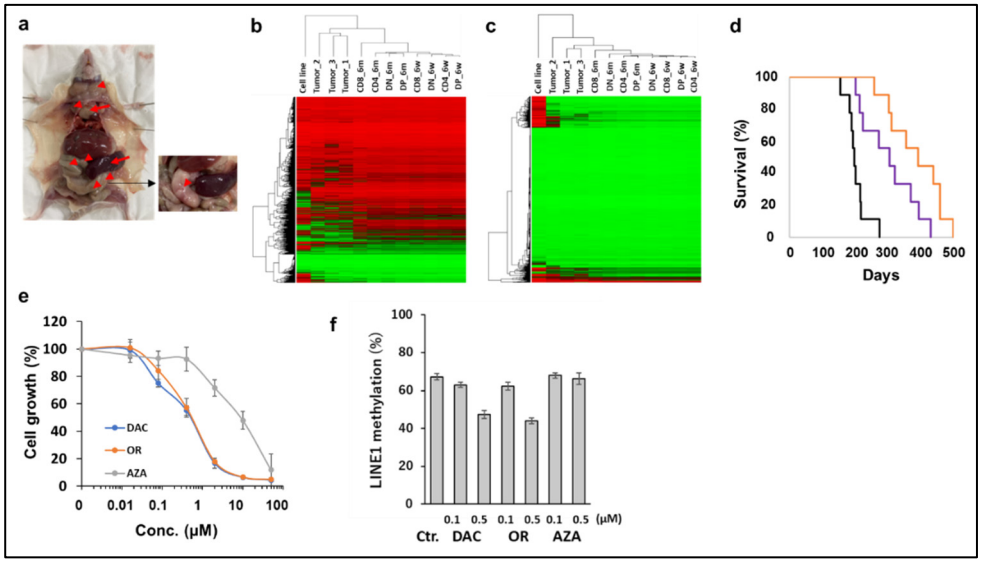


図 3. リンパ腫自然発症 AKR マウスにおける OR-2100 長期投与による発がん予防

a） リンパ腫を発症した AKR マウス個体（6 カ月齢）。赤矢印は腫瘍部位を示す。

b、c） リンパ腫発症個体の胸腺組織（腫瘍）と未発症若齢個体の胸腺における各分化段階の T 細胞（DN : double negative、DP : double positive、CD4 : CD4 single positive、CD8 : CD8 single positive）、及び BW5147.G.1.4.OUA-R.1（Cell line）の DNA メチル化のクラスター解析結果のヒートマップ。赤が完全メチル、緑が非メチルを示す。（b）はゲノム全体からランダムに抽出した 20,000 CpG 部位、（c）は転写開始点上流 200 bp 内に存在する CpG 部位のメチル化値による解析結果を示す。

d） AKR マウスの生存率をカプランマイヤー曲線にて示す。黒は溶媒投与群、紫は 1 mg/kg OR-2100 投与群、橙は 2 mg/kg OR-2100 投与群（週 2 回腹腔内投与群）を示す。

e、f） リンパ腫発症個体の胸腺組織（腫瘍）と未発症若齢個体の胸腺における各分化段階の T 細胞 BW5147.G.1.4.OUA-R.1 細胞株に DNA 脱メチル化薬（DAC : デシタビン、OR : OR-2100、AZA : アザシチジン）を四日間処理し、（e）細胞増殖を CCK-8 法により評価し、未処理の細胞の値を 100%とした時の、各処理細胞の値を示す。（f）ゲノム全体のメチル化の指標とされる *LINE1* の近位プロモーターのメチル化をバイサルファイト - パイロシーケンスにて定量した。

考　察

ATL は HTLV-1 の感染から数十年の長い潜伏期間に、感染細胞にゲノム異常やエピゲノム異常が蓄積し、クローナルな増殖能を獲得することで、発症、病態の進展に至ると考えられている。我々は ATL の発がん過程において、HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞に特徴的な DNA メチル化亢進異常が形成されること、DNA 脱メチル化薬が抗 ATL 効果を発揮することを明らかにし、DNA メチル化亢進異常が ATL 発がんに重要であると考えている。

本研究では、初めに高悪性度 ATL に進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を同定し、低悪性度 ATL 患者由来の DNA にてその部位のメチル化がその後の病態の進展を反映するか検討した。その結果、いくつかの遺伝子において、病態の進展した患者さんでは、くすぶり型 ATL の時点で既にメチル化が高い傾向が認められ（図 1）、リスク診断に有用である可能性が示された。今後は、その他の患者情報（年齢、ウイルス感染量や可溶性 IL-2 受容体量等）と統合解析し、いくつかの CpG 部位のメチル化値を組み合わせることで、より精度の高いリスク診断法の開発に向けて研究を継続する。

また、DNA 脱メチル化薬の抗 ATL 効果を高めるために、EZH タンパク質阻害薬との併用効果を検討したところ、併用により、ERK タンパク質の脱リン酸化酵素である DUSP5 の発現誘導を伴い、抗腫瘍効果の増強が確認された（図 2）。興味深いことに、ATL の発がん時に DUSP5 の遺伝子発現は抑制されており、DUSP5 が抑制されることで、HTLV-1 感染細胞の細胞増殖能が亢進すると考えられる。併用により抑制されていた DUSP5 の発現が回復することで、抗腫瘍効果が発揮されたと考えられる。EZH タンパク質の阻害薬として valemetostat が昨年、再発・難治性 ATL に対して日本で承認された。EZH 阻害薬と DNA 脱メチル化薬の併用は ATL の治療成績向上に貢献できると考えられる。

ATL 発がんにおいて DNA メチル化亢進異常は HTLV-1 の感染から徐々に蓄積していくため、DNA メチル化の蓄積を抑制できれば、ATL の発症や病態の進展の予防につながると期待される。しかしながら、ATL は HTLV-1 に起因するヒトの疾患であるため、マウスモデルの作製は容易ではない。そこで、DNA 脱メチル化薬の発がん予防効果を検討するため、本研究では、内在性レトロウイルスが発がんに関与するとされるリンパ腫を自然発症する AKR マウスを用いて OR-2100 のがん予防効果を検討した。OR-2100 はこれまでにいくつかのマウスモデルにて既存の DNA 脱メチル化薬と比較して血液毒性が低く表れることが示されている［1，2］。今回の検討においても OR-2100 は 400 日を超えて安定した長期投与が可能であり、AKR マウスの生存も大きく延長した（図 3）。今後は AKR マウスの発がんにおいて DNA メチル化異常がどのように関与し、また DNA 脱メチル化薬がどのような機序で腫瘍細胞の増殖を抑制するのか検討したい。さらに、AKR マウスにおけるリンパ腫の自然発症では、異種移植モデルで使用される免疫不全マウスと異なり、DNA 脱メチル化薬が免疫細胞やがん微小環境に与える影響も解析できるため、併せて研究を行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究において、網羅的 DNA メチル化解析は共同研究者である星薬科大学先端生命科学研究所エピゲノム創薬研究室の牛島俊和先生（星薬科大学学長）、服部奈緒子先生、前橋工科大学工学部の山下聡先生にご支援を頂きました。最後になりましたが、本研究に助成いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Watanabe T, Yamashita S, Ureshino H, Kamachi K, Kurahashi Y, Fukuda-Kurahashi Y, Yoshida N, Hattori N, Nakamura H, Sato A, Kawaguchi A, Sueoka-Aragane N, Kojima K, Okada S, Ushijima T, Kimura S, Sueoka E. Blood. Targeting aberrant DNA hypermethylation as a driver of ATL leukemogenesis by using the new oral demethylating agent OR-2100. 2020 Aug 13;136(7):871-884. doi: 10.1182/blood.2019003084. PMID: 32391874

2) Ureshino H, Kurahashi Y, Watanabe T, Yamashita S, Kamachi K, Yamamoto Y, Fukuda-Kurahashi Y, Yoshida-Sakai N, Hattori N, Hayashi Y, Kawaguchi A, Tohyama K, Okada S, Harada H, Ushijima T, Kimura S. Silylation of Deoxynucleotide Analog Yields an Orally Available Drug with Antileukemia Effects. Mol Cancer Ther. 2021 Aug;20(8):1412-1421. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-1125. PMID: 34045225

3) Kurahashi Y, Watanabe T, Yamamoto Y, Ureshino H, Kamachi K, Yoshida-Sakai N, Fukuda-Kurahashi Y, Yamashita S, Hattori N, Nakamura H, Kawaguchi A, Ushijima T, Sueoka E, Kimura S. Dual targeting of aberrant DNA and histone methylation synergistically suppresses tumor cell growth in ATL. Blood Adv. 2023 Apr 25;7(8):1545-1559. doi: 10.1182/bloodadvances.2022008362. PMID: 36516085