

BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の
性状解析および BET 阻害剤耐性化機序の解明

2021 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

甘利 圭悟

課程博士學位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) : 甘利圭悟 (Keigo Amari)

学位論文題目 : BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の性状解析
および BET 阻害剤耐性化機序の解明

序章

急性白血病は血球細胞の分化異常により骨髓内で未熟な芽球細胞が増殖することで起こる造血器腫瘍である。化学療法や造血幹細胞移植による治療法の確立により急性白血病の生存率は改善したが、特定の種類の白血病、特に *mixed-lineage leukemia (MLL)* 遺伝子に転座が生じた MLL 遺伝子関連白血病の再発率は高く予後不良であるため、新規治療法の開発が望まれている。

近年、MLL 遺伝子関連白血病に対する治療標的として、*bromodomain and extra-terminal domain (BET)* ファミリータンパク質が注目されている。BET ファミリータンパク質はヒストンのアセチル化されたリジン残基を認識し、様々な標的遺伝子の転写をエピジェネティックに制御する分子である。BET ファミリータンパク質の 1 つである *bromodomain-containing protein 4 (BRD4)* は、MLL 遺伝子の転座により生じた MLL 融合タンパク質複合体を構成する分子の 1 つであり、*HOXA9* や *MYC* の転写を亢進させることで白血病の発症に関与している。BET ファミリータンパク質を標的とした BET 阻害剤である I-BET151 が MLL 遺伝子関連白血病細胞に有効であることが報告されて以来、様々な BET 阻害剤が開発され、臨床試験も進行中であり、BET 阻害剤は有望な治療薬として期待されている。しかしながら、BET 阻害剤の長期使用による耐性獲得が懸念されるため、耐性化機序を解明することは重要な課題である。

そこで本研究では、BET 阻害剤である OTX015 に耐性を持つ MLL 遺伝子関連白血病細胞株を樹立し、その性状解析と性状に基づいた新規の BET 阻害剤耐性化機序の探索を行った。

第 1 章 BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立およびその性状解析

マウスおよびヒト MLL 遺伝子関連白血病細胞株 (MLL-AF5q31、MV4;11) に対して、OTX015 含有培地で長期間培養し BET 阻害剤耐性株を樹立した。樹立した耐性株は、OTX015 だけでなく JQ-1 や I-BET151 といった他の BET 阻害剤に対しても耐性を示し、感受性株で細胞死が誘導される OTX015 濃度 (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM) でも細胞周期の停止やアポトーシスの誘導は認められなかった。

次に、qRT-PCR 法による mRNA 発現およびウエスタンブロット法を用いたタンパク質発現の解析により耐性株の性状を調べた。耐性株では、BET 阻害剤の標的である BRD4 のタンパク質発現が顕著に上昇しており、さらに BRD4 が発現を制御している *c-MYC*、*CDK6*、*BCL-2* の mRNA およびタンパク質の発現亢進を認めた。一方、*BRD4* の mRNA 発現については親株と耐性株の間に変化はなかった。これらの結果から、耐性株では *BRD4* タンパク質の過剰な蓄積による標的遺伝子の転写亢進により BET 阻害剤耐性を獲得することが示唆された。

BRD4 タンパク質はユビキチン・プロテアソーム系によりその分解が制御されている。樹立した耐性株とその親株において、既報で見られる BRD4 の分解を制御する分子である speckle type BTB/POZ protein (SPOP) や deubiquitinating protein 3 (DUB3) の発現に差は認められなかったが、脱ユビキチン化酵素である ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 (UCHL5) の発現が耐性株において上昇していることを発見した。この結果より、耐性株における BRD4 タンパク質の過剰発現は、UCHL5 による BRD4 の分解抑制を介して起こり得ることが示唆された。

第2章 BRD4 タンパク質の分解に着目した BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病における耐性化機序の解析

前章で明らかとなった耐性株における UCHL5 の発現上昇が、BRD4 タンパク質の分解および耐性株の増殖に関与しているかを明らかにするために、UCHL5 に対する shRNA を耐性株に導入することで UCHL5 ノックダウン細胞株を作製し、BRD4 発現および細胞増殖における影響を検証した。その結果、UCHL5 のノックダウンにより耐性株における BRD4 タンパク質の発現が顕著に減少し、細胞増殖が抑制された。次に UCHL5 阻害剤である b-AP15 を処置したところ、BRD4 タンパク質発現は減少し、細胞増殖抑制、アポトーシスが誘導された。さらに、UCHL5 の阻害が耐性株における OTX015 の感受性を回復させるかどうかを検証するため、b-AP15 の前処置後 OTX015 の細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、b-AP15 を前処置することにより、耐性株における OTX015 の感受性は一部回復した。以上のことから、UCHL5 は BRD4 タンパク質の分解に関与しており、UCHL5 の阻害により BRD4 タンパク質の発現を減少させることが BET 阻害剤耐性の克服につながることを示唆された。

脱ユビキチン化酵素の機能は、転写調節やリン酸化などの翻訳後修飾により厳密に制御されている。UCHL5 は細胞周期の進行に関与する E2 promotor binding factor 1 (E2F1) により発現が制御されることが報告されている。E2F1 の機能は CDK4/6-Cyclin D 複合体による retinoblastoma transcriptional corepressor (RB) のリン酸化に依存することから、BET 阻害剤耐性株における UCHL5 の制御機構について、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib を用いて検証した。その結果、Abemaciclib 処置により、UCHL5 の発現低下を認めた。また、Abemaciclib 処置により BRD4 タンパク質の発現が低下し、BRD4 が制御する分子である c-MYC、CDK6、BCL-2 のタンパク質発現も低下した。さらに、Abemaciclib は OTX015 耐性株の細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導し、Abemaciclib の併用により OTX015 に対する感受性が上昇した。これらの結果から、BET 阻害剤耐性株において、UCHL5 は CDK4/6 によって発現が制御されており、CDK4/6 阻害剤は BET 阻害剤耐性を克服する薬剤になり得ることが示唆された。

総括

本研究により、MLL 遺伝子関連白血病細胞株の BET 阻害剤耐性化において、CDK4/6 と UCHL5 からなる BRD4 タンパク質分解抑制経路が重要な1つであることを明らかにした。本研究の成果は、BET 阻害剤の薬剤耐性という課題への対策に資する重要な知見である。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表データを含んでいる。

- 1) Keigo Amari, Satoru Sasagawa, Natsuki Imayoshi, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Toshihiko Imamura, Eishi Ashihara. The CDK4/6-UCHL5-BRD4 axis confers resistance to BET inhibitors in MLL-rearranged leukemia cells by suppressing BRD4 protein degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 588, 147-153. [第 1 章、第 2 章]. Copyright Elsevier

目次

序論.....	1
第1章 BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立およびその性状解析	
第1節 緒言.....	7
第2節 実験方法.....	8
1-2-1. 使用細胞および試薬.....	8
1-2-2. MLL 遺伝子関連白血病細胞株に対する細胞増殖能の評価.....	8
1-2-3. OTX015 耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立.....	8
1-2-4. 細胞周期解析.....	8
1-2-5. アポトーシス解析.....	9
1-2-6. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法による mRNA 発現解析.....	9
1-2-7. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析.....	9
1-2-8. 統計解析.....	10
第3節 実験結果.....	11
1-3-1. OTX015 耐性株の細胞増殖能、細胞周期および細胞死に対する各種 BET 阻害剤の影響.....	11
1-3-2. OTX015 耐性株における BRD4 および BRD4 関連分子の発現変化.....	16
1-3-3. OTX015 耐性株におけるユビキチン関連分子の発現変化.....	20
第4節 考察.....	23
第2章 BRD4 タンパク質の分解に着目した BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病における耐性化機序の解析	
第1節 緒言.....	25
第2節 実験方法.....	27
2-2-1. 使用細胞および試薬.....	27
2-2-2. OTX015 耐性 MV4;11 細胞における UCHL5 ノックダウンの影響についての検討.....	27
2-2-2-1. UCHL5 ノックダウン細胞株の作製.....	27
2-2-2-2. mRNA 発現評価.....	27
2-2-2-3. タンパク質発現評価.....	27
2-2-2-4. 細胞増殖能の評価.....	28
2-2-3. OTX015 耐性株に対する UCHL5 阻害剤 b-AP15 の影響についての検討.....	28
2-2-3-1. 細胞増殖能の評価.....	28
2-2-3-2. アポトーシス解析.....	28
2-2-3-3. タンパク質発現評価.....	29
2-2-4. OTX015 耐性株に対する CDK4/6 阻害剤 Abemaciclib の影響についての検討.....	29

2-2-4-1. 細胞増殖能の評価	29
2-2-4-2. アポトーシス解析	29
2-2-4-3. mRNA 発現評価	29
2-2-4-4. タンパク質発現評価	29
2-2-5. 統計解析	30
第3節 実験結果	31
2-3-1. OTX015 耐性株における UCHL5 阻害の影響についての検討	31
2-3-2. CDK4/6 に着目した OTX015 耐性株における UCHL5 制御機構の検討	38
第4節 考察	43
総括	45
謝辞	47
引用文献	48
Supplementary information	57

略語一覽表

AL	acute leukemia
AML	acute myeloid leukemia
ALL	acute lymphoblastic leukemia
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
BCL-2	B-cell/CLL lymphoma 2
KMT2A	lysine methyltransferase 2A
MLL	mixed-lineage leukemia
Menin	tumor suppressor associated with multiple endocrine neoplasia type 1
SET	suppressor variegation/Enhancer of zeste/Trithorax
HOXA9	homeobox protein Hox-A9
AF4	ALL-fused gene from chromosome 4
ENL	eleven nineteen leukemia
SEC	super transcriptional activation/elongation complex
DOT1L	DOT1 like histone lysine methyltransferase
BRD4	bromodomain containing 4
P-TEFb	positive-transcription elongation factor b
BET	bromodomain and extra-terminal
ET	extra-terminal domain
CTD	C-terminal domain
LSC	leukemic stem cells
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
ATCC	American Type Culture Collection
FBS	fetal bovine serum
OTX015-R	OTX015-resistant cells
OTX015-S	OTX015-sensitive cells
IC ₅₀	the 50% inhibitory concentration
PI	propidium iodide
PBS	phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
cDNA	complementary DNA
MLL-r	MLL-rearrangement
DMSO	dimethyl sulfoxide
h	hours
SEM	standard error of the mean
FCM	flow cytometry
UPS	ubiquitin-proteasome system

SPOP	speckle type BTB/POZ protein
DUB3	deubiquitinating protein 3
UCHL5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5
ITD	internal tandem duplication
TGF- β	transforming growth factor- β
TCF7	transcription factor 7
ROS	reactive oxygen species
shRNA	small hairpin RNA
E2F1	E2 promotor binding factor 1
RB	retinoblastoma transcriptional corepressor
Tx	treatment

序論

急性白血病 (acute leukemia; AL) は、骨髄中において骨髄系・リンパ系の幹細胞および前駆細胞の分化異常により、未熟な芽球細胞 (白血病細胞) が無秩序に増殖して起こる造血器腫瘍であり、増殖する細胞の種類によって急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) と急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) に分類される。AML は高齢者、ALL は小児に多く発症し、その割合は高齢者において AML:ALL=4:1、小児において AML:ALL=1:4 である (1, 2)。臨床症状は多彩であり、増殖した白血病細胞の骨髄内占拠による貧血や出血傾向、白血球減少とそれに伴う易感染性、白血病細胞がリンパ節や臓器に入り込むことによる臓器腫大等が見られ、適切な治療がなされない場合は、感染症や出血により短期間で致命的となる重篤な疾患であるため、早期の治療が求められる。

AL の治療は、骨髄中の白血病細胞の割合が 5%以下の状態である完全寛解を目指し、寛解導入療法、地固め療法、維持療法の 3 つの段階で行われるのが標準的である。寛解導入療法は、複数の抗悪性腫瘍薬を組み合わせた多剤併用化学療法が行われており、AML ではシタラビンとアントラサイクリン系抗悪性腫瘍薬の併用療法 (3)、ALL ではアントラサイクリン系抗悪性腫瘍薬、ビンクリスチン、プレドニゾロン、L-アスパラキナーゼ、シクロホスファミドなどを組み合わせた治療が主に行われている (4)。地固め療法および維持療法は、寛解導入療法と同じ多剤併用化学療法に加えて、同種造血幹細胞移植が推奨されており、多剤併用化学療法と造血幹細胞移植を組み合わせた患者に対する完全寛解率は約 90%、5 年生存率は約 50~60%と良好である (5)。また、近年は白血病の病態に関わるタンパク質をターゲットにした分子標的治療薬の開発が精力的に進められており、AML では *fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* 阻害薬であるギルテリチニブ (6) や *B-cell/CLL lymphoma 2 (BCL-2)* 阻害薬であるベネトクラクス (7)、ALL では *BCR-ABL* チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブやダサチニブ (8) が登場し、AL の治療成績はこの数十年で改善傾向にある。しかしながら、白血病のタイプによっては、標準的な治療法で非寛解または再発を繰り返す難治性のタイプも存在しており、*lysine methyltransferase 2A (KMT2A)* 遺伝子 (別名 *mixed-lineage leukemia: MLL* 遺伝子) に転座が生じた *MLL* 遺伝子関連白血病はその 1 つである。*MLL* 遺伝子関連白血病は AL 全体の約 5~10%に見られ、乳児 AML の約 30%、乳児 ALL の約 80%と乳児に多いことが特徴的である。現状の *MLL* 遺伝子関連白血病の治療は、他の AL と同じ多剤併用化学療法と同種造血幹細胞移植により行われるが、*MLL* 遺伝子の転座のある ALL では *MLL* 遺伝子転座を認めないものと比べ、5 年生存率ならびに 5 年無症候生存率が低いことが報告されている (9)。また、European Leukemia Net (ELN) が 2017 年に発表した AML における遺伝子異常の種類によるリスク分類では、*MLL* 遺伝子の転座を伴う AML は予後不良型に分類されている (10)。このように、*MLL* 遺伝子関連白血病は有効な治療薬がなく予後不良のため、さらなる病態解析による新規治療法の開発が求められている。

MLL 遺伝子は、3,969 個のアミノ酸をコードし、N 末端に tumor suppressor associated with multiple endocrine neoplasia type 1 (Menin) 結合領域および DNA binding motif that binds adenosine- thymidine (AT)-rich DNA (AT hook)、中央部分に plant homeodomains (PHD) finger と

呼ばれる DNA 結合領域、C 末端に suppresser variegation/Enhancer of zeste/Trithorax (SET) ドメインをはじめとした転写活性化領域を持つ (11)。MLL タンパク質は、タンパク分解酵素 Taspase1 により N 末端 (MLL^N) と C 末端 (MLL^C) に分かれることで成熟し (12)、造血細胞の分化、成熟に必要な *homeobox protein Hox-A9 (HOXA9)* をはじめとした *HOXA* 群遺伝子のプロモーター部位に直接結合することで発現を調節している (13)。また、C 末端の SET ドメインはヒストン H3 lysine 4 (H3K4) に対するヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を持ち、*HOXA9* などの下流の遺伝子の転写を制御している (13, 14)。MLL タンパク質は様々なタンパク質と複合体を形成することが報告されており、Menin やヒストンアセチルトランスフェラーゼである CREB-CREB-binding protein (CBP)/p300 と相互作用することで遺伝子発現を厳密に制御している (15, 16)。

MLL 遺伝子は現在 90 種類以上のパートナー遺伝子と相互転座を起こすことが報告されている (17) (Figure 1)。その中でも、*ALL1-fused gene from chromosome 4 protein (AF4)*、*AF9*、*eleven nineteen leukemia protein (ENL)*、*AF10* との相互転座が全体の約 80% を占めており、AML では *AF9* との転座が約 30%、ALL では *AF4* との転座が約 60% と最も多い。*AF4*、*AF9*、*AF10*、*ENL* は 1 つの巨大なタンパク複合体 (super transcriptional activation/elongation complex; SEC) の一部であり、核内に局在している (18)。SEC はヒストンメチルトランスフェラーゼである DOT1 like histone lysine methyltransferase (DOT1L) をリクルートすることが知られており、相互転座により *MLL-AF4* 等の融合遺伝子が生じると、SEC がリクルートした DOT1L により、*HOXA9* 遺伝子のプロモーター領域における H3K79 がメチル化されることで遺伝子の発現様式に影響を及ぼし、白血病の発症につながる (19–21)。また、SEC を構成する分子の 1 つである bromodomain-containing protein 4 (BRD4) は、ヒストンのアセチル化されたリジン残基を認識することで、がん遺伝子である *MYC* 等の転写を制御している。BRD4 は cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) と Cyclin T1 の複合体からなる positive-transcription elongation factor b (p-TEFb) のリクルートにも関与する。P-TEFb は標的遺伝子の転写時に働く RNA ポリメラーゼIIをリン酸化し、RNA ポリメラーゼIIによる標的遺伝子の転写を活性化させている (22, 23) (Figure 2)。

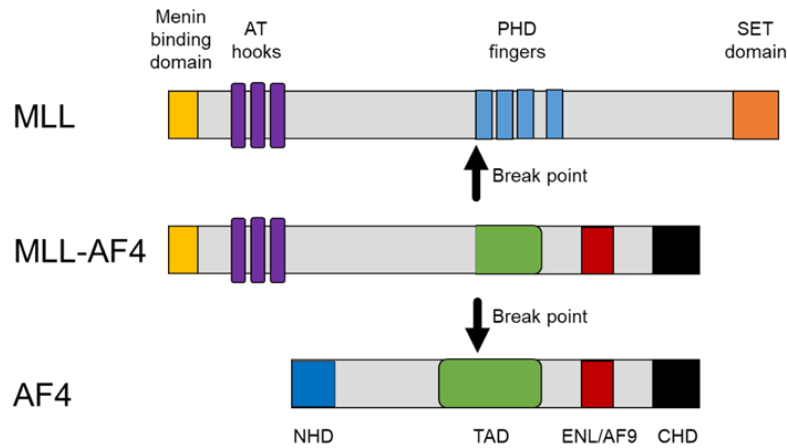


Figure 1. Schematic structures of MLL, AF4 and MLL-AF4 fusion protein.

MLL-AF4 fusion gene is generated by the cleavage and reciprocal chromosome translocation of MLL and AF4. Vertical arrows indicate break point at the stage of chromosome translocation. NHD, N-terminal homology domain; TAD, transactivation domain; ENL/AF9, ENL/AF9 binding domain; CHD, C-terminal homology domain; PHD, plant homeodomains.

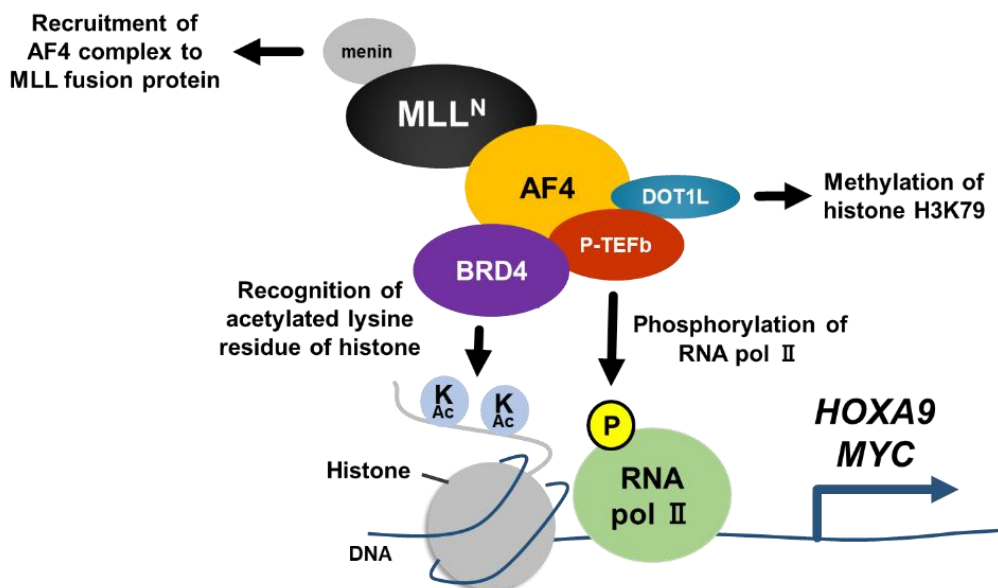


Figure 2. Schematic structures of MLL fusion complex.

Chromosomal translocations involving the *MLL* gene generate MLL-fusion proteins that can recruit transcriptional activation complexes, such as SEC composed of DOT1L and BRD4. Menin involves the recruitment of AF4 complex to MLL fusion protein. DOT1L is responsible for the mono- /di- /tri-methylation of lysine 79 of histone H3K79 (H3K79me1/2/3). BRD4 involves the recruitment of P-TEFb, which phosphorylates RNA polymerase II and promotes transcriptional activation of oncogenic genes, such as *HOXA9* and *MYC*. RNA pol II, RNA polymerase II; K, lysine residue; Ac, acetylation; P, phosphorylation.

MLL 遺伝子関連白血病に対する分子標的治療薬は、2005 年に MLL 融合遺伝子から MLL 融合タンパク質への発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドが報告されたことに端を発し (24)、MLL 融合タンパク質複合体の構造に基づいた薬剤が開発されてきた。DOT1L 阻害剤は開発初期から MLL 遺伝子関連白血病細胞に対する有効性が報告されたが、残念ながら臨床試験においては有効性が実証されなかった (25, 26)。そのため、新たな治療標的分子の探索は急務の課題であり、bromodomain and extra-terminal (BET) ファミリータンパク質、Menin や SET ドメインタンパク質などが注目されている (27–29)。

BET ファミリータンパク質を標的とした BET 阻害剤は、近年 MLL 遺伝子関連白血病に対する開発が活発に行われている薬剤の 1 つである。BET ファミリータンパク質は、BRD2、BRD3、BRD4、精巣特異的に発現する bromodomain testis-specific protein (BRDT) の 4 つからなり (Figure 3)、ヒストンのアセチル化されたリジン残基を認識するブロモドメインおよび glioma tumor suppressor candidate region gene 1 (GLTSCR1) やヒストンアルギニンジメチラーゼである jumonji domain containing 6 (JMJD6) をはじめとした転写修飾因子との結合部位である extra-terminal domain (ET) (30) を共通に持つ。また、BRD4 は P-TEFb との結合に必須である C-terminal domain (CTD) を有しており (31)、CTD による P-TEFb のリクルートを介して、RNA ポリメラーゼIIによる遺伝子転写を制御している。BRD4 が転写を制御する遺伝子は、様々ながんの発症に寄与するがん遺伝子である MYC をはじめとして、細胞周期の進行に関与する CDK4/6 や CCND1、抗アポトーシス遺伝子である BCL2 など多岐にわたる。一方で、BRD2 および BRD3 は CTD を持っていないため、P-TEFb 非依存的な標的遺伝子の転写に関与しており、BRD2 では *signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)* 遺伝子、BRD3 では GATA1 と協働して赤血球や巨核球の分化に関わる遺伝子の転写を制御している (32, 33)。2010 年に、BET ブロモドメインが MLL 遺伝子関連白血病に対する有効な治療標的であると初めて報告され、BET ファミリータンパク質を標的とした初の BET 阻害剤として JQ-1 が開発された (34)。その後、構造の異なる BET 阻害剤が次々に開発され (35–42)、MLL 遺伝子関連白血病における有効性が報告されている (36, 37, 40, 42)。さらに OTX015 をはじめとした複数の BET 阻害剤が造血器腫瘍において臨床試験に進んでおり (Table 1)、BET 阻害剤は有望な新規治療薬として期待されている。

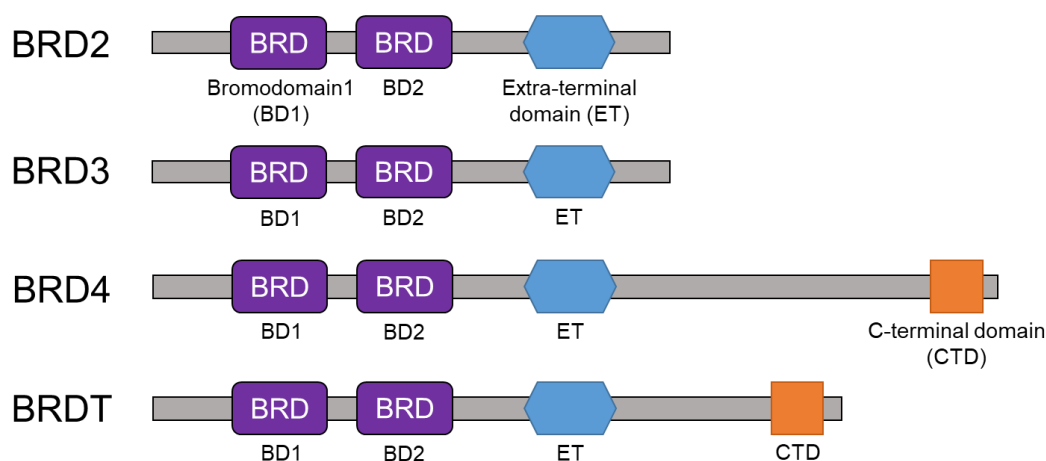


Figure 3. Molecular structures of BET bromodomains.

BET family consists of four mammalian members, including BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT. BET family proteins share a common domain architecture comprising two bromodomains, an extra-terminal domain and an extra-C terminal domain.

Table 1. Bromodomain inhibitors in clinical development of hematological malignancies.

Compound	Company or Institute	Phase	Indications in development	ClinicalTrials.gov identifier (status)
OTX015 (Birabresib)	Oncoethix	I	Acute myeloid leukemia Diffuse large B-cell lymphoma Acute lymphoblastic leukemia Multiple myeloma	NCT01713582 (completed)
BMS-986158	Dana-Farber Cancer Institute	I	Lymphoma	NCT03936465 (recruiting)
CPI-0610	Constellation Pharmaceuticals	I	Progressive lymphoma	NCT01949883 (completed)
		I	Multiple myeloma	NCT02157636 (completed)
RO6870810	Hoffmann-La Roche	I	Multiple myeloma	NCT03068351 (completed)
CC-90010	Celgene	I	Lymphoma, Non-Hodgkin	NCT03220347 (recruiting)
PLX51107	M.D. Anderson Cancer Center	I	Acute myeloid leukemia Myelodysplastic Syndrome	NCT04022785 (recruiting)

しかしながら、薬物治療の重要な問題の 1 つに、薬剤耐性細胞の出現が挙げられる。BET 阻害剤が臨床で使用され始めた場合、長期使用による薬剤耐性の獲得が懸念されるため、その問題の対策に資する知見を得ることは重要な課題である。本研究では、BET 阻害剤に対する獲得耐性を克服する治療戦略を考案することを目的として、BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株を樹立した。得られた耐性株について性状を解析し、性状に基づいた BET 阻害剤耐性化機序の検討を行った。

第1章 BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立およびその性状解析

第1節 緒言

MLL 遺伝子関連白血病に対する BET 阻害剤の有効性が報告されて以来、BET 阻害剤の開発は大きく進み、一部の BET 阻害剤については造血器腫瘍において臨床試験が行われていることから、BET 阻害剤は有望な治療薬の候補として期待されている。しかしながら、がん細胞に対する薬物治療の重要な問題の1つに、薬剤耐性細胞の出現が挙げられる。BET 阻害剤が臨床で使用され始めた場合、長期使用による薬剤耐性の獲得が懸念されるため、その問題の対策に資する知見を得ることは重要な課題である。

がん細胞に薬剤耐性が生じる原因の1つとして、元々その薬剤に対して耐性を持つ細胞集団が存在する状態が考えられる。これを初期耐性と呼び、主にがん細胞の内因的要因により細胞死を回避することで残存する。白血病においては、薬物治療後に残存する白血病幹細胞 (leukemic stem cells; LSC) が初期耐性に大きく寄与している。AML における LSC は CD34⁺CD38⁻細胞分画に存在すると考えられており (43-46)、CD34⁺CD38⁻細胞分画では AMP-activated protein kinase-Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (AMPK-ULK1) を介したオートファジーの活性化により、BET 阻害剤である JQ-1 による細胞死に抵抗性を示したことから、LSC は BET 阻害剤に対する初期耐性にも関与することが示唆されている (47)。一方で、薬剤に対して感受性を有する細胞が低濃度の薬剤暴露により残存し、薬剤耐性を獲得していく場合がある。これを獲得耐性と呼び、塩基配列の点変異をはじめとした遺伝子変異や薬剤の標的タンパク質における立体構造の変化、代替シグナルの活性化など耐性化機序は多岐にわたる。AL における BET 阻害剤に対する獲得耐性については、 β -catenin の発現上昇に伴う Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化により、BRD4 に代わって MYC 遺伝子等の転写を亢進させている報告 (48, 49) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) シグナル経路の関与を示唆する報告 (50) があるが、それらの報告においても他のシグナル経路の関与が示唆されており、さらなる耐性化機序の解明が必要である。本章では、現在臨床試験が進められており、臨床応用がなされる可能性の高い BET 阻害剤である OTX015 に着目し (51, 52)、OTX015 を MLL 遺伝子関連白血病細胞株に長期間処置することで BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株を新たに樹立した。また、樹立した耐性株について性状を解析することで、BET 阻害剤耐性に寄与し得る分子を探索した。

第2節 実験方法

1-2-1. 使用細胞および試薬

本研究では、MLL 遺伝子関連白血病細胞株として、マウス骨髄 lineage 陰性細胞に *MLL-AF5q31* 融合遺伝子を導入した MLL-AF5q31 細胞 (53) および *MLL* 遺伝子と *AF4* 遺伝子の転座が生じたヒト AML 細胞株である MV4;11 細胞 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, USA) を用いた。MLL-AF5q31 細胞は、10%非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン) (FUJIFILM 和光純薬株式会社, 大阪) を含む roswell park memorial institute (RPMI) 1640 (FUJIFILM 和光純薬株式会社) で培養した。MV4;11 細胞は、10% FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、4mM L-グルタミン (ナカライテスク株式会社, 京都) を含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Sigma-Aldrich) で培養した。全ての細胞は 37°C、20% O₂、5% CO₂、75% N₂ の環境下で培養した。BET 阻害剤である OTX015 は MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)、JQ-1 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、I-BET151 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) からそれぞれ購入した。

1-2-2. MLL 遺伝子関連白血病細胞株に対する細胞増殖能の評価

細胞増殖能は Cell Count Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES, 熊本) を用いた WST-8 assay により評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を、96-well プレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に各 well あたり 1.0×10^3 cells/well (MLL-AF5q31) または 1.0×10^4 cells/well (MV4;11) の密度で播種し、BET 阻害剤の段階希釈液とともに 72 時間暴露した。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に 10 µL ずつ処置し、マイクロプレートリーダー (GloMax: Promega, Madison, WI, USA) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。50% の細胞増殖阻害濃度 (50% inhibitory concentration; IC₅₀) の値は、非線形回帰プログラム CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK) を使用して算出した。

1-2-3. OTX015 耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の樹立

OTX015 耐性細胞 (OTX015-R) は、MLL-AF5q31 細胞および MV4;11 細胞を OTX015 含有培養培地で長期間培養することにより樹立した。培地に加える OTX015 の濃度は、WST-8 assay により算出したそれぞれの親株に対する 50%の細胞増殖阻害濃度である IC₅₀ の濃度から開始した。生存率が 90%以上となるまで培養し、90%以上の生存率が維持された後に OTX015 の濃度を段階的に上げて培養を続けた。最終的に、MLL-AF5q31 細胞については 5 µM、MV4;11 については 250 nM の OTX015 含有培地下でも生存できる耐性株を作製した。OTX015 に感受性を持つ親株は OTX015-sensitive (OTX015-S) と示す。

1-2-4. 細胞周期解析

細胞周期はヨウ化プロピジウム (propidium iodide : PI, FUJIFILM 和光純薬株式会社) 染色によるフローサイトメトリー法で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL

(MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、OTX015 を処置した (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM)。24、48、72 時間後に細胞を回収し、phosphate buffered saline (PBS) (-) で洗浄後、 -20°C で氷冷した 70% エタノールで細胞を固定し、 -20°C 冷凍庫で保存した。フローサイトメトリー法での評価日には、エタノールを除いた後、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase (Sigma-Aldrich) を含む PBS (-) で染色 (4°C 、30 分) し、BD LSR Fortessa flow cytometer および BD FACS Diva ソフトウェア (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。結果は FlowJo ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いてデータ分析した。

1-2-5. アポトーシス解析

薬剤により誘導されるアポトーシスの解析は、eBioscience™ Annexin-V-FITC Apoptosis Detection kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた Annexin V/PI 染色によるフローサイトメトリー法で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、OTX015 を処置した (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM)。72 時間後に細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、Annexin V、PI で染色 (室温、10 分) し、BD LSR Fortessa flow cytometer および BD FACS Diva ソフトウェアを用いて解析した。結果は FlowJo ソフトウェアを用いてデータ分析した。

1-2-6. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法による mRNA 発現解析

MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、OTX015 を処置した (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM)。1、24 時間後に細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、NucleoSpin RNA kit (タカラバイオ株式会社、草津) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を ReverTra Ace qPCR RT kit (東洋紡株式会社、大阪) を用いて complementary DNA (cDNA) に逆転写し、TaqMan real-time PCR により mRNA 転写産物を検出した。ヒト mRNA 転写産物の検出時には、THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix (東洋紡株式会社)、Taqman Probe (Thermo Fisher Scientific)、プライマーを使用した。マウス mRNA 転写産物の検出時には、Taqman master mix (Roche Diagnostics K.K., Basel, Switzerland)、UPL Universal ProbeLibrary Probes (Roche Diagnostics K.K.)、プライマーを使用した。プライマーは全て Thermo Fisher Scientific から購入した。cDNA は Thermal Cycler Dice system (タカラバイオ株式会社) により増幅させた。mRNA 発現量を補正するための内標準には *18S ribosomal RNA (18S rRNA)* を用い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により各遺伝子の mRNA 発現量を相対的に定量した。この実験で使用したプライマーならびにプローブは、Supplementary Table 1、2 に示した。

1-2-7. ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析

MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、OTX015 を処置した (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM)。MLL-AF5q31 細胞は 72 時間後、MV4;11 細胞は 48 時間後に細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、Lysis

buffer で溶解 (4°C、20 分) した。溶解後、13000 × g、4°C で 20 分間遠心し、上清を whole lysate として回収した。回収したサンプルは、Qubit Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific)、Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量を行い、4 μg/μL になるように Sample Buffer Solution (FUJIFILM 和光純薬株式会社)、滅菌超純水と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。

調製したサンプル 20 μL を用いて、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によりタンパク質発現を解析した。電気泳動 (200 V) し、poly vinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) に 100 V、90 分間で転写した。非特異的結合を防止するため、PVDF 膜を 5% non-fat dry milk (雪印メグミルク株式会社, 東京) または 5% ウシ血清アルブミン (BSA; FUJIFILM 和光純薬株式会社) 中で 1 時間反応させた。各ブロッキング剤は tris buffered saline (TBS)-Tween (pH 8.0) で溶解した。その後、一次抗体および二次抗体を処置し、免疫反応性タンパク質に対応するバンドを ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて X 線フィルム (ケアストリーム株式会社, 東京) に感光させることにより検出した。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギおよびマウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を使用した。内標準には β-actin を用いた。この実験で使用した一次抗体は Supplementary Table 3 に示した。

1-2-8. 統計解析

全ての解析は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。危険率 5% 以下を統計学的に有意差があると判定した。

第3節 実験結果

1-3-1. OTX015 耐性株の細胞増殖能、細胞周期および細胞死に対する各種 BET 阻害剤の影響

樹立した OTX015 耐性株を用いて、親株と比較した耐性株の細胞増殖能、細胞周期および細胞死に対する BET 阻害剤の影響を調べた。まず、WST-8 assay により細胞増殖能を評価した。OTX015 は、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の親株に対し、濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示したが、いずれの耐性株においても、その細胞増殖抑制効果は減弱していた (Figure 4)。また、耐性株の樹立に用いた OTX015 だけでなく、他の BET 阻害剤である JQ-1、I-BET151 も同様にいずれの耐性株においても細胞増殖抑制効果の減弱が見られた (Figure 4)。OTX015、JQ-1 および I-BET151 の 50%の細胞増殖阻害濃度である IC₅₀ は親株と比較して耐性株において増大した (Table 2)。

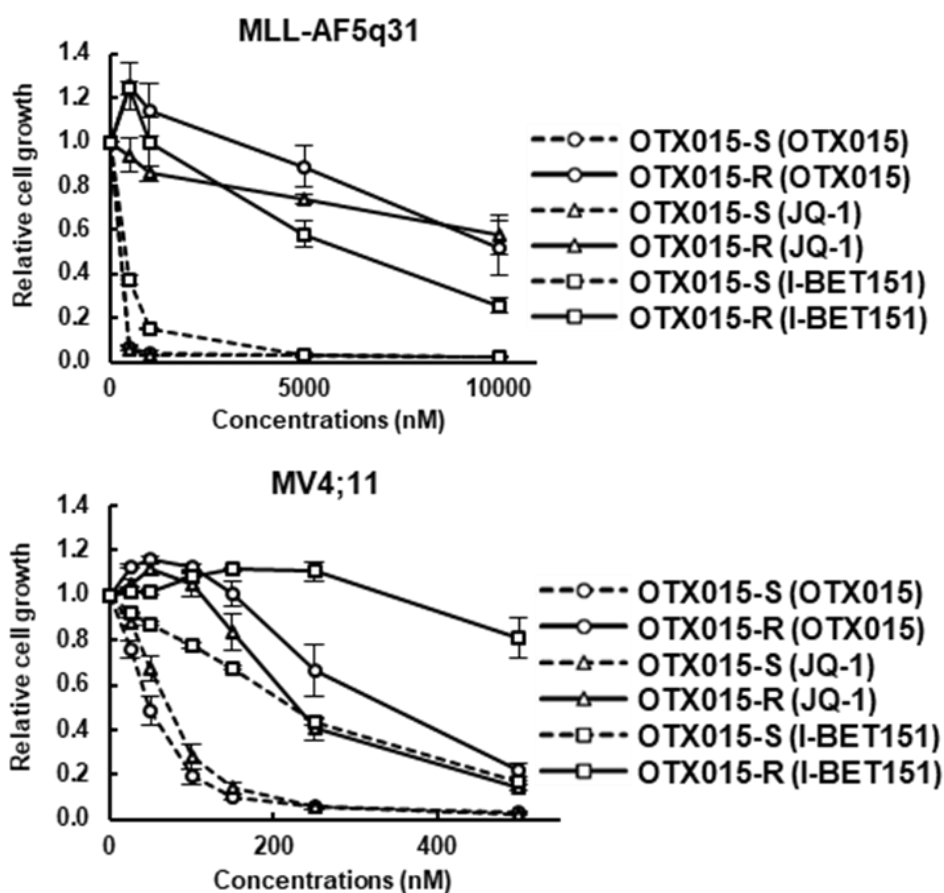


Figure 4. Effect of BET inhibitors on cell growth in MLL-r cells by WST-8 assay.

MLL-r cells were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or BET inhibitors at different concentrations for 72 h, followed by measurement of cell viability. Data represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

Table 2. IC₅₀ values of BET inhibitors in MLL-r cells.

IC ₅₀ (nM)	MLL-AF5q31		MV4;11	
	OTX015-S	OTX015-R	OTX015-S	OTX015-R
OTX015	68.9	> 10000	45.4	319.2
JQ-1	95.0	> 10000	66.4	248.7
I-BET151	351.0	5900	192.9	850.8

つぎに、耐性株の培養時に処置している濃度の OTX015 (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM) において、フローサイトメトリー法により細胞周期を評価した。親株では、OTX015 処置後 24 時間での G1 期の割合が MLL-AF5q31 細胞で約 50%、MV4;11 細胞で約 15% 増加したことから、細胞周期が停止していることが示唆された。また、いずれの細胞株においても、OTX015 処置後時間依存的に subG1 期の割合が増加し、72 時間後には MLL-AF5q31 細胞で約 25%、MV4;11 細胞で約 45% 増加したことから、DNA が断片化し細胞死が誘導されていることが示唆された。しかし、耐性株では G1 期および subG1 期の増加はいずれの細胞株においても認められなかった (Figure 5、Supplementary Figure 1)。

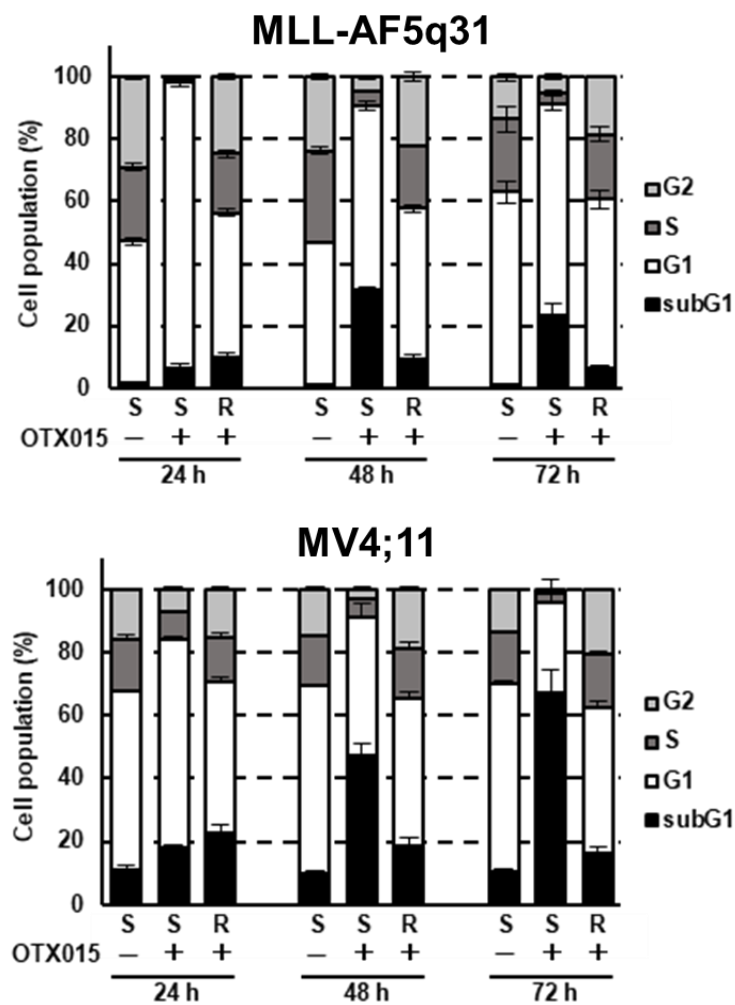


Figure 5. Effect of OTX015 on cell cycle in MLL-r cells by flow cytometry (FCM).

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, followed by analysis of cell cycle status. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

また、耐性株の培養時に処置している濃度の OTX015 において、フローサイトメトリー法によりアポトーシスを評価したところ、アポトーシスを起こしていると考えられる Annexin V 陽性細胞の割合が、MLL-AF5q31 細胞の親株では約 40%、MV4;11 細胞の親株では約 60%増加したのに対し、耐性株では OTX015 処置による増加が見られなかった (Figure 6, Supplementary Figure 2)。さらに、耐性株の培養時に処置している濃度の OTX015 において、ウエスタンブロット法により caspase-3 の活性化による切断を評価したところ、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の親株では cleaved caspase-3 の発現上昇が認められたのに対して、耐性株ではこの上昇はいずれの細胞株でも完全に消失した (Figure 7)。これらの結果から、樹立した耐性株において、BET 阻害剤の感受性が親株に比して低下しており、OTX015 による細胞周期の停止およびアポトーシスが誘導されなかったことが示された。

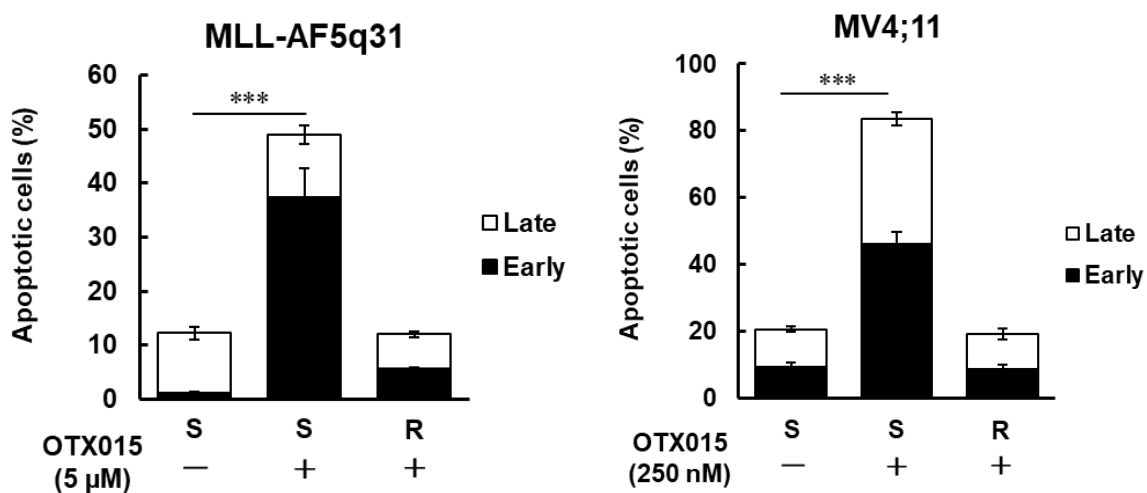


Figure 6. Effect of OTX015 on apoptosis in MLL-r cells by FCM.

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, followed by analysis of apoptosis by Annexin V/PI double staining. Annexin V⁺/PI⁻ cells indicate early apoptosis, and Annexin V⁺/PI⁺ cells indicate late apoptosis. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. Means ± SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction. *** p < 0.001.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

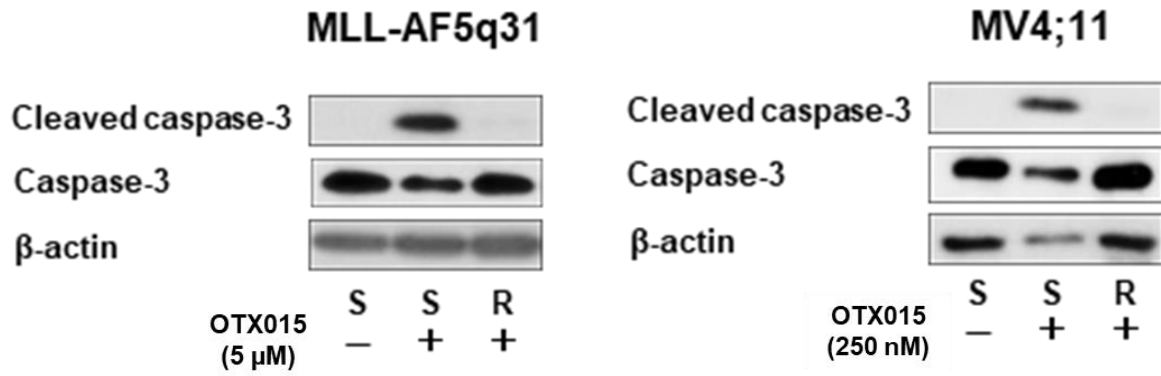


Figure 7. Evaluation of cleavage of caspase-3 in MLL-r cells by Western blotting.

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

1-3-2. OTX015 耐性株における BRD4 および BRD4 関連分子の発現変化

BET 阻害剤は、BRD4 によるヒストンのアセチル化されたリジン残基の認識を阻害することで、細胞周期の進行に関わる *MYC* や *cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)*、抗アポトーシス分子である *BCL2* 等の転写を抑制し、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を引き起こす。そこで、耐性株の培養時に処置している濃度の OTX015 (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM) において、BET 阻害剤の標的である BRD4 の発現を MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の親株と耐性株で比較したところ、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の耐性株において、BRD4 タンパク質の発現が顕著に上昇していた (Figure 8A)。BRD4 の mRNA 発現については、MLL-AF5q31 細胞においては明らかな差は認めなかったが、OTX015 耐性 MV4;11 細胞においては増加傾向が見られた (Figure 8B)。

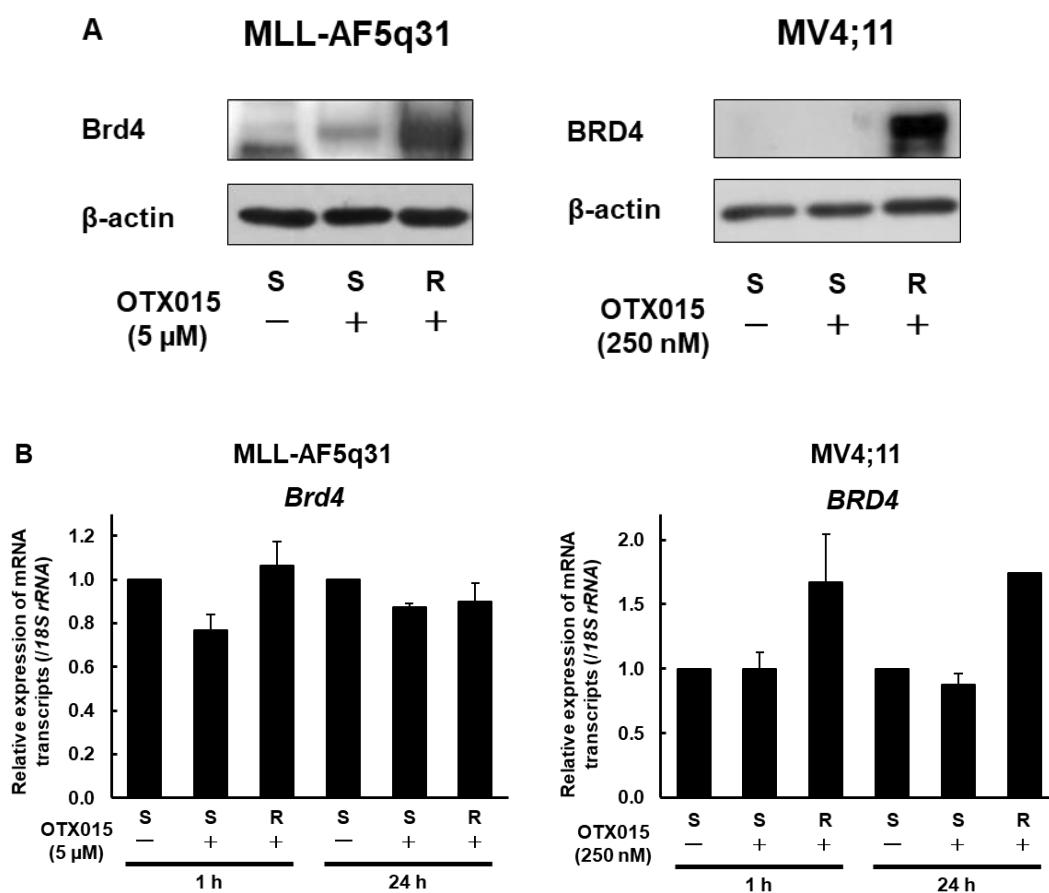
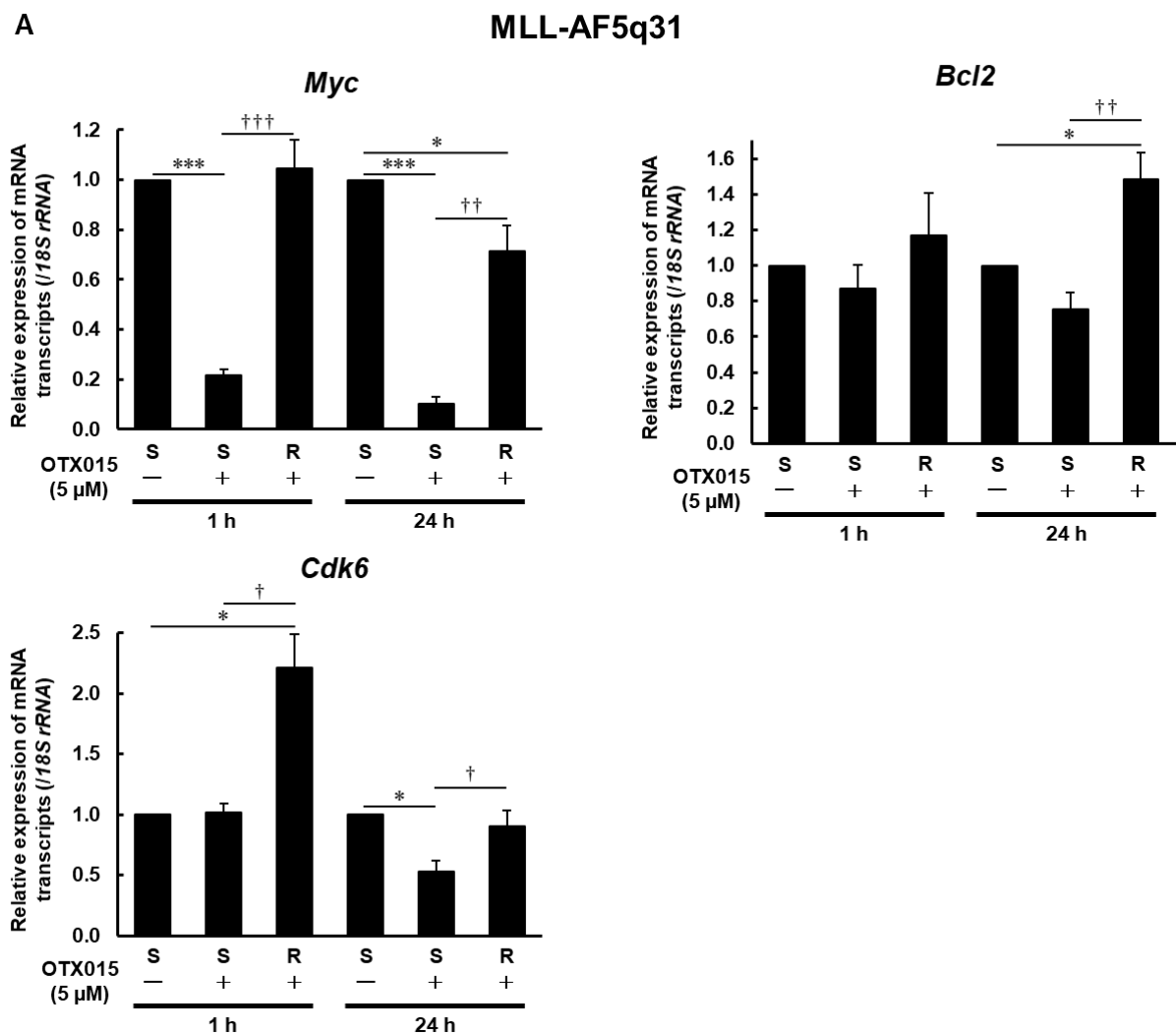


Figure 8. Alteration of expressions of BRD4 in OTX015-S and OTX015-R MLL-r cells.

(A) MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments. (B) MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, and then qRT-PCR was performed. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.

Modified from Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

次に、BRD4 の標的分子である c-MYC、CDK4/6、BCL-2 の発現を親株と耐性株で比較した。MLL-AF5q31 細胞については、親株において MYC の発現が OTX015 処置後 1 時間および 24 時間、CDK6 が処置後 24 時間で有意に低下した。BCL2 の発現は低下傾向が見られた。耐性株では、MYC の発現は親株の対照群と同程度であり、CDK6 や BCL2 の発現は親株の対照群より上昇していた (Figure 9A)。タンパク質発現は、いずれの分子も親株と比較して耐性株で顕著に上昇していた (Figure 10)。MV4;11 細胞については、親株において MYC の発現が OTX015 処置後 1 時間および 24 時間、CDK6、CDK4、BCL2 が処置後 24 時間で有意に低下した。耐性株では、MYC、BCL2 の発現は親株の対照群と同程度であった。CDK6 の発現は耐性株においても依然として低下していたが、CDK6 に代わり CDK4 の発現が親株の対照群と同程度まで上昇していた (Figure 9B)。タンパク質発現は、いずれの分子も OTX015 を処置した親株と比較し耐性株で上昇していた (Figure 10)。以上の結果から、樹立した耐性株において、BRD4 タンパク質の分解低下による過剰な蓄積が、標的遺伝子の転写亢進を起し、BET 阻害剤耐性をもたらしていることが示唆された。



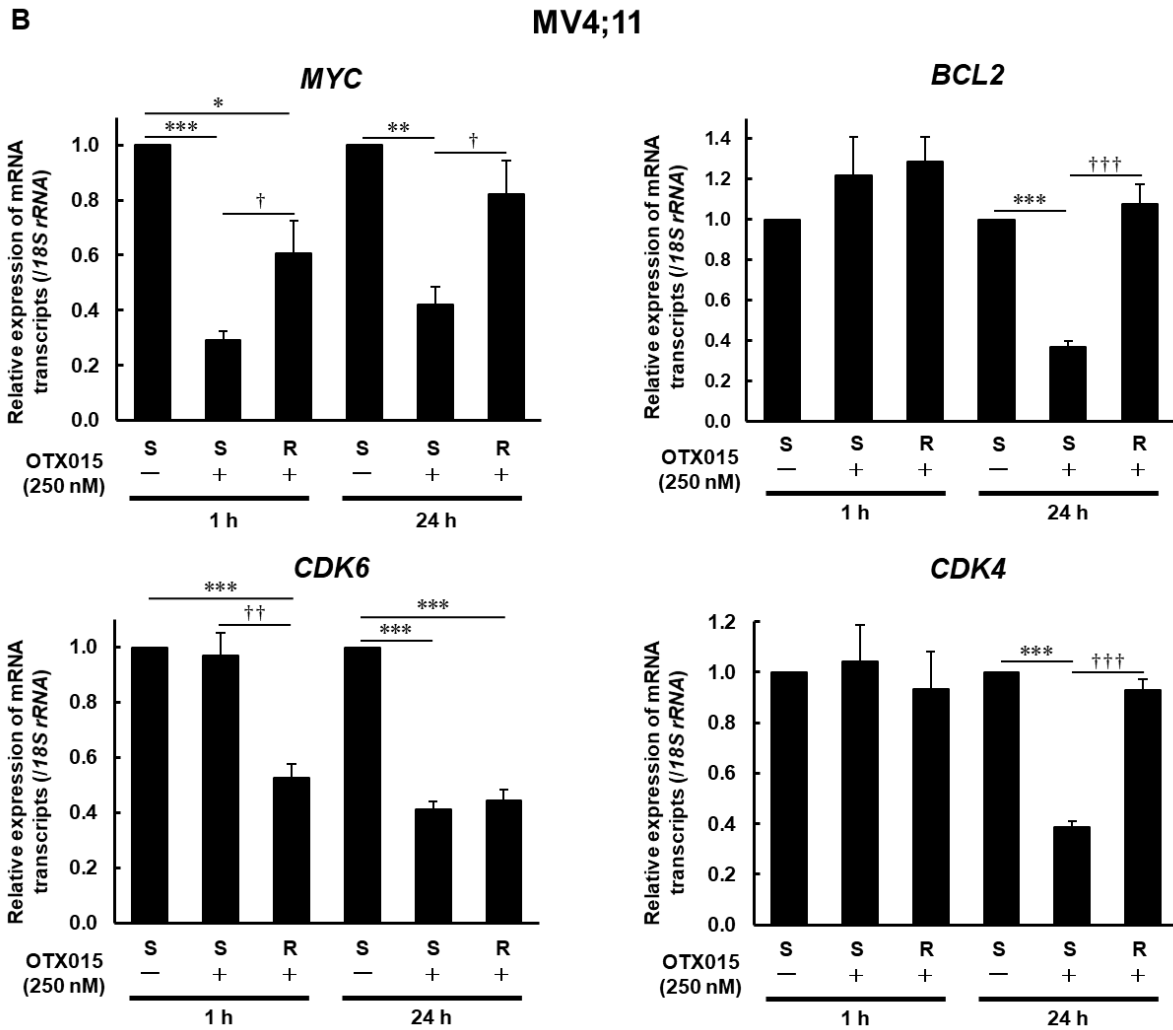


Figure 9. Alteration of mRNA expressions of BRD4-related molecules in OTX015-S and OTX015-R MLL-r cells.

(A) MLL-AF5q31 cells and (B) MV4;11 cells were treated with DMSO or OTX015, and then qRT-PCR was performed. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$.

Modified from Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

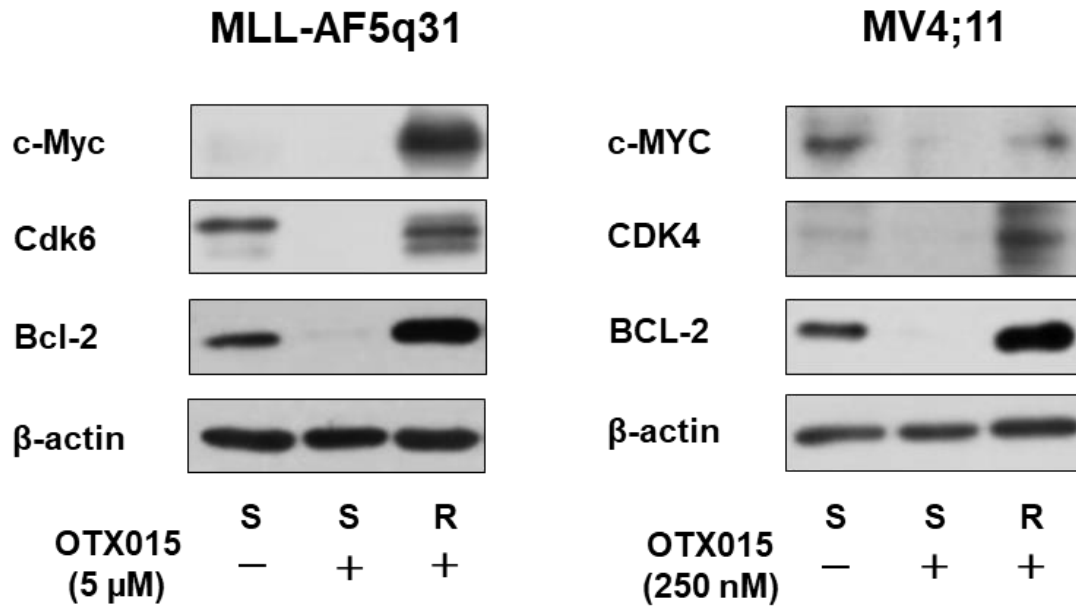


Figure 10. Alteration of protein expressions of BRD4-related molecules in OTX015-S and OTX015-R MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Modified from Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

1-3-3. OTX015 耐性株におけるユビキチン関連分子の発現変化

BRD4 タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system; UPS) によってその分解が制御されており、BRD4 タンパク質の分解に関わるユビキチン関連分子として、ユビキチンを付加するユビキチン化酵素である speckle type BTB/POZ protein (SPOP)、ユビキチンを除去する脱ユビキチン化酵素である deubiquitinating protein 3 (DUB3) が報告されている (54, 55)。しかしながら、本研究で樹立した OTX015 耐性 MLL-AF5q31 細胞において *SPOP* および *DUB3* の mRNA 発現を確認したところ、親株において 5 μ M の OTX015 処置による *SPOP* の発現変化は見られず、親株と耐性株の間にも発現の差は認められなかった。また、*DUB3* の mRNA 発現は親株、耐性株ともに発現が見られなかった (Figure 11)。この結果より、従来の報告とは異なるユビキチン関連分子の関与が示唆された。

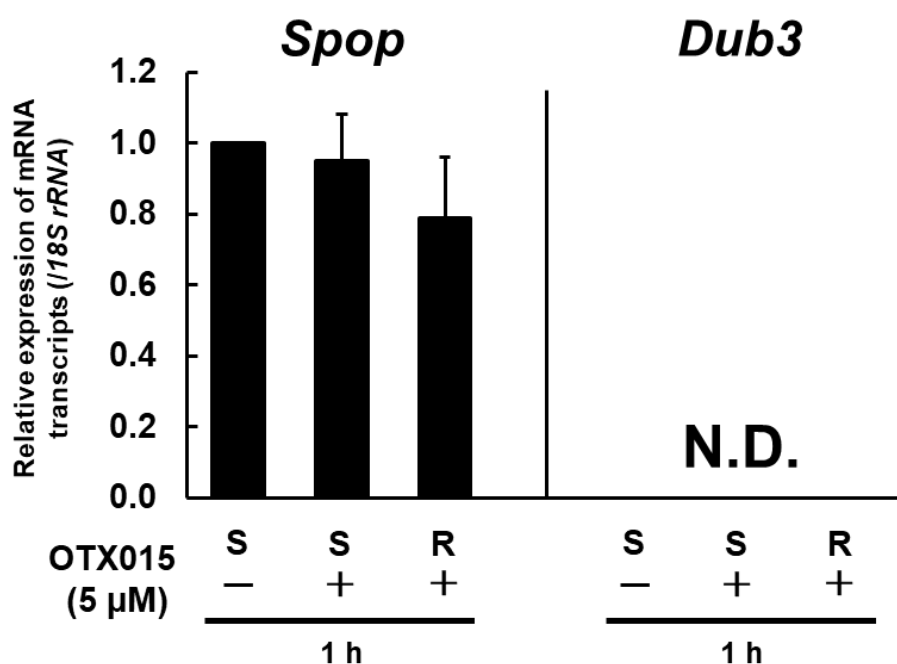
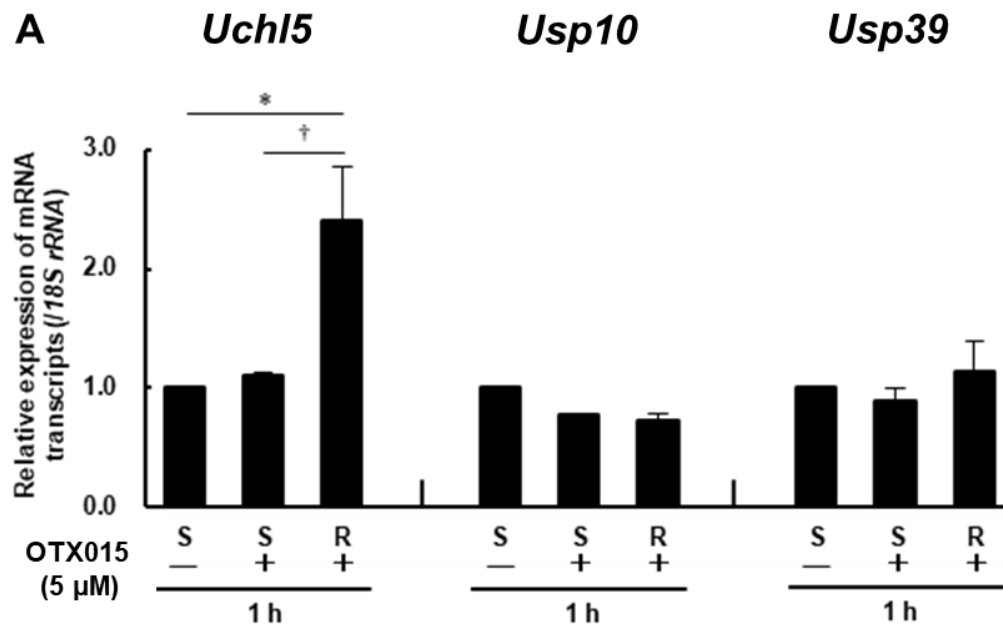


Figure 11. Alteration of expressions of *Spop* and *Dub3* mRNA transcripts in OTX015-S and OTX015-R MLL-AF5q31 cells.

MLL-AF5q31 cells were treated with DMSO or OTX015, and then qRT-PCR was performed. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. N.D., not detected.

そこで、MLL-AF5q31 細胞を用いて、親株と耐性株におけるユビキチン関連分子の mRNA 発現を比較したところ、脱ユビキチン化酵素である *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5* (*UCHL5*) の mRNA 発現が、親株と比較して耐性株において約 2.5 倍上昇していた (Figure 12A)。OTX015 耐性 MV4;11 細胞においても同様に、OTX015 処置は親株と比較して、24 時間後には *UCHL5* の mRNA 発現が約 3 倍に上昇し (Figure 12B)、*UCHL5* タンパク質の発現上昇も観察された (Figure 13)。以上の結果から、樹立した耐性株における *BRD4* タンパク質の過剰な蓄積が起こっている原因として、*UCHL5* が関与し得る可能性が示唆された。



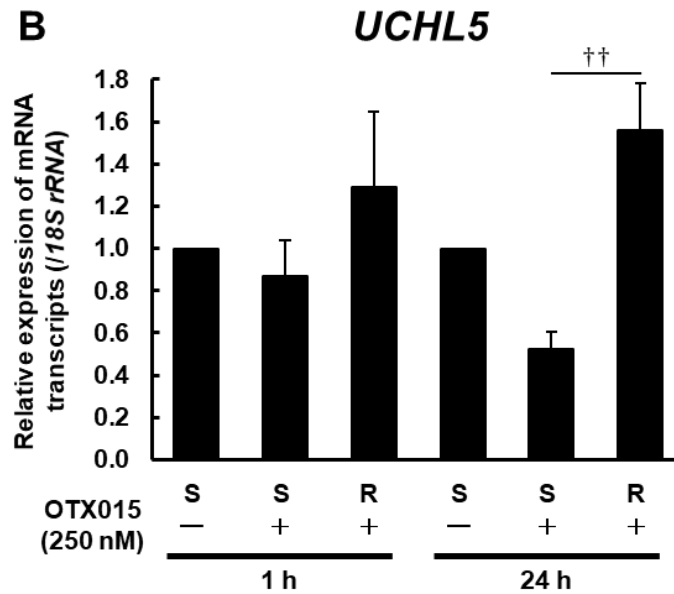


Figure 12. Alteration of ubiquitin-related molecules in OTX015-S and OTX015-R MLL-r cells.

(A) MLL-AF5q31 cells were treated with DMSO or OTX015, and then qRT-PCR was performed. (B) MV4;11 cells were treated with DMSO or OTX015, and then qRT-PCR was performed. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction; *p < 0.05, †p < 0.05, ††p < 0.01. USP, ubiquitin-specific protease.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

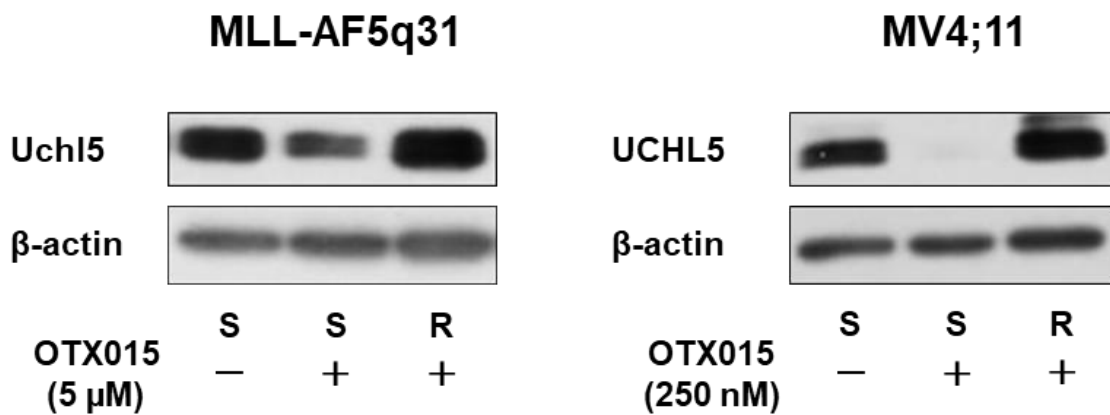


Figure 13. Alteration of expression of UCHL5 in OTX015-S and OTX015-R MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

第4節 考察

BET 阻害剤に対する獲得耐性に寄与し得る分子の探索を目的として、BET 阻害剤である OTX015 を長期間処置することで、5 μM の OTX015 に耐性を持つ MLL-AF5q31 細胞および 250 nM の OTX015 に耐性を持つ MV4;11 細胞を樹立した。予備実験として、親株と耐性株における OTX015 の有無による増殖速度を比較したところ、OTX015 の存在下 (MLL-AF5q31: 5 μM 、MV4;11: 250 nM) では親株はほとんど増殖しなかったが、耐性株では増殖することができたことから、OTX015 に対する獲得耐性が示された (データ未発表)。また、OTX015 非存在下における親株と耐性株の増殖速度と比較したところ、MV4;11 細胞では増殖速度は同程度であったが、MLL-AF5q31 細胞では耐性株の方が、増殖速度は低下した (データ未発表)。その理由を考察すると、MLL-AF5q31 細胞は、マウス骨髄 lineage 陰性細胞に *MLL-AF5q31* 融合遺伝子を導入し樹立した細胞である (53)。*AF5q31* 融合遺伝子は *AF4* の関連遺伝子として同定され、*MLL-AF4* 融合遺伝子と同様に造血細胞において *HOXA9* や *meis homeobox 1 (MEIS1)* の転写を亢進させることで白血病の発症に寄与する (53, 56)。一方で、MV4;11 は *MLL* 遺伝子の転座に加えて FLT3-internal tandem duplication (ITD) 変異を持った細胞株である (57)。FLT3-ITD 変異は AML の約 30%に見られる変異であり、ITD に変異が起これば、FLT3 のチロシンキナーゼ部位が恒常的に活性化することにより、リガンド非存在下においても下流の phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) および RAS シグナル経路といった増殖シグナルの働きが亢進する (58)。従って、FLT3-ITD 変異の有無が、親株と比較した耐性株の増殖速度に差が出た要因の 1 つだと推察される。さらに、耐性株において培地中の OTX015 の有無による増殖速度を比較したところ、OTX015 非存在下において増殖速度が僅かに増大したが、72 時間までの培養においては有意な差とは言えなかった (データ未発表)。また、細胞形態についても差を認めなかったことから、親株と比較した耐性株の性状解析の実験では、① 親株の培養時条件と耐性株の培養時条件との比較、② OTX015 存在下 (MLL-AF5q31: 5 μM 、MV4;11: 250 nM) における親株と耐性株との比較について検討することとした。しかしながら、OTX015 非存在下での耐性株の長期間の培養は現状できていないため、さらなる性状解析の検討が必要であると考えられる。

樹立した OTX015 耐性株では、OTX015 だけでなく、他の BET 阻害剤である JQ-1 や I-BET151 に対する感受性も低下していた。また、この 3 つの化合物はいずれもジアゼピン骨格であるが、キナゾリン骨格を持つ BET 阻害剤 (59) についても耐性を示すことを予備実験で確認している (データ未発表)。これらの結果より、BET 阻害剤の種類に関係なく獲得耐性を示すことが示唆された。つぎに、細胞周期およびアポトーシスを評価したところ、耐性株では、親株で見られた BET 阻害剤による細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を認めなかった。細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を回避する機序としては、BET 阻害剤の標的である BRD4 タンパク質の著明な発現上昇に伴う標的分子である CDK4 または CDK6 や BCL-2 の転写、翻訳の亢進によりもたらされる結果であると考えられる。一方で、*BRD4* の mRNA 発現には差がなかったことから、*BRD4* タンパク質の発現上昇は、*BRD4* タンパク質の分解抑制によるものであると示唆された。MV4;11 細胞については、耐性株において *BRD4* 発現の増加傾向が認められた。*BRD4* 遺伝子の転写は、miR-125b や miR-3140 といった microRNA による制御が

報告されており (60, 61)、本研究で樹立した耐性株において、これらの microRNA の機能が活性化している可能性は考えられる。また、樹立した耐性株に対する BRD2、BRD3 の発現変化については、OTX015 耐性 MLL-AF5q31 細胞において、BRD2 および BRD3 の発現が上昇していることを予備実験にて確認している (データ未発表)。NF- κ B シグナル経路の活性化による BET 阻害剤耐性化の獲得において、BRD2 が関与していることが示されており (50)、樹立した耐性株においても BRD2 および BRD3 が一部関与している可能性は考えられることから、これらについてはさらなる検討が必要である。

BRD4 タンパク質の分解を制御する分子として、耐性株におけるユビキチン関連分子の発現解析により、脱ユビキチン化酵素である UCHL5 を見出した。UCHL5 は、UPS において、標的タンパク質のポリユビキチン鎖を最初に認識する 19S プロテアソームサブユニットに結合し、標的タンパク質の分解を制御している (62)。UCHL5 が分解を制御する基質タンパク質は、transforming growth factor- β (TGF- β) シグナル経路に関与する分子であり、TGF- β による刺激によりリン酸化されることで活性化し転写因子として機能する Smad2/3 や、Wnt/ β -catenin シグナル経路に関与する転写因子である transcription factor 7 (TCF7) が報告されている (63, 64) が、BRD4 タンパク質の分解に関与している報告はない。従って、次章では OTX015 耐性株の BRD4 タンパク質の分解における UCHL5 の寄与を詳細に解明する。

以上より、本章では BET 阻害剤に耐性を持つ 2 種類の MLL 遺伝子関連白血病細胞株を樹立した。また BET 阻害剤耐性獲得機序として、BRD4 タンパク質の著明な発現上昇に伴う BRD4 制御分子の転写、翻訳亢進が寄与することを明らかにした。さらに、BRD4 タンパク質の発現上昇は、脱ユビキチン化酵素である UCHL5 による BRD4 タンパク質の分解抑制によるものである可能性が示唆された。

第2章 BRD4 タンパク質の分解に着目した BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病における耐性化機序の解析

第1節 緒言

UPS は、主要な細胞内タンパク質分解システムの 1 つであり、ユビキチンの付加およびプロテアソームによるユビキチン鎖の認識と分解により、目的タンパク質の選択的な分解を担っている。ユビキチンは、adenosine triphosphate (ATP) のエネルギーを利用したユビキチン活性化酵素 E1 とユビキチン結合酵素 E2 の働きにより活性化される。活性化されたユビキチンは、ユビキチンリガーゼ E3 および目的タンパク質と複合体を形成し、E3 を介してユビキチンが付加される。その後、ユビキチン化反応が繰り返されることで形成されたポリユビキチン鎖を、プロテアソームが認識することで目的タンパク質が分解される (62, 65)。ヒトにおいては、1 種類の E1、約 50 種類の E2 および 500 種類以上の E3 が現在までに同定されている。付加されたポリユビキチン鎖は、タンパク質の分解後脱ユビキチン化酵素によってモノユビキチンとなり再利用される。また、脱ユビキチン化酵素は分解前のタンパク質に付加されているユビキチンの除去にも関与しており、E3 ユビキチンリガーゼと脱ユビキチン化酵素の均衡により標的タンパク質の分解は厳密に制御されている (66)。

また、UPS は標的タンパク質の分解に加えて、様々な生理機能に関与しており、UPS が関与する機能は、タンパク質に対するユビキチンの結合様式により異なる。プロテアソームによる分解シグナルを伝えるのは 48 番目のリジン (K48) を介したポリユビキチンである。一方で、11 番目のリジン (K11)、63 番目のリジン (K63) を介したポリユビキチン鎖が付加されたタンパク質は他のタンパク質と相互作用することにより、細胞分裂や NF- κ B シグナル等の伝達に関与することが知られている (67, 68)。

がん細胞においては、活発的な細胞増殖の維持やアポトーシス回避のために、UPS を異常に活性化させていることが報告されている。G1 期→S 期の進行に関与する cyclin E/CDK2 を負に制御することで細胞周期の調節に働く p53 は、E3 ユビキチンリガーゼである murine double minute 2 (MDM2) により分解されており、UPS の活性化により細胞周期の進行を亢進させている (69, 70)。また、UPS は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の除去に関与することで、アポトーシスの回避に寄与している (71)。一方で、がん細胞の生存に有利な分子については、脱ユビキチン化酵素を介した標的タンパク質からのユビキチンの除去により、UPS を抑制することでその発現を安定化させている。脱ユビキチン化酵素は現在約 100 種類が同定されており、構造の類似性によって 6 つの群に分類されている (72)。脱ユビキチン化酵素が関与する分子はこれまでに多数報告されており、ubiquitin specific peptidase 28 (USP28) や USP17 は様々ながん種の増殖に重要とされている c-MYC の安定化に関与している (73, 74)。また、USP15 は ROS の除去に関与する kelch like ECH associated protein 1 (KEAP1) を安定化し、NFE2 like BZIP transcription factor 2 (NRF2) の活性化を介した ROS の除去に寄与している (75)。このように、がん細胞の増殖、生存において UPS が重要な役割を果たしており、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミドをはじめとして、UPS を標的とした薬剤の開発が進められている (76–78)。

さらに近年、UPS が抗がん剤に対する薬剤耐性にも関与していることが報告されており、ユビキチン化酵素の機能不全および脱ユビキチン化酵素の活性化による、DNA 修復に関与する分子や、薬剤排出トランスポーターとして働く P-糖タンパク質の安定化を介して獲得耐性に寄与している (79, 80)。BET 阻害剤についても、前立腺がんや大腸がんにおいて、BRD4 を分解するユビキチン化酵素である SPOP の変異による機能不全や、BRD4 の分解を抑制する脱ユビキチン化酵素である DUB3 の活性化を介した UPS の抑制による BRD4 タンパク質の安定化が薬剤耐性に寄与することが報告されている (54, 55)。前章において筆者は、BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株において、BRD4 タンパク質の発現が顕著に上昇しており、BRD4 タンパク質の分解を制御する新規のユビキチン関連分子として、脱ユビキチン化酵素である UCHL5 の関与の可能性を見出した。そこで本章では、樹立した耐性株の増殖、生存および BRD4 タンパク質の分解における UCHL5 の寄与を明らかにするために、small hairpin RNA (shRNA) および阻害剤を用いた UCHL5 の阻害による耐性株への影響を検討した。さらに、耐性株における UCHL5 の発現制御機構について検討した。

第2節 実験方法

2-2-1. 使用細胞および試薬

本章で使用する MLL 遺伝子関連白血病細胞株は第1章と同様に MLL-AF5q31 細胞および MV4;11 細胞である。培養条件も第1章 1-2-1. と同様である。また、ヒト UCHL5 のノックダウンに必要なウイルスベクターを作製するために、HEK293T 細胞を ATCC より購入した。HEK293T 細胞は、10% FBS (Sigma-Aldrich)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (FUJIFILM 和光純薬株式会社) を含む Low-Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (FUJIFILM 和光純薬株式会社) で培養した。全ての細胞は 37°C、20% O₂、5% CO₂、75% N₂ の環境下で培養した。UCHL5 阻害剤である b-AP15、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib は MedChemExpress から購入した。

2-2-2. OTX015 耐性 MV4;11 細胞における UCHL5 ノックダウンの影響についての検討

2-2-2-1. UCHL5 ノックダウン細胞株の作製

OTX015 耐性 MV4;11 細胞におけるヒト UCHL5 のノックダウンを、テトラサイクリン制御型 shRNA 発現プラスミド (EZ-tet-pLKO-puro-UCHL5) をウイルスベクター法で導入することにより行った。EZ-tet-pLKO-puro-UCHL5 は、EZ-tet-pLKO-puro (#85966; Addgene, Watertown, MA, USA) に UCHL5 に対する shRNA 配列を組み込むことで作製した (81)。ウイルス粒子は Fugene HD (Promega) を用いて、shRNA 発現プラスミドベクター、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev および pMD2.G ベクター (Addgene) を HEK293T 細胞にコトランスフェクションすることで作製し、トランスフェクション後 48 時間でウイルス粒子が含まれる上清を回収した。その後、OTX015 耐性 MV4;11 細胞の培養培地にウイルス上清および 16 µg/mL polybrene (ナカライテスク株式会社) を加えて 72 時間培養し、細胞をウイルスに感染させた。導入した shRNA 発現プラスミドベクターは、puromycin 耐性遺伝子がコードされていることから、感染させた細胞を 0.15 µg/mL puromycin (FUJIFILM 和光純薬株式会社) を含有した培地で 9 日間培養し、プラスミドが導入された細胞のみを選択した。shRNA 発現を誘導するために 1 µg/mL テトラサイクリン (FUJIFILM 和光純薬株式会社) を処置し、その後の評価に用いた。対照群は、ヒトゲノム上に存在しない塩基配列にした shRNA (shCtrl) を導入した OTX015 耐性 MV4;11 細胞とした。この実験で使用した shRNA 配列については Supplementary Table 4 に示した。なお、ウイルスベクター法によるプラスミドベクターの導入をはじめとした一連の遺伝子組み換え実験については、京都薬科大学遺伝子組み換え実験の承認を得ている (承認番号: G21-016-01)。

2-2-2-2. mRNA 発現評価

UCHL5 ノックダウン細胞株を 1.0×10^5 cells/mL の密度で播種し、1 µg/mL テトラサイクリンを処置した。48 時間後に細胞を回収し、第1章 1-2-6. と同様の方法で qRT-PCR 法により mRNA 発現を解析した。この実験で使用したプライマーならびにプローブは、Supplementary Table 1 に示した。

2-2-2-3. タンパク質発現評価

UCHL5 ノックダウン細胞株を 5.0×10^4 cells/mL の密度で播種し、 $1 \mu\text{g/mL}$ テトラサイクリンを処置した。96 時間後に細胞を回収し、第 1 章 1-2-7. と同様の方法でウエスタンブロット法によりタンパク質発現を解析した。内標準には Vinculin を用いた。この実験で使用した一次抗体は Supplementary Table 3 に示した。

2-2-2-4. 細胞増殖能の評価

耐性株における UCHL5 ノックダウンの細胞増殖能に対する影響を、トリパンブルー染色によるセルカウントで評価した。UCHL5 ノックダウン細胞株を 6-well プレート (Thermo Fisher Scientific) に 5.0×10^4 cells/mL の密度で播種し、 $1 \mu\text{g/mL}$ テトラサイクリンを処置した。24 時間ごとに 96 時間まで細胞懸濁液を $10 \mu\text{L}$ 採取し、 $10 \mu\text{L}$ のトリパンブルーと懸濁してセルカウントを行った。トリパンブルーを排出し、トリパンブルー溶液で染色されない細胞を生細胞とし、生細胞数を計測した。

2-2-3. OTX015 耐性株に対する UCHL5 阻害剤 b-AP15 の影響についての検討

2-2-3-1. 細胞増殖能の評価

耐性株における UCHL5 阻害の影響を、UCHL5 阻害剤である b-AP15 を処置することで評価した。b-AP15 の細胞増殖能に対する影響は、WST-8 assay で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 96-well プレート (Thermo Fisher Scientific) に各 well あたり 1.0×10^3 cells/well (MLL-AF5q31) または 1.0×10^4 cells/well (MV4;11) の密度で播種し、48 時間培養した。その後、b-AP15 の段階希釈液を 24 時間暴露し、Cell Count Kit-8 試薬を各 well に $10 \mu\text{L}$ ずつ加え、マイクロプレートリーダー (GloMax; Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。

また、UCHL5 阻害により耐性株における BET 阻害剤の感受性が変化するかどうかを評価した。OTX015 耐性 MLL-AF5q31 細胞を 6-well プレートに 1.0×10^4 cells/mL の密度で播種し、48 時間培養した後、 500 nM の b-AP15 を 3 時間暴露した。3 時間後に細胞を回収し、新しい培地で 2 回洗浄後、96-well プレートに各 well あたり 1.0×10^3 cells/well の密度で播種し、OTX015 の段階希釈液とともに 72 時間暴露した。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に $10 \mu\text{L}$ ずつ処置し、マイクロプレートリーダーを使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。 50% の細胞増殖阻害濃度である IC_{50} の値は、非線形回帰プログラム CalcuSyn を使用して算出した。

2-2-3-2. アポトーシス解析

b-AP15 により誘導されるアポトーシスの解析は、第 1 章 1-2-5. と同様に Annexin V/PI 染色によるフローサイトメトリー法で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、48 時間培養した後、b-AP15 を 24 時間暴露した (MLL-AF5q31: $1 \mu\text{M}$, MV4;11: 750 nM)。24 時間後に細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、Annexin V、PI で染色 (室温、10 分) し、BD LSR Fortessa flow cytometer および BD FACS Diva ソフトウェアを用いて解析した。結果は FlowJo ソフトウェアを用いてデータ分析した。

2-2-3-3. タンパク質発現評価

耐性株を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、48 時間培養した後、b-AP15 を暴露した。その後細胞を回収し、ウエスタンブロット法によりタンパク質発現を解析した。内標準には Vinculin を用いた。この実験で使用した一次抗体は Supplementary Table 3 に示した。

2-2-4. OTX015 耐性株に対する CDK4/6 阻害剤 Abemaciclib の影響についての検討

2-2-4-1. 細胞増殖能の評価

耐性株における CDK4/6 阻害の影響を、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib を処置することで評価した。Abemaciclib の細胞増殖能に対する影響は、WST-8 assay で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 96-well プレートに各 well あたり 1.0×10^3 cells/well (MLL-AF5q31) または 1.0×10^4 cells/well (MV4;11) の密度で播種し、Abemaciclib の段階希釈液とともに 72 時間暴露した。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に 10 μ L ずつ加え、マイクロプレートリーダー (GloMax: Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。

また、耐性株における OTX015 と CDK4/6 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果について評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 96-well プレートに各 well あたり 1.0×10^3 cells/well (MLL-AF5q31) または 1.0×10^4 cells/well (MV4;11) の密度で播種し、OTX015 (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM) および Abemaciclib (MLL-AF5q31: 50 nM、MV4;11: 50 nM) を 72 時間暴露した。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に 10 μ L ずつ加え、マイクロプレートリーダー (GloMax: Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。

2-2-4-2. アポトーシス解析

Abemaciclib により誘導されるアポトーシスの解析は、第 1 章 1-2-5. と同様に Annexin V/PI 染色によるフローサイトメトリー法で評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、Abemaciclib を処置した (MLL-AF5q31: 250 nM、MV4;11: 150 nM)。72 時間後に細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、Annexin V、PI で染色 (室温、10 分) し、BD LSR Fortessa flow cytometer および BD FACS Diva ソフトウェアを用いて解析した。結果は FlowJo ソフトウェアを用いてデータ分析した。

2-2-4-3. mRNA 発現評価

耐性株における CDK4/6 阻害による mRNA 発現を qRT-PCR 法を用いて評価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、Abemaciclib を処置した (MLL-AF5q31: 250 nM、MV4;11: 150 nM)。24 時間後に細胞を回収し、第 1 章 1-2-6. と同様の方法で mRNA 発現を解析した。この実験で使用したプライマーならびにプローブは、Supplementary Table 1、2 に示した。

2-2-4-4. タンパク質発現評価

耐性株における CDK4/6 阻害によるタンパク質発現を、ウエスタンブロット法を用いて評

価した。MLL 遺伝子関連白血病細胞を 1.0×10^4 cells/mL (MLL-AF5q31) または 1.0×10^5 cells/mL (MV4;11) の密度で播種し、Abemaciclib を処置した (MLL-AF5q31: 250 nM、MV4;11: 150 nM)。72 時間後に細胞を回収し、第 1 章 1-2-7. と同様の方法でタンパク質発現を解析した。内標準には β -actin および Vinculin を用いた。この実験で使用した一次抗体は Supplementary Table 3 に示した。

2-2-5. 統計解析

全ての解析は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) を用いて行った。危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

第3節 実験結果

2-3-1. OTX015 耐性株における UCHL5 阻害の影響についての検討

耐性株の増殖、生存および BRD4 タンパク質の分解に対する UCHL5 の寄与を明らかにするために、UCHL5 に対する shRNA 発現プラスミドベクターを OTX015 耐性 MV4;11 細胞に導入した UCHL5 ノックダウン細胞株を用いて、UCHL5 ノックダウンの影響を調べた。UCHL5 に対する shRNA (shUCHL5) は 2 種類設計し、qRT-PCR 法によりテトラサイクリン処置 48 時間後の UCHL5 の mRNA 発現を確認したところ、UCHL5 ノックダウン細胞株における UCHL5 の発現は、コントロール shRNA (shCtrl) を導入した細胞と比較して有意に低下していた (Figure 14)。UCHL5 ノックダウン効果は、shUCHL5 #1 を導入した細胞では約 25%、shUCHL5 #2 を導入した細胞では約 80%であり、shUCHL5 #2 は、shUCHL5 #1 に比して、より強力に UCHL5 ノックダウン効果を示したことから、以降の実験では shUCHL5 #2 を導入した細胞を用いて評価した。

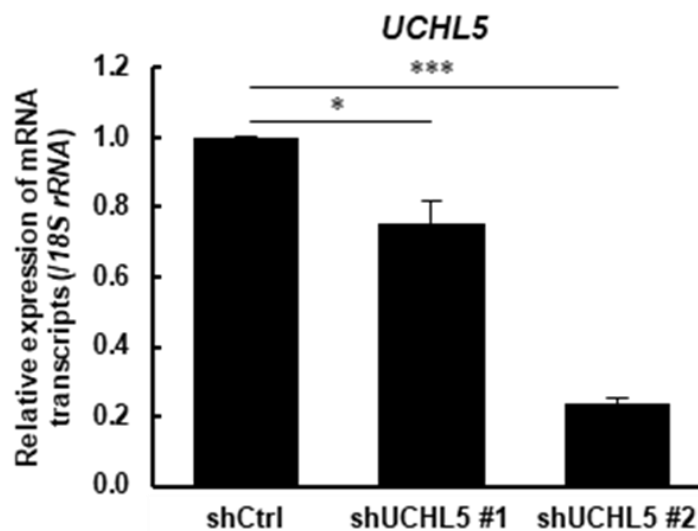


Figure 14. Alteration of expression of UCHL5 mRNA transcripts after UCHL5 knockdown in OTX015-R MV4;11 cells.

UCHL5 mRNA transcript levels after 48 h of treatment with tetracycline detected by qRT-PCR. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

ウエスタンブロット法によりテトラサイクリン処置後 96 時間の UCHL5、BRD4 のタンパク質発現を評価したところ、shUCHL5 #2 を導入した UCHL5 ノックダウン細胞株において、UCHL5 とともに BRD4 タンパク質の著しい発現低下が認められた (Figure 15)。また、テトラサイクリン処置後 24 時間ごとに細胞数を計測することにより細胞増殖を評価したところ、テトラサイクリン処置 96 時間後における UCHL5 ノックダウン細胞株の細胞数は shCtrl を導入した細胞の半分であったことから、UCHL5 のノックダウンにより耐性株の細胞増殖速度が低下した (Figure 16)。

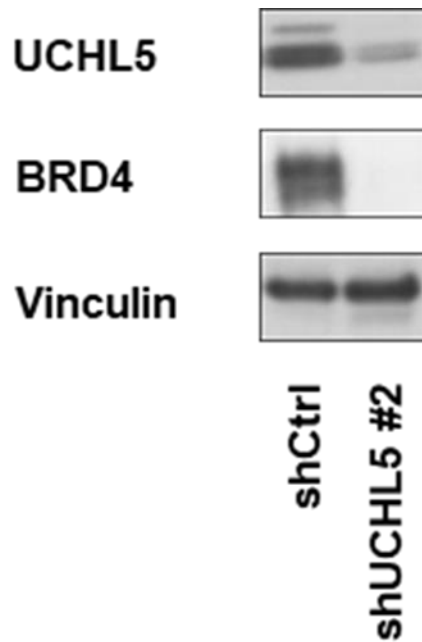


Figure 15. Alteration of protein expressions of UCHL5 and BRD4 after UCHL5 knockdown in OTX015-R MV4;11 cells.

UCHL5 and BRD4 protein levels were assessed by western blotting after tetracycline treatment for 96 h. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

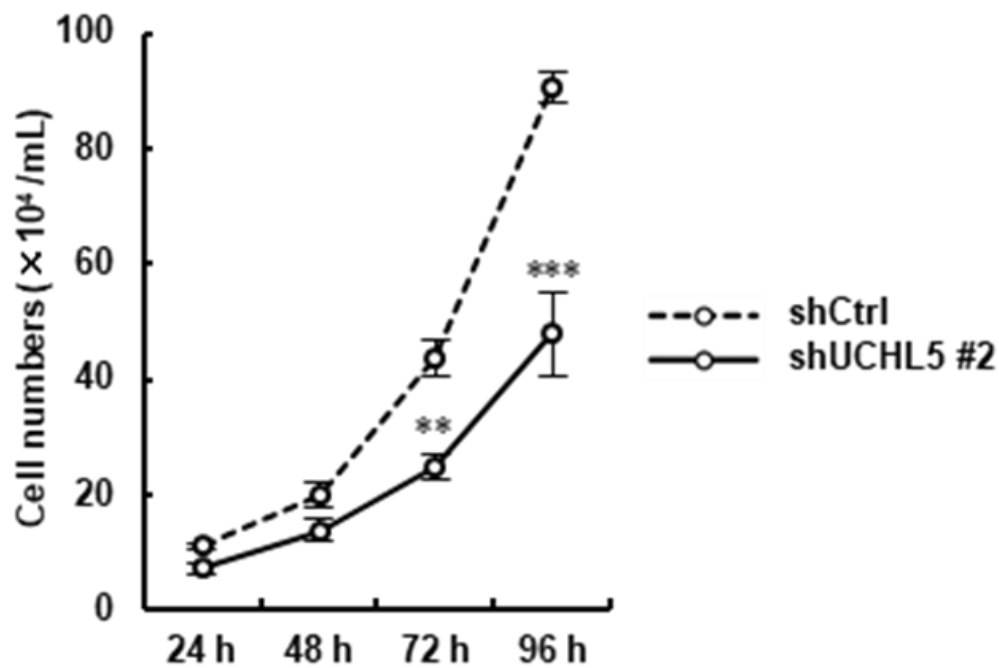


Figure 16. Effect of UCHL5 knockdown on cell growth in OTX015-R MV4;11 cells.

Cells were counted by trypan blue staining every 24 h up to 96 h after tetracycline treatment. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction; * $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

続いて、UCHL5 阻害剤である b-AP15 を用い、耐性株における UCHL5 阻害の影響について評価した。b-AP15 は、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の親株だけでなく耐性株においても濃度依存的に細胞増殖の抑制を引き起こした (Figure 17)。また、50%の細胞増殖阻害濃度である IC₅₀ 値での b-AP15 処置により、Annexin V 陽性細胞の割合が増加したことから、細胞死の誘導が示された (Figure 18、Supplementary Figure 3)。また、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の OTX015 耐性株において、b-AP15 の処置後 3 時間以降で BRD4 タンパク質発現の低下が認められた (Figure 19)。

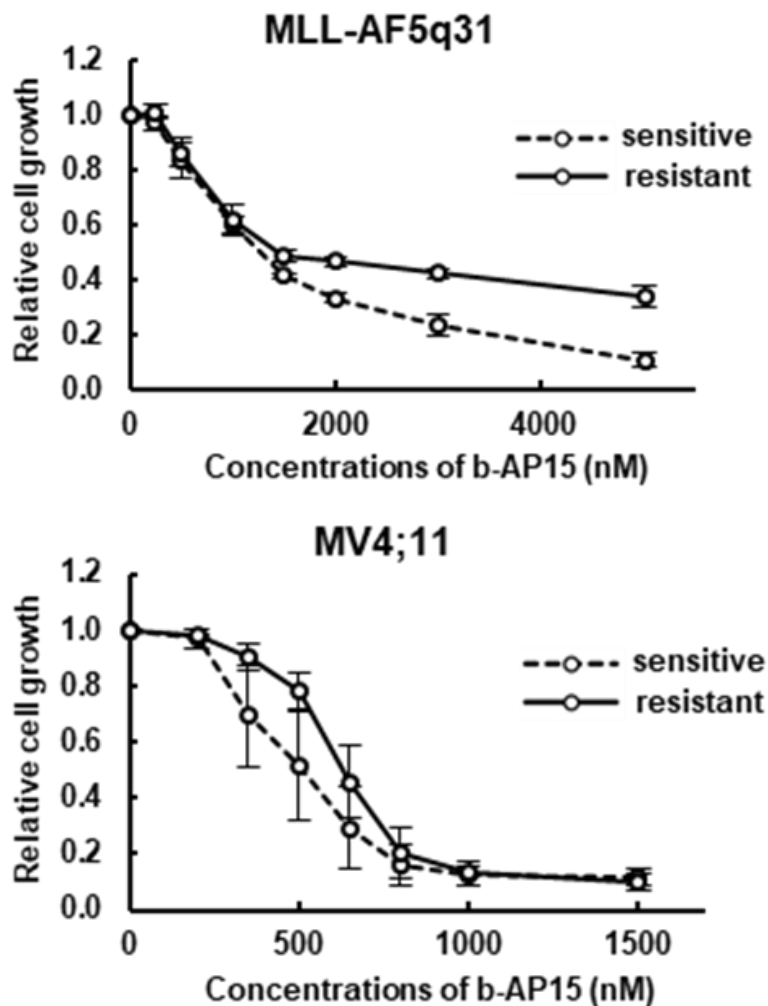


Figure 17. Effect of b-AP15 on cell growth in MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or b-AP15 at different concentrations for 24 h, followed by measurement of cell viability. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

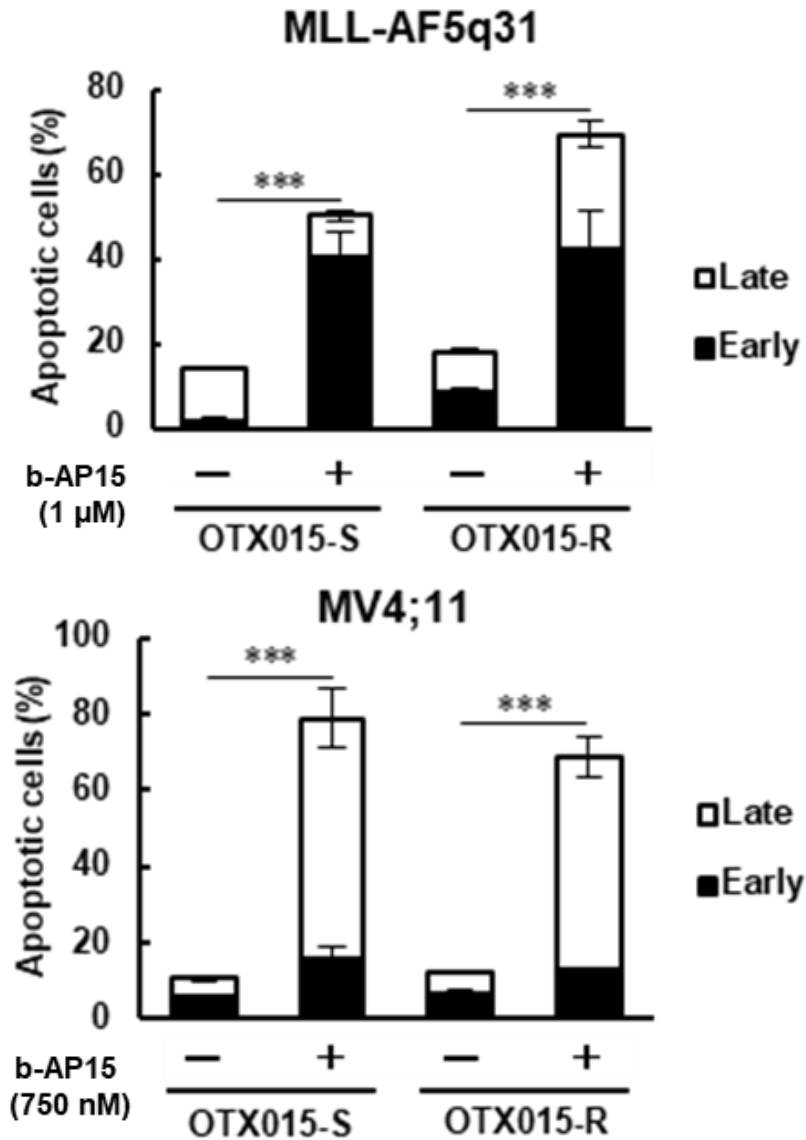


Figure 18. Effect of b-AP15 on apoptosis in MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or b-AP15, followed by analysis of apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using an unpaired t-test; *** $p < 0.001$.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

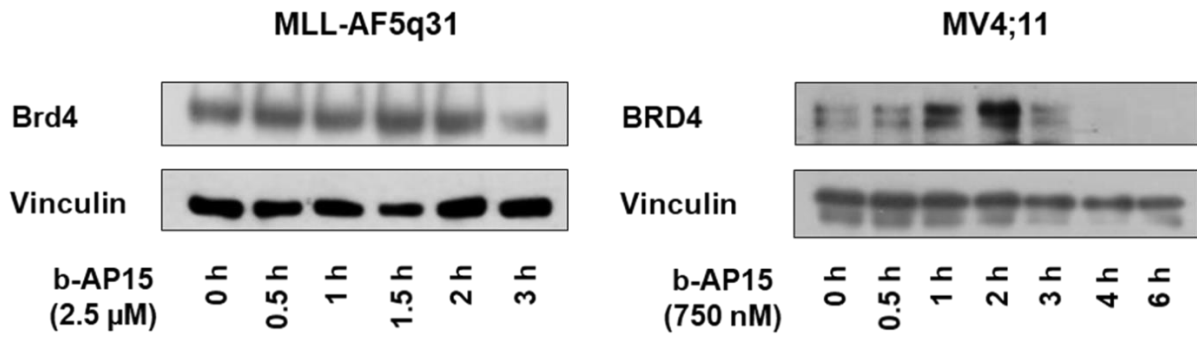


Figure 19. Alteration of protein expression of BRD4 after b-AP15 treatment in OTX015-R MLL-r cells.

OTX015-resistant MLL-r cells were treated with b-AP15 for the indicated times, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

さらに、UCHL5 の阻害により BRD4 タンパク質発現を低下させることが、耐性株における BET 阻害剤耐性の克服につながるかを検討するために、OTX015 耐性 MLL-AF5q31 細胞において、b-AP15 前処置の有無による OTX015 に対する細胞増殖抑制効果を評価した。b-AP15 の処置濃度は、OTX015 耐性 MLL-AF5q31 細胞の増殖にほとんど影響せずに BRD4 タンパク質の低下を誘導する濃度である 500 nM とした (Supplementary Figure 4)。WST-8 assay の結果、b-AP15 を前処置していない細胞における OTX015 の 50% の細胞増殖阻害濃度である IC₅₀ 値は 10 μM 以上であったのに対し、b-AP15 を前処置した細胞における OTX015 の IC₅₀ 値は 3.3 μM であり、OTX015 の感受性が上昇した (Figure 20)。以上の結果より、樹立した耐性株において、UCHL5 は BRD4 タンパク質の分解抑制に寄与しており、UCHL5 の発現上昇が BRD4 タンパク質の過剰な蓄積の原因となることが示唆された。

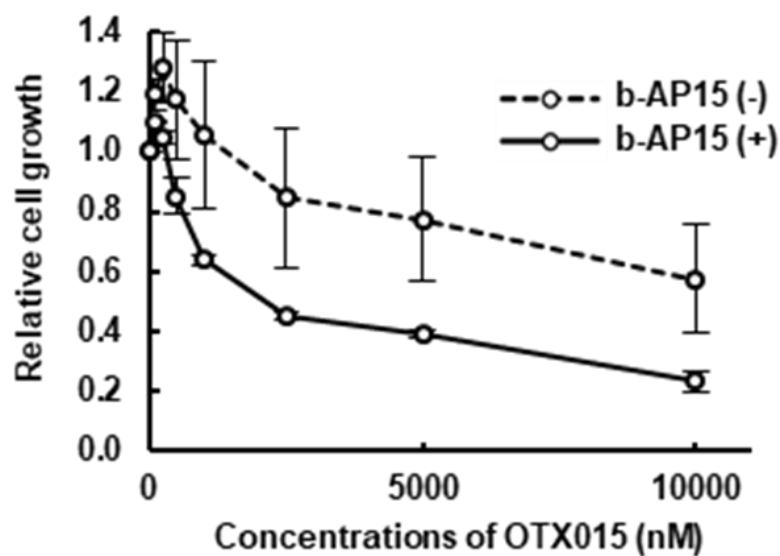


Figure 20. Evaluation of the sensitivity of OTX015 after b-AP15 treatment in OTX015-R MLL-AF5q31 cells.

OTX015-resistant MLL-AF5q31 cells were treated with DMSO or b-AP15 (500 nM) for 3 h. After removal of b-AP15, cells were washed twice and treated with OTX015 at different concentrations for 72 h, followed by measurement of cell viability. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

2-3-2. CDK4/6 に着目した OTX015 耐性株における UCHL5 制御機構の検討

脱ユビキチン化酵素の機能は厳密に制御されており、制御機構として、遺伝子発現の調節や翻訳後修飾など様々な機序が報告されている (82–85)。UCHL5 の発現は、E2 promotor binding factor 1 (E2F1) により制御されていることが知られている (86)。E2F1 は、がん抑制遺伝子である retinoblastoma transcriptional corepressor (RB) におけるリン酸化修飾の有無によりその機能が制御されており、RB がリン酸化を受けると E2F1 と複合体を形成できなくなり、E2F1 による標的遺伝子の転写が進行する。また、RB は CDK4/6 と Cyclin D からなる複合体によりリン酸化を受けている (87)。そこで筆者は、「CDK4/6 が UCHL5 の発現制御に関与している」と仮説を立て、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib を用いて、UCHL5 機能制御における CDK4/6 の寄与を検討した。MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の OTX015 耐性株において、CDK4/6 阻害による UCHL5 発現の影響について qRT-PCR 法およびウエスタンブロット法で評価したところ、24 時間の Abemaciclib の処置により UCHL5 の mRNA 発現が MLL-AF5q31 細胞で約 40%、MV4;11 細胞で約 30%低下した (Figure 21)。また、72 時間の Abemaciclib の処置は UCHL5 タンパク質の発現低下とともに、UCHL5 阻害剤処置時にみられた BRD4 タンパク質の発現低下を誘導し、BRD4 の標的遺伝子である c-MYC、BCL-2 の発現を低下させた (Figure 22)。これらの結果から、CDK4/6 が UCHL5 の発現制御を介して BRD4 タンパク質の分解を調節し得ることが示された。

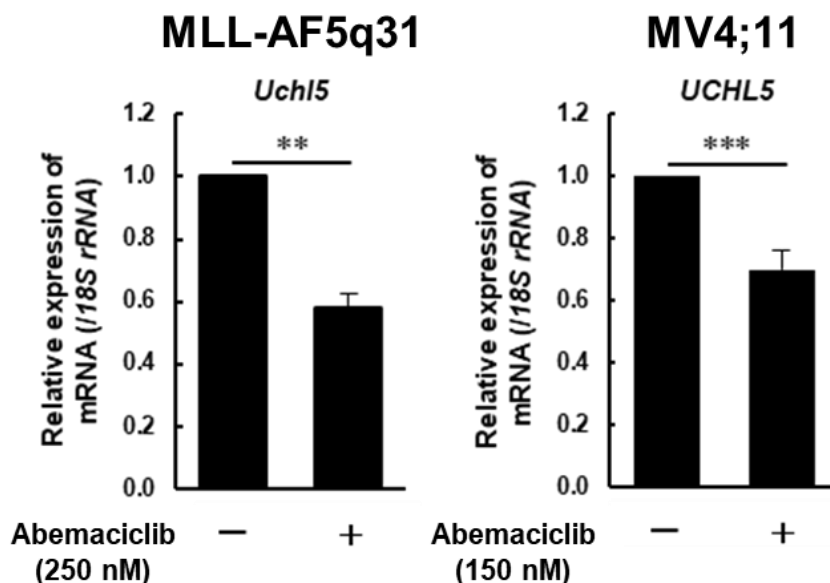


Figure 21. Alteration of expression of UCHL5 mRNA transcripts after Abemaciclib treatment in OTX015-R MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or abemaciclib, and then qRT-PCR was performed. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using an unpaired t-test; ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Amari, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

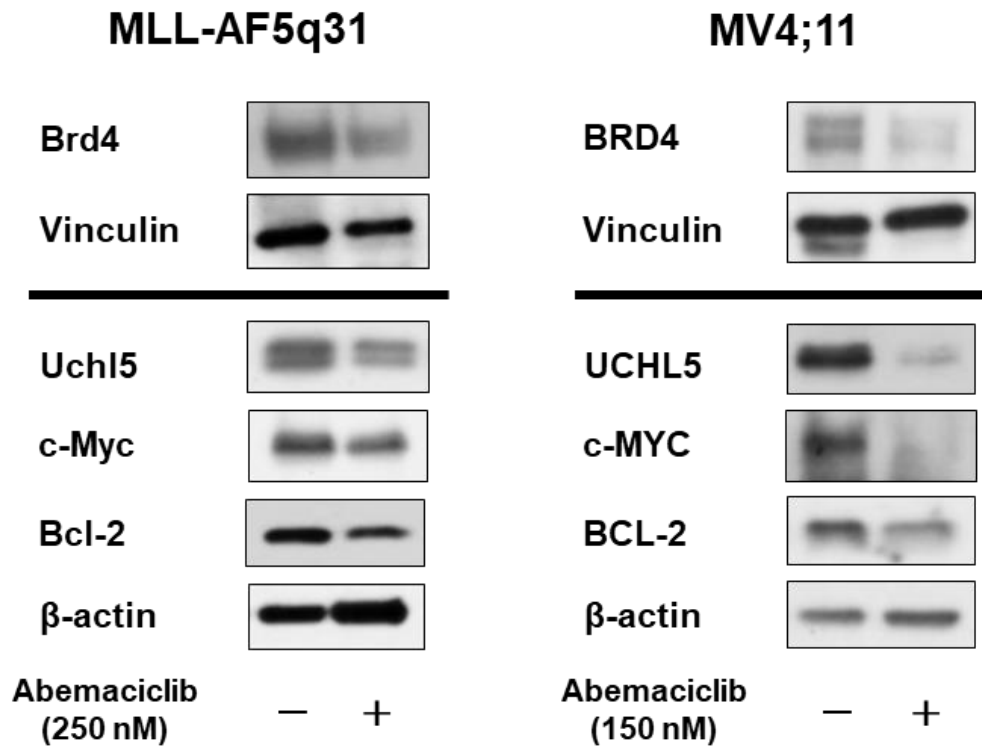


Figure 22. Alteration of protein expression after Abemaciclib treatment in OTX015-R MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or abemaciclib, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

次に、BET 阻害剤耐性株に対する CDK4/6 阻害剤の抗腫瘍効果について検討した。Abemaciclib の処置は MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞のいずれにおいても、親株および耐性株で濃度依存的な細胞増殖抑制を誘導した (Figure 23)。また、MLL-AF5q31 および MV4;11 細胞の親株ならびに耐性株において、50%の細胞増殖阻害濃度である IC₅₀ 値で Abemaciclib 処置し細胞死を評価したところ、MLL-AF5q31 細胞の親株では Annexin V 陽性細胞の増加は見られなかったが、耐性株において Annexin V 陽性細胞の増加が認められ、細胞死の誘導が示された。MV4;11 細胞においては、親株と耐性株ともに Abemaciclib 処置により細胞死が誘導された (Figure 24、Supplementary Figure 5)。

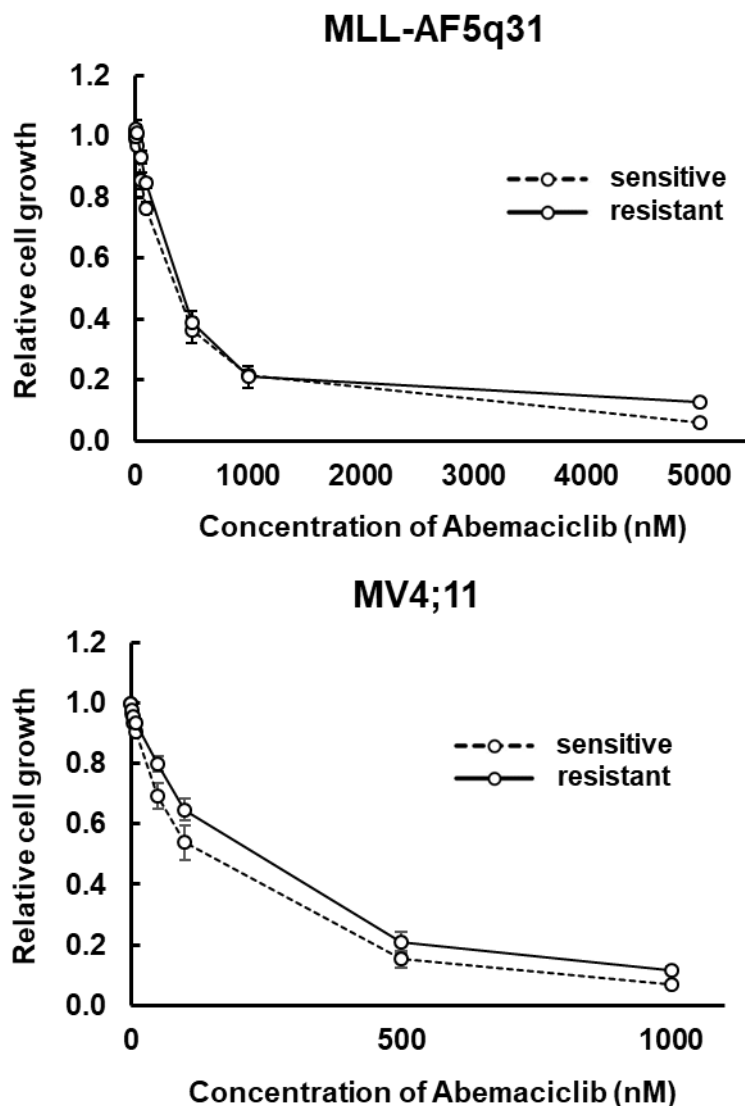


Figure 23. Effect of Abemaciclib on cell growth in MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or abemaciclib at different concentrations for 72 h, followed by measurement of cell viability. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

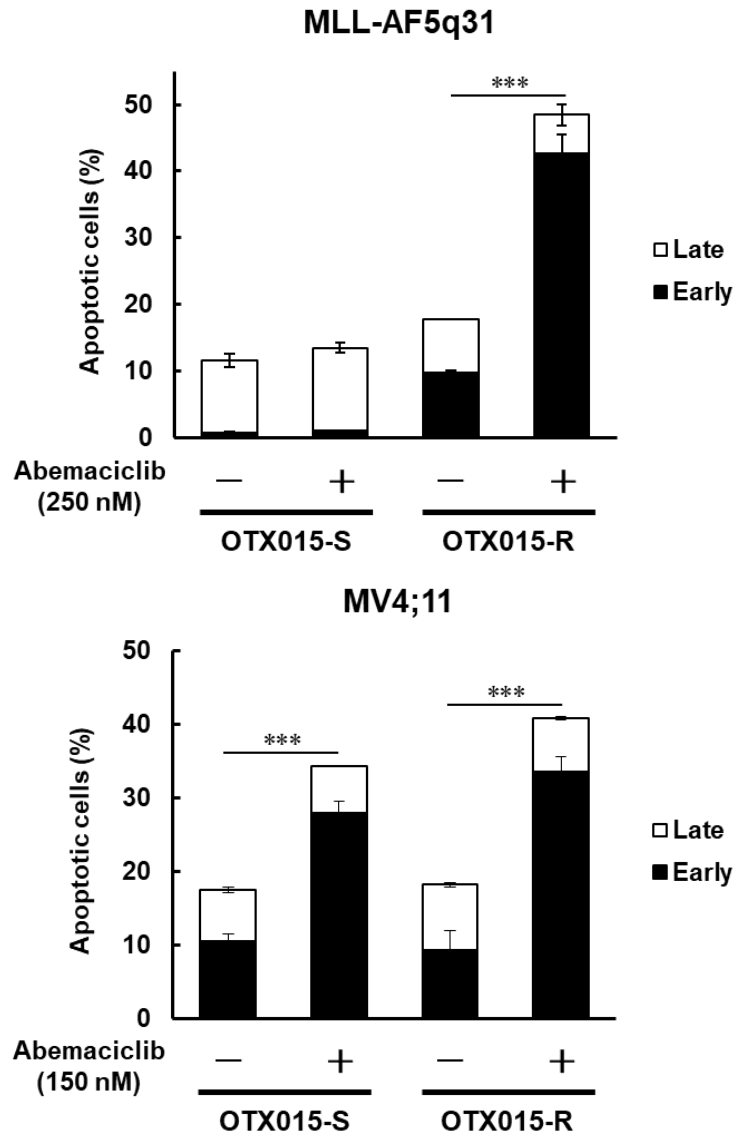


Figure 24. Effect of Abemaciclib on apoptosis in MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with DMSO or Abemaciclib, followed by analysis of apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using an unpaired t-test; ***p < 0.001.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)

さらに、Abemaciclib と OTX015 の併用により、耐性株に対する抗腫瘍効果が増強するか調べた。OTX015 単剤 (MLL-AF5q31: 5 μ M、MV4;11: 250 nM) での細胞増殖は MLL-AF5q31 細胞で約 40%、MV4;11 では約 10%抑制され、Abemaciclib 単剤 (MLL-AF5q31: 50 nM、MV4;11: 50 nM) での細胞増殖は 2 株ともに約 20%抑制された。一方、2 剤の併用時では、MLL-AF5q31 細胞の細胞増殖が約 60%、MV4;11 細胞の細胞増殖が約 50%抑制されたことから、2 剤を併用することで、より強力な細胞増殖の抑制が見られた (Figure 25)。以上の結果から、CDK4/6 阻害剤は BET 阻害剤耐性を克服する治療薬になり得ることが示された。

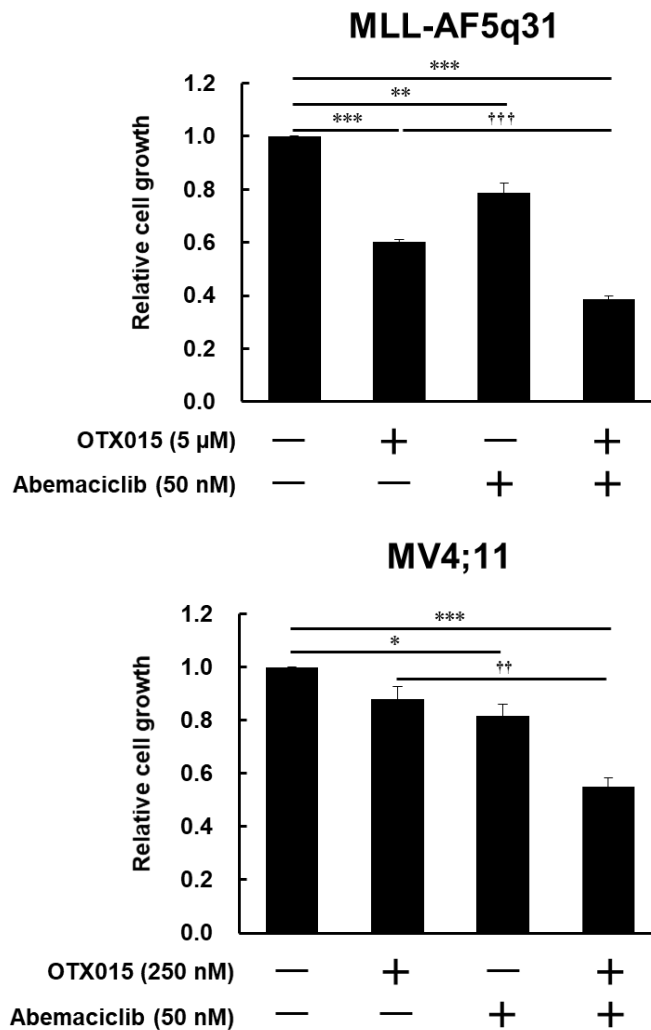


Figure 25. Combination effect of OTX015 and Abemaciclib on cell growth in MLL-r cells.

MLL-r cells were treated with OTX015 or abemaciclib or both drugs at different concentrations for 72 h, followed by measurement of cell viability. Data represent the mean + SEM of three independent experiments. Means + SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$.

第4節 考察

BRD4 タンパク質の分解は UPS により制御されており、いくつかのユビキチン関連分子の異常が BET 阻害剤耐性化をもたらすことが報告されている。第1章で筆者は、樹立した OTX015 耐性 MLL 遺伝子関連白血病細胞株において、BET 阻害剤の標的である BRD4 および脱ユビキチン化酵素である UCHL5 の発現が上昇していたことから、UCHL5 が BRD4 タンパク質の分解抑制を介した BET 阻害剤耐性に寄与し得る新規のユビキチン関連分子である可能性を見出した。つぎに、UCHL5 の BET 阻害剤耐性獲得の機序および UCHL5 発現亢進の機序を解明すべく検討した。まず、shRNA および阻害剤を用いた UCHL5 の阻害実験による BET 阻害剤耐性株への影響を検討した。shRNA による UCHL5 のノックダウンおよび UCHL5 阻害剤である b-AP15 の処置により、BRD4 タンパク質の発現低下、細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導した。この結果から、BET 阻害剤耐性株において、UCHL5 は BRD4 タンパク質の分解に関与しており、UCHL5 の発現上昇を介した BRD4 タンパク質の分解抑制により、BRD4 タンパク質の著明な発現上昇が起こることが示唆された。また、b-AP15 の前処置により、耐性株における BET 阻害剤 OTX015 の感受性が一部回復したことから、UCHL5 阻害剤は BRD4 タンパク質の発現を低下させることで BET 阻害剤耐性を克服する薬剤になり得ることが示された。b-AP15 の前処置による耐性株における OTX015 の感受性の回復が部分的であったのは、b-AP15 処置による耐性株における BRD4 の発現が、親株における BRD4 の発現量まで低下せず、UCHL5 阻害による BRD4 タンパク質の発現低下作用が限定的であったからであると推察する。一方、UCHL5 が分解を制御する基質タンパク質として、TGF- β シグナル経路関連分子 Smad2/3 や、Wnt/ β -catenin シグナル経路関連分子 TCF7 が報告されている (63, 64)。TGF- β および Wnt/ β -catenin シグナル経路は BET 阻害剤耐性株において活性化が報告されている経路であることから (48)、本研究において、UCHL5 阻害により耐性株の細胞増殖抑制や細胞死が起こった原因として、TGF- β および Wnt/ β -catenin シグナル経路阻害の関与は否定できない。樹立した耐性株における、UCHL5 阻害による Smad2/3 や TCF7 の発現変化については調べられていないため、さらなる検討が必要であると考えられる。

筆者はさらに、耐性株における UCHL5 機能制御について、CDK4/6 阻害剤である Abemaciclib が UCHL5 の発現を低下させることを明らかにした。また、Abemaciclib 処置により耐性株における BRD4 関連分子の発現低下、細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導が認められたことから、CDK4/6 阻害剤が BET 阻害剤耐性を克服する薬剤になることが示された。CDK4/6 の阻害が UCHL5 の発現を低下させた機序として、E2F1-RB 経路の阻害によりもたらされた結果と考えられる。また、BET 阻害剤に耐性を持つ前立腺がんでは、脱ユビキチン化酵素である DUB3 の活性が CDK4/6 を介したセリン残基のリン酸化により制御されていることが報告されている (54) こと、ならびに今回の知見から、BET 阻害剤耐性化をもたらすユビキチン関連分子の制御において、CDK4/6 は重要な役割を果たしていることが示唆された。また、樹立した OTX015 耐性株の中でも、MLL-AF5q31 細胞においては、CDK4/6 阻害剤の処置により顕著に細胞死が誘導されたことから、MLL-AF5q31 細胞の BET 阻害剤耐性化は CDK4/6 に強く依存していることが推察される。

以上より、本章では BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞において、

CDK4/6-UCHL5-BRD4 経路の活性化が BET 阻害剤耐性に寄与していることが示唆された。さらに、CDK4/6 は BRD4 によって転写が制御される分子の一つであることから、BRD4、CDK4/6、UCHL5 の間でフィードバックループを形成することにより、BET 阻害剤に対する耐性を促進させている可能性が考えられる (Figure 26)。この経路の活性化における、引き金となる原因についてはさらなる検討が必要であるが、この経路を阻害する UCHL5 阻害剤、CDK4/6 阻害剤は BET 阻害剤耐性を克服する薬剤として期待される。

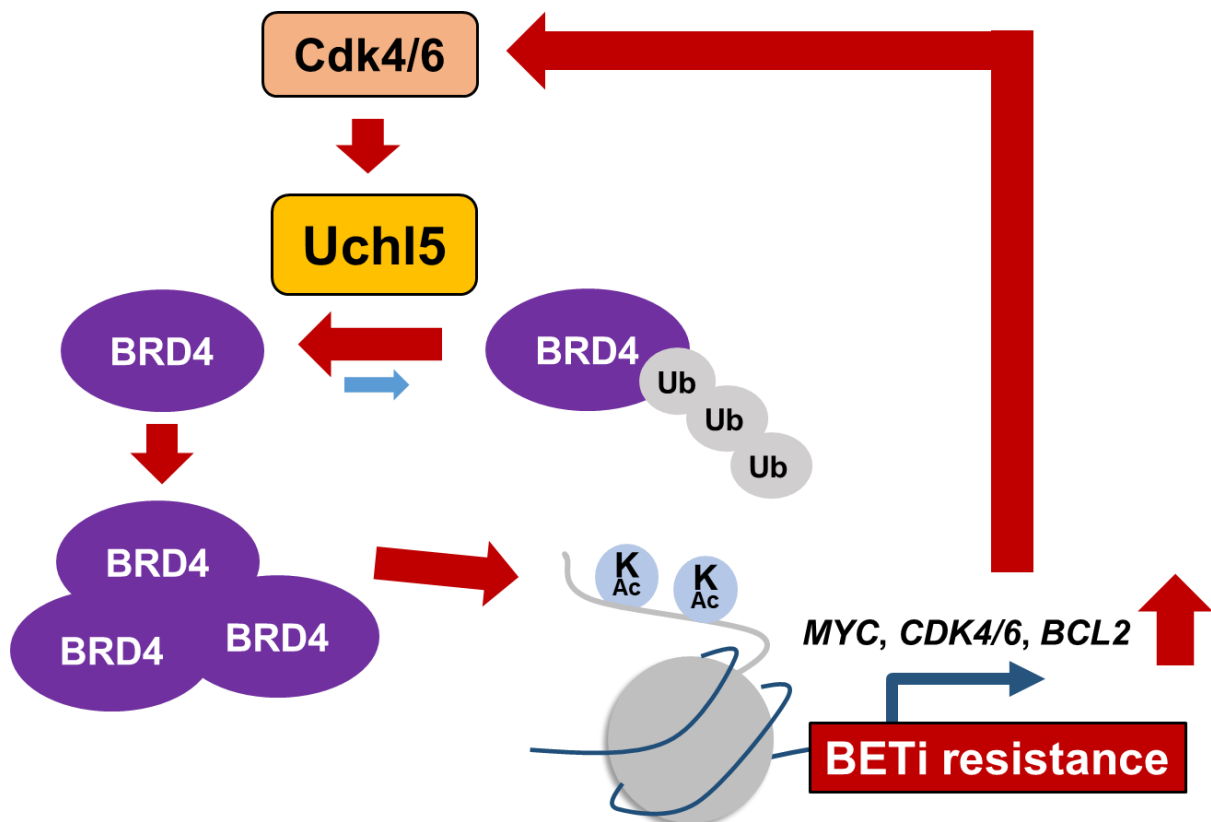


Figure 26. Schematic mechanism of resistance to BET inhibitor in MLL-r leukemia cells.

In this study, we demonstrated that dysregulation of the expression of BRD4-related molecules in response to BRD4 overexpression contributes to BET inhibitor-resistance. In addition, we showed that UCHL5 is involved in BRD4 stabilization, and CDK4/6 contributes to the regulation of UCHL5 expression. Moreover, as CDK4/6 expression levels are regulated via BRD4, we propose that a CDK4/6-UCHL5-BRD4 feedback loop contributes to BET inhibitor-resistance.

総括

ALにおいて、*MLL* 遺伝子の転座を伴う *MLL* 遺伝子関連白血病は、従来の治療では寛解効果が乏しく予後不良であるため、新規治療薬の開発が喫緊の課題である。その状況の中で、*BET* ファミリータンパク質を標的とした *BET* 阻害剤は、*MLL* 遺伝子関連白血病の発症に関わる *SEC* による異常な転写活性化を阻害することで強力な抗腫瘍効果を示し、*MLL* 遺伝子関連白血病における有望な治療薬として期待されている。しかしながら、治療に用いるほとんどの薬物において、長期使用による薬剤耐性の出現は重要な問題として考えられている。*BET* 阻害剤についても例外ではなく、長期使用による薬剤耐性の獲得が懸念されており、*BET* 阻害剤に対する耐性化機序の解明ならびに *BET* 阻害剤耐性化を克服する治療標的の同定は重要な課題である。

BET 阻害剤に対する薬剤耐性化をもたらす候補分子は、*shRNA* ライブラリーを用いた網羅的な探索研究により、乳がんや大腸がんなどのいくつかのがん種において同定されている(88)。また近年では、大腸がん細胞において腫瘍微小環境を構成する間質細胞が大腸がん細胞に対して *BET* 阻害剤耐性をもたらすことも報告されており(80)、耐性化機序が様々な側面から明らかにされてきている。一方で、ALにおける *BET* 阻害剤に対する獲得耐性については、*Wnt/β-catenin* シグナル経路や *NF-κB* シグナル経路の活性化が報告されているが、それらの報告においても他のシグナル経路の関与が示唆されており、さらなる耐性化機序の解明が必要である。

本研究では、現在臨床試験が進められている *BET* 阻害剤である *OTX015* の長期間処置により、*OTX015* 耐性を獲得した *MLL* 遺伝子関連白血病細胞を樹立し、耐性株の性状解析による新規の *BET* 阻害剤耐性化機序ならびに *BET* 阻害剤耐性を克服する治療標的を探索した。第1章では、*OTX015* に感受性を持つ親株と比較した耐性株の性状解析を行い、耐性株では *BRD4* タンパク質の著明な発現上昇に伴う *BRD4* 制御分子の転写、翻訳亢進が起こっていることを明らかにした。また、*BRD4* タンパク質の発現上昇が、脱ユビキチン化酵素である *UCHL5* の発現上昇を介した *BRD4* タンパク質の分解抑制により起こり得る可能性を示した。第2章では、耐性株で発現上昇が認められた *UCHL5* に着目し、耐性株の増殖、生存および *BRD4* タンパク質の分解における *UCHL5* の寄与について検討し、*shRNA* を用いた *UCHL5* ノックダウンならびに *UCHL5* 阻害剤の処置により、耐性株における *BRD4* タンパク質の発現低下、細胞増殖抑制、アポトーシスを誘導することを明らかにした。また、*CDK4/6* 阻害剤の処置により *UCHL5* の発現が低下したことから、*CDK4/6* が *UCHL5* の発現を制御し得ることを示した。これらの結果から、*CDK4/6* および *UCHL5* が *BRD4* タンパク質の安定化に寄与しており、*MLL* 遺伝子関連白血病における *BET* 阻害剤耐性を克服するためには、*BRD4* タンパク質の発現を減少させることが重要であることが示唆された。また、*UCHL5* は *BET* 阻害剤耐性化をもたらす機序の1つである *Wnt/β-catenin* シグナル経路関連分子の安定化にも寄与していることから、*UCHL5* は *BET* 阻害剤耐性を克服する鍵となる分子であることが期待される。

今後の展望として、本研究で明らかにした耐性化機序の経路が、*MLL* 遺伝子関連白血病における他の染色体転座の型においても寄与しているのか、またはがん種によらず寄与してい

るのかを検証することが必要であると考え。また、本研究で用いた CDK4/6 阻害剤は、現在乳がん治療において、臨床で使用されている薬剤であり (89, 90)、本研究で提唱する CDK4/6-UCHL5-BRD4 のフィードバックループが CDK4/6 阻害剤に対する耐性化にも関与する可能性は十分あると考えられ、本研究で得られた知見が他の薬剤の耐性化機序の理解につながることを期待される。

以上より本研究では、BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞における性状解析に基づいて、CDK4/6 と UCHL5 からなる BRD4 タンパク質分解抑制経路が重要な 1 つであることを明らかにした。また、この経路を標的とする UCHL5 および CDK4/6 阻害剤は、BET 阻害剤耐性を克服する有効な治療薬になる可能性を示した。本基礎的研究の成果は、BET 阻害剤の薬剤耐性という課題への対策に資する重要な知見と考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原英司 教授ならびに細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教に心から御礼申し上げます。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤伸一 教授、同統合薬科学系 高田和幸 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、MLL-AF5q31 細胞を分与いただきました京都府立医科大学 小児科学教室 今村俊彦 講師、shRNA 発現プラスミドベクターの作出ならびに機能評価をしていただきました野崎徳洲会病院附属研究所 分子生物学研究部 笹川覚 主任研究員、研究に対する懇切丁寧な指導、助言をはじめとした多大なご協力をいただきました京都薬科大学 病態生理学分野 今吉菜月 学士には謹んで深く感謝の意を表します。

博士課程の4年間の研究生生活において、いついかなる時も支えて下さった、京都府立医科大学大学院医学研究科 泌尿器外科学 宮下雅亜 博士、京都薬科大学病態生理学分野 河西翔平 博士、黒田絵莉子 博士、角陽子 博士、若林亮介 博士、友金眞光 学士、佐野友亮 学士、杉山雄輝 学士、清水大器 学士、松井透磨 学士、吉澤正人 学士、羽立祐貴 学士、藤堂暢久 学士の諸氏および同分野に所属する学部生諸氏に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

最後に、博士課程へと進む私の意志を理解し、4年間の大学院生活を支えていただいた両親に心から深く感謝いたします。

引用文献

1. Jabbour, E. J.; Faderl, S.; Kantarjian, H. M. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin. Proc.* **2005**, *80*, 1517–1527.
2. Zwaan, C. M.; Kaspers, G. J. L. Possibilities for Tailored and Targeted Therapy in Paediatric Acute Myeloid Leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2004**, *127*, 264–279.
3. Ohtake, S.; Miyawaki, S.; Fujita, H.; Kiyoi, H.; Shinagawa, K.; Usui, N.; Okumura, H.; Miyamura, K.; Nakaseko, C.; Miyazaki, Y.; Fujieda, A.; Nagai, T.; Yamane, T.; Taniwaki, M.; Takahashi, M.; Yagasaki, F.; Kimura, Y.; Asou, N.; Sakamaki, H.; Handa, H.; Honda, S.; Ohnishi, K.; Naoe, T.; Ohno, R. Randomized Study of Induction Therapy Comparing Standard-Dose Idarubicin with High-Dose Daunorubicin in Adult Patients with Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia: The JALSGAML201 Study. *Blood.* **2011**, *117*, 2358–2365.
4. Hayakawa, F.; Sakura, T.; Yujiri, T.; Kondo, E.; Fujimaki, K.; Sasaki, O.; Miyatake, J.; Handa, H.; Ueda, Y.; Aoyama, Y.; Takada, S.; Tanaka, Y.; Usui, N.; Miyawaki, S.; Suenobu, S.; Horibe, K.; Kiyoi, H.; Ohnishi, K.; Miyazaki, Y.; Ohtake, S.; Kobayashi, Y.; Matsuo, K.; Naoe, T. Markedly Improved Outcomes and Acceptable Toxicity in Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment with a Pediatric Protocol: A Phase II Study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *Blood Cancer J.* **2014**, *4*, e252-9.
5. Sakamaki, H.; Miyawaki, S.; Ohtake, S.; Emi, N.; Yagasaki, F.; Mitani, K.; Matsuda, S.; Kishimoto, Y.; Miyazaki, Y.; Asou, N.; Takahashi, M.; Ogawa, Y.; Honda, S.; Ohno, R. Allogeneic Stem Cell Transplantation versus Chemotherapy as Post-Remission Therapy for Intermediate or Poor Risk Adult Acute Myeloid Leukemia: Results of the JALSG AML97 Study. *Int. J. Hematol.* **2010**, *91*, 284–292.
6. Perl, A. E.; Martinelli, G.; Cortes, J. E.; Neubauer, A.; Berman, E.; Paolini, S.; Montesinos, P.; Baer, M. R.; Larson, R. A.; Ustun, C.; Fabbiano, F.; Erba, H. P.; Di Stasi, A.; Stuart, R.; Olin, R.; Kasner, M.; Ciceri, F.; Chou, W.-C.; Podoltsev, N.; Recher, C.; Yokoyama, H.; Hosono, N.; Yoon, S.-S.; Lee, J.-H.; Pardee, T.; Fathi, A. T.; Liu, C.; Hasabou, N.; Liu, X.; Bahceci, E.; Levis, M. J. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3 -Mutated AML. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1728–1740.
7. DiNardo, C. D.; Jonas, B. A.; Pullarkat, V.; Thirman, M. J.; Garcia, J. S.; Wei, A. H.; Konopleva, M.; Döhner, H.; Letai, A.; Fenaux, P.; Koller, E.; Havelange, V.; Leber, B.; Esteve, J.; Wang, J.; Pejsa, V.; Hájek, R.; Porkka, K.; Illés, Á.; Lavie, D.; Lemoli, R. M.; Yamamoto, K.; Yoon, S.-S.; Jang, J.-H.; Yeh, S.-P.; Turgut, M.; Hong, W.-J.; Zhou, Y.; Potluri, J.; Pratz, K. W. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 617–629.
8. Yanada, M.; Takeuchi, J.; Sugiura, I.; Akiyama, H.; Usui, N.; Yagasaki, F.; Kobayashi, T.; Ueda, Y.; Takeuchi, M.; Miyawaki, S.; Maruta, A.; Emi, N.; Miyazaki, Y.; Ohtake, S.; Jinnai, I.; Matsuo, K.; Naoe, T.; Ohno, R. High Complete Remission Rate and Promising Outcome by

- Combination of Imatinib and Chemotherapy for Newly Diagnosed BCR-ABL-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Phase II Study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 460–466.
9. Tomizawa, D.; Koh, K.; Sato, T.; Kinukawa, N.; Morimoto, A.; Isoyama, K.; Kosaka, Y.; Oda, T.; Oda, M.; Hayashi, Y.; Eguchi, M.; Horibe, K.; Nakahata, T.; Mizutani, S.; Ishii, E. Outcome of Risk-Based Therapy for Infant Acute Lymphoblastic Leukemia with or without an MLL Gene Rearrangement, with Emphasis on Late Effects: A Final Report of Two Consecutive Studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia.* **2007**, *21*, 2258–2263.
 10. Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F. R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B. L.; Fenaux, P.; Larson, R. A.; Levine, R. L.; Lo-Coco, F.; Naoe, T.; Niederwieser, D.; Ossenkoppele, G. J.; Sanz, M.; Sierra, J.; Tallman, M. S.; Tien, H. F.; Wei, A. H.; Löwenberg, B.; Bloomfield, C. D. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood.* **2017**, *129*, 424–447.
 11. Tamai, H.; Inokuchi, K. 11q23/MLL Acute Leukemia : Update of Clinical Aspects. *J. Clin. Exp. Hematop.* **2010**, *50*, 91–98.
 12. Hsieh, J. J. D.; Cheng, E. H. Y.; Korsmeyer, S. J. Taspase1: A Threonine Aspartase Required for Cleavage of MLL and Proper HOX Gene Expression. *Cell.* **2003**, *115*, 293–303.
 13. Milne, T. A.; Briggs, S. D.; Brock, H. W.; Martin, M. E.; Gibbs, D.; Allis, C. D.; Hess, J. L. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Mol. Cell.* **2002**, *10*, 1107–1117.
 14. Nakamura, T.; Mori, T.; Tada, S.; Krajewski, W.; Rozovskaia, T.; Wassell, R.; Dubois, G.; Mazo, A.; Croce, C. M.; Canaani, E. ALL-1 Is a Histone Methyltransferase That Assembles a Supercomplex of Proteins Involved in Transcriptional Regulation. *Mol. Cell.* **2002**, *10*, 1119–1128.
 15. Ernst, P.; Wang, J.; Huang, M.; Goodman, R. H.; Korsmeyer, S. J. MLL and CREB Bind Cooperatively to the Nuclear Coactivator CREB-Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 2249–2258.
 16. Yokoyama, A.; Wang, Z.; Wysocka, J.; Sanyal, M.; Aufiero, D. J.; Kitabayashi, I.; Herr, W.; Cleary, M. L. Leukemia Proto-Oncoprotein MLL Forms a SET1 like Complex with Menin to Regulate Hox Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *104*, 2550–2550.
 17. Meyer, C.; Burmeister, T.; Gröger, D.; Tsauro, G.; Fehina, L.; Renneville, A.; Sutton, R.; Venn, N. C.; Emerenciano, M.; Pombo-De-Oliveira, M. S.; Barbieri Blunck, C.; Almeida Lopes, B.; Zuna, J.; Trka, J.; Ballerini, P.; Lapillonne, H.; De Braekeleer, M.; Cazzaniga, G.; Corral Abascal, L.; Van Der Velden, V. H. J.; Delabesse, E.; Park, T. S.; Oh, S. H.; Silva, M. L. M.; Lund-Aho, T.; Juvonen, V.; Moore, A. S.; Heidenreich, O.; Vormoor, J.; Zerkalenkova, E.; Olshanskaya, Y.; Bueno, C.; Menendez, P.; Teigler-Schlegel, A.; Zur Stadt, U.; Lentès, J.; Göhring, G.; Kustanovich, A.; Aleinikova, O.; Schäfer, B. W.; Kubetzko, S.; Madsen, H. O.; Gruhn, B.;

- Duarte, X.; Gameiro, P.; Lippert, E.; Bidet, A.; Cayuela, J. M.; Clappier, E.; Alonso, C. N.; Zwaan, C. M.; Van Den Heuvel-Eibrink, M. M.; Izraeli, S.; Trakhtenbrot, L.; Archer, P.; Hancock, J.; Möricke, A.; Alten, J.; Schrappe, M.; Stanulla, M.; Strehl, S.; Attarbaschi, A.; Dworzak, M.; Haas, O. A.; Panzer-Grümayer, R.; Sedék, L.; Szczepa, T.; Caye, A.; Suarez, L.; Cavé, H.; Marschalek, R. The MLL Recombinome of Acute Leukemias in 2017. *Leukemia*. **2018**, *32*, 273–284.
18. Yokoyama, A.; Lin, M.; Naresh, A.; Kitabayashi, I.; Cleary, M. L. A Higher-Order Complex Containing AF4 and ENL Family Proteins with P-TEFb Facilitates Oncogenic and Physiologic MLL-Dependent Transcription. *Cancer Cell*. **2010**, *17*, 198–212.
 19. Krivtsov, A. V.; Feng, Z.; Lemieux, M. E.; Faber, J.; Vempati, S.; Sinha, A. U.; Xia, X.; Jesneck, J.; Bracken, A. P.; Silverman, L. B.; Kutok, J. L.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. *Cancer Cell*. **2008**, *14*, 355–368.
 20. Zhang, W.; Xia, X.; Reisenauer, M. R.; Hemenway, C. S.; Kone, B. C. Dot1a-AF9 Complex Mediates Histone H3 Lys-79 Hypermethylation and Repression of ENaCa in an Aldosterone-Sensitive Manner. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18059–18068.
 21. Okada, Y.; Feng, Q.; Lin, Y.; Jiang, Q.; Li, Y.; Coffield, V. M.; Su, L.; Xu, G.; Zhang, Y. HDOT1L Links Histone Methylation to Leukemogenesis. *Cell*. **2005**, *121*, 167–178.
 22. Filippakopoulos, P.; Knapp, S. Targeting Bromodomains: Epigenetic Readers of Lysine Acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 337–356.
 23. Luo, Z.; Lin, C.; Shilatifard, A. The Super Elongation Complex (SEC) Family in Transcriptional Control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 543–547.
 24. Thomas, M.; Geßner, A.; Vornlocher, H. P.; Hadwiger, P.; Greil, J.; Heidenreich, O. Targeting MLL-AF4 with Short Interfering RNAs Inhibits Clonogenicity and Engraftment of t(4;11)-Positive Human Leukemic Cells. *Blood*. **2005**, *106*, 3559–3566.
 25. Shukla, N.; Wetmore, C.; O'Brien, M. M.; Silverman, L. B.; Brown, P.; Cooper, T. M.; Thomson, B.; Blakemore, S. J.; Daigle, S.; Suttle, B.; Waters, N. J.; Krivtsov, A. V.; Armstrong, S. A.; Ho, P. T.; Gore, L. Final Report of Phase 1 Study of the DOT1L Inhibitor, Pinometostat (EPZ-5676), in Children with Relapsed or Refractory MLL-r Acute Leukemia. *Blood*. **2016**, *128*, 2780–2780.
 26. Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Basavapathruni, A.; Jin, L.; Boriack-Sjodin, P. A.; Allain, C. J.; Klaus, C. R.; Raimondi, A.; Scott, M. P.; Waters, N. J.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. Potent Inhibition of DOT1L as Treatment of MLL-Fusion Leukemia. *Blood*. **2013**, *122*, 1017–1025.
 27. Cao, F.; Townsend, E. C.; Karatas, H.; Xu, J.; Li, L.; Lee, S.; Liu, L.; Chen, Y.; Ouillette, P.; Zhu, J.; Hess, J. L.; Atadja, P.; Lei, M.; Qin, Z. S.; Malek, S.; Wang, S.; Dou, Y. Targeting MLL1 H3K4 Methyltransferase Activity in Mixed-Lineage Leukemia. *Mol. Cell*. **2014**, *53*, 247–261.
 28. Shi, A.; Murai, M. J.; He, S.; Lund, G.; Hartley, T.; Purohit, T.; Reddy, G.; Chruszcz, M.; Grembecka, J.; Cierpicki, T. Structural Insights into Inhibition of the Bivalent Menin-MLL

- Interaction by Small Molecules in Leukemia. *Blood*. **2012**, *120*, 4461–4469.
29. Borkin, D.; He, S.; Miao, H.; Kempinska, K.; Pollock, J.; Chase, J.; Purohit, T.; Malik, B.; Zhao, T.; Wang, J.; Wen, B.; Zong, H.; Jones, M.; Danet-Desnoyers, G.; Guzman, M. L.; Talpaz, M.; Bixby, D. L.; Sun, D.; Hess, J. L.; Muntean, A. G.; Maillard, I.; Cierpicki, T.; Grembecka, J. Pharmacologic Inhibition of the Menin-MLL Interaction Blocks Progression of MLL Leukemia In Vivo. *Cancer Cell*. **2015**, *27*, 589–602.
 30. Rahman, S.; Sowa, M. E.; Ottinger, M.; Smith, J. A.; Shi, Y.; Harper, J. W.; Howley, P. M. The Brd4 Extraterminal Domain Confers Transcription Activation Independent of PTEFb by Recruiting Multiple Proteins, Including NSD3. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 2641–2652.
 31. Devaiah, B. N.; Lewis, B. A.; Cherman, N.; Hewitt, M. C.; Albrecht, B. K.; Robey, P. G.; Ozato, K.; Sims, R. J.; Singer, D. S. BRD4 Is an Atypical Kinase That Phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 6927–6932.
 32. Houzelstein, D.; Bullock, S. L.; Lynch, D. E.; Grigorieva, E. F.; Wilson, V. A.; Beddington, R. S. P. Growth and Early Postimplantation Defects in Mice Deficient for the Bromodomain-Containing Protein Brd4. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3794–3802.
 33. Lamonica, J. M.; Deng, W.; Kadauke, S.; Campbell, A. E.; Gamsjaeger, R.; Wang, H.; Cheng, Y.; Billin, A. N.; Hardison, R. C.; Mackay, J. P.; Blobel, G. A. Bromodomain Protein Brd3 Associates with Acetylated GATA1 to Promote Its Chromatin Occupancy at Erythroid Target Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*.
 34. Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A. R.; Herrmann, H.; Sison, E. A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; Taylor, M. J.; Johns, C.; Chicas, A.; Mulloy, J. C.; Kogan, S. C.; Brown, P.; Valent, P.; Bradner, J. E.; Lowe, S. W.; Vakoc, C. R. RNAi Screen Identifies Brd4 as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukaemia. *Nature*. **2011**, *478*, 524–528.
 35. Boi, M.; Gaudio, E.; Bonetti, P.; Kwee, I.; Bernasconi, E.; Tarantelli, C.; Rinaldi, A.; Testoni, M.; Cascione, L.; Ponzoni, M.; Mensah, A. A.; Stathis, A.; Stussi, G.; Riveiro, M. E.; Herait, P.; Inghirami, G.; Cvitkovic, E.; Zucca, E.; Bertoni, F. The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-Cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1628–1638.
 36. Coudé, M. M.; Braun, T.; Berrou, J.; Dupont, M.; Bertrand, S.; Masse, A.; Raffoux, E.; Itzykson, R.; Delord, M.; Riveiro, M. E.; Herait, P.; Baruchel, A.; Dombret, H.; Gardin, C. BET Inhibitor OTX015 Targets BRD2 and BRD4 and Decreases C-MYC in Acute Leukemia Cells. *Oncotarget*. **2015**, *6*, 17698–17712.
 37. Imayoshi, N.; Yoshioka, M.; Tanaka, K.; Yang, S. M.; Akahane, K.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Inukai, T.; Okada, S.; Maloney, D. J.; Nakahata, T.; Takita, J.; Kato, I.; Ashihara, E. CN470 Is a BET/CBP/P300 Multi-Bromodomain Inhibitor and Has an Anti-Tumor Activity against MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *590*, 49–54.

38. Moros, A.; Rodríguez, V.; Saborit-Villarroya, I.; Montravel, A.; Balsas, P.; Sandy, P.; Martínez, A.; Wiestner, A.; Normant, E.; Campo, E.; Pérez-Galán, P.; Colomer, D.; Roué, G. Synergistic Antitumor Activity of Lenalidomide with the BET Bromodomain Inhibitor CPI203 in Bortezomib-Resistant Mantle Cell Lymphoma. *Leukemia*. **2014**, *28*, 2049–2059.
39. Mirguet, O.; Gosmini, R.; Toum, J.; Clément, C. A.; Barnathan, M.; Brusq, J. M.; Mordaunt, J. E.; Grimes, R. M.; Crowe, M.; Pineau, O.; Ajakane, M.; Daugan, A.; Jeffrey, P.; Cutler, L.; Haynes, A. C.; Smithers, N. N.; Chung, C. W.; Bamborough, P.; Uings, I. J.; Lewis, A.; Witherington, J.; Parr, N.; Prinjha, R. K.; Nicodème, E. Discovery of Epigenetic Regulator I-Bet762: Lead Optimization to Afford a Clinical Candidate Inhibitor of the Bet Bromodomains. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7501–7515.
40. Picaud, S.; Da Costa, D.; Thanasopoulou, A.; Filippakopoulos, P.; Fish, P. V.; Philpott, M.; Fedorov, O.; Brennan, P.; Bunnage, M. E.; Owen, D. R.; Bradner, J. E.; Taniere, P.; O’Sullivan, B.; Müller, S.; Schwaller, J.; Stankovic, T.; Knapp, S. PFI-1, a Highly Selective Protein Interaction Inhibitor, Targeting BET Bromodomains. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3336–3346.
41. Imayoshi, N.; Yoshioka, M.; Chauhan, J.; Nakata, S.; Toda, Y.; Fletcher, S.; Strovel, J. W.; Takata, K.; Ashihara, E. CG13250, a Novel Bromodomain Inhibitor, Suppresses Proliferation of Multiple Myeloma Cells in an Orthotopic Mouse Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *484*, 262–268.
42. Dawson, M. A.; Prinjha, R. K.; Dittmann, A.; Giotopoulos, G.; Bantscheff, M.; Chan, W. I.; Robson, S. C.; Chung, C. W.; Hopf, C.; Savitski, M. M.; Huthmacher, C.; Gudgin, E.; Lugo, D.; Beinke, S.; Chapman, T. D.; Roberts, E. J.; Soden, P. E.; Auger, K. R.; Mirguet, O.; Doehner, K.; Delwel, R.; Burnett, A. K.; Jeffrey, P.; Drewes, G.; Lee, K.; Huntly, B. J. P.; Kouzarides, T. Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-Fusion Leukaemia. *Nature*. **2011**, *478*, 529–533.
43. Hope, K. J.; Jin, L.; Dick, J. E. Acute Myeloid Leukemia Originates from a Hierarchy of Leukemic Stem Cell Classes That Differ in Self-Renewal Capacity. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 738–743.
44. Hosen, N.; Park, C. Y.; Tatsumi, N.; Oji, Y.; Sugiyama, H.; Gramatzki, M.; Krensky, A. M.; Weissman, I. L. CD96 Is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 11008–11013.
45. She, M.; Niu, X.; Chen, X.; Li, J.; Zhou, M.; He, Y.; Le, Y.; Guo, K. Resistance of Leukemic Stem-like Cells in AML Cell Line KG1a to Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Lett.* **2012**, *318*, 173–179.
46. Darwish, N. H. E.; Sudha, T.; Godugu, K.; Elbaz, O.; Abdelghaffar, H. A.; Hassan, E. E. A.; Mousa, S. A. Acute Myeloid Leukemia Stem Cell Markers in Prognosis and Targeted Therapy: Potential Impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1. *Oncotarget*. **2016**, *7*, 57811–57820.
47. Jang, J. E.; Eom, J. I.; Jeung, H. K.; Cheong, J. W.; Lee, J. Y.; Kim, J. S.; Min, Y. H. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid

- Leukemia Stem Cells. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 2781–2794.
48. Fong, C. Y.; Gilan, O.; Lam, E. Y. N.; Rubin, A. F.; Ftouni, S.; Tyler, D.; Stanley, K.; Sinha, D.; Yeh, P.; Morison, J.; Giotopoulos, G.; Lugo, D.; Jeffrey, P.; Lee, S. C. W.; Carpenter, C.; Gregory, R.; Ramsay, R. G.; Lane, S. W.; Abdel-Wahab, O.; Kouzarides, T.; Johnstone, R. W.; Dawson, S. J.; Huntly, B. J. P.; Prinjha, R. K.; Papenfuss, A. T.; Dawson, M. A. BET Inhibitor Resistance Emerges from Leukaemia Stem Cells. *Nature*. **2015**, *525*, 538–542.
49. Rathert, P.; Roth, M.; Neumann, T.; Muerdter, F.; Roe, J. S.; Muhar, M.; Deswal, S.; Cerny-Reiterer, S.; Peter, B.; Jude, J.; Hoffmann, T.; Boryn, L. M.; Axelsson, E.; Schweifer, N.; Tontsch-Grunt, U.; Dow, L. E.; Gianni, D.; Pearson, M.; Valent, P.; Stark, A.; Kraut, N.; Vakoc, C. R.; Zuber, J. Transcriptional Plasticity Promotes Primary and Acquired Resistance to BET Inhibition. *Nature*. **2015**, *525*, 543–547.
50. Hishiki, K.; Akiyama, M.; Kanegae, Y.; Ozaki, K.; Ohta, M.; Tsuchitani, E.; Kaito, K.; Yamada, H. NF- κ B Signaling Activation via Increases in BRD2 and BRD4 Confers Resistance to the Bromodomain Inhibitor I-BET151 in U937 Cells. *Leuk. Res.* **2018**, *74*, 57–63.
51. Amorim, S.; Stathis, A.; Gleeson, M.; Iyengar, S.; Magarotto, V.; Leleu, X.; Morschhauser, F.; Karlin, L.; Broussais, F.; Rezai, K.; Herait, P.; Kahatt, C.; Lokiec, F.; Salles, G.; Facon, T.; Palumbo, A.; Cunningham, D.; Zucca, E.; Thieblemont, C. Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Lymphoma or Multiple Myeloma: A Dose-Escalation, Open-Label, Pharmacokinetic, Phase 1 Study. *Lancet Haematol.* **2016**, *3*, e196–e204.
52. Berthon, C.; Raffoux, E.; Thomas, X.; Vey, N.; Gomez-Roca, C.; Yee, K.; Taussig, D. C.; Rezai, K.; Roumier, C.; Herait, P.; Kahatt, C.; Quesnel, B.; Michallet, M.; Recher, C.; Lokiec, F.; Preudhomme, C.; Dombret, H. Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study. *Lancet Haematol.* **2016**, *3*, e186–e195.
53. Imamura, T.; Morimoto, A.; Ikushima, S.; Kakazu, N.; Hada, S.; Tabata, Y.; Yagi, T.; Inaba, T.; Hibi, S.; Sugimoto, T.; Imashuku, S. A Novel Infant Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line with MLL-AF5q31 Fusion Transcript. *Leukemia*. **2002**, *16*, 2302–2308.
54. Jin, X.; Yan, Y.; Wang, D.; Ding, D.; Ma, T.; Ye, Z.; Jimenez, R.; Wang, L.; Wu, H.; Huang, H. DUB3 Promotes BET Inhibitor Resistance and Cancer Progression by Deubiquitinating BRD4. *Mol. Cell*. **2018**, *71*, 592–605.e4.
55. Dai, X.; Gan, W.; Li, X.; Wang, S.; Zhang, W.; Huang, L.; Liu, S.; Zhong, Q.; Guo, J.; Zhang, J.; Chen, T.; Shimizu, K.; Beca, F.; Blattner, M.; Vasudevan, D.; Buckley, D. L.; Qi, J.; Buser, L.; Liu, P.; Inuzuka, H.; Beck, A. H.; Wang, L.; Wild, P. J.; Garraway, L. A.; Rubin, M. A.; Barbieri, C. E.; Wong, K. K.; Muthuswamy, S. K.; Huang, J.; Chen, Y.; Bradner, J. E.; Wei, W. Prostate Cancer-Associated SPOP Mutations Confer Resistance to BET Inhibitors through Stabilization of BRD4. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1063–1071.
56. Taki, T.; Kano, H.; Taniwaki, M.; Sako, M.; Yanagisawa, M.; Hayashi, Y. AF5q31, a Newly Identified AF4-Related Gene, Is Fused to MLL in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia with Ins(5;11)(Q31;Q13q23). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 14535–14540.

57. Quentmeier, H.; Reinhardt, J.; Zaborski, M.; Drexler, H. G. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *Leukemia*. **2003**, *17*, 120–124.
58. Brown, P.; Small, D. FLT3 Inhibitors: A Paradigm for the Development of Targeted Therapeutics for Paediatric Cancer. *Eur. J. Cancer*. **2004**, *40*, 707–721.
59. Noguchi, T.; Hidaka, K.; Kobayashi, S.; Matsumoto, K.; Yoshioka, M.; Hu, X.; Maloney, D. J.; Yang, S. M.; Kato, S. A Quinazoline-Based Bromodomain Inhibitor, CN210, Ameliorates Indomethacin-Induced Ileitis in Mice by Inhibiting Inflammatory Cytokine Expression. *Drug Dev. Res.* **2021**, *82*, 1235–1246.
60. Pan, M.; Huang, Y.; Zhu, X.; Lin, X.; Luo, D. MiR-125b-mediated Regulation of Cell Proliferation through the Jagged-1/Notch Signaling Pathway by Inhibiting BRD4 Expression in Psoriasis. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 5227–5236.
61. Tonouchi, E.; Gen, Y.; Muramatsu, T.; Hiramoto, H.; Tanimoto, K.; Inoue, J.; Inazawa, J. MiR-3140 Suppresses Tumor Cell Growth by Targeting BRD4 via Its Coding Sequence and Downregulates the BRD4-NUT Fusion Oncoprotein. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13.
62. Soave, C. L.; Guerin, T.; Liu, J.; Dou, Q. P. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System for Cancer Treatment: Discovering Novel Inhibitors from Nature and Drug Repurposing. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 717–736.
63. Han, W.; Lee, H.; Han, J. K. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase³⁷ Regulates Tcf7 DNA Binding for the Activation of Wnt Signalling. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13.
64. Nan, L.; Jacko, A. M.; Tan, J.; Wang, D.; Zhao, J.; Kass, D. J.; Ma, H.; Zhao, Y. Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase-L5 Promotes TGF β -1 Signaling by de-Ubiquitinating and Stabilizing Smad2/Smad3 in Pulmonary Fibrosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11.
65. Shen, M.; Schmitt, S.; Buac, D.; Dou, Q. P. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System for Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2013**, *17*, 1091–1108.
66. J, Fraile, V Quesada, D, Rodríguez, J, Freije, C, L.-O. Deubiquitinases in Cancer : New Functions and Therapeutic Options. *Oncogene.* **2012**, 2373–2388.
67. Matsumoto, M. L.; Wickliffe, K. E.; Dong, K. C.; Yu, C.; Bosanac, I.; Bustos, D.; Phu, L.; Kirkpatrick, D. S.; Hymowitz, S. G.; Rape, M.; Kelley, R. F.; Dixit, V. M. K11-Linked Polyubiquitination in Cell Cycle Control Revealed by a K11 Linkage-Specific Antibody. *Mol. Cell.* **2010**, *39*, 477–484.
68. Skaug, B.; Jiang, X.; Chen, Z. J. The Role of Ubiquitin in NF-KB Regulatory Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 769–796.
69. Moll, U. M.; Petrenko, O. The MDM2-P53 Interaction. *Mol. Cancer Res.* **2003**, *1*, 1001–1008.
70. Brown, C. J.; Lain, S.; Verma, C. S.; Fersht, A. R.; Lane, D. P. Awakening Guardian Angels: Drugging the P53 Pathway. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 862–873.
71. Aiken, C. T.; Kaake, R. M.; Wang, X.; Huang, L. Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. *Mol. Cell. Proteomics.* **2011**, *10*, R110.006924.
72. Reyes-Turcu, F. E.; Ventii, K. H.; Wilkinson, K. D. Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-

- Specific Deubiquitinating Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 363–397.
73. Josue Ruiz, E.; Pinto-Fernandez, A.; Turnbull, A. P.; Lan, L.; Charlton, T. M.; Scott, H. C.; Damianou, A.; Vere, G.; Riising, E. M.; Da Costa, C.; Krajewski, W. W.; Guerin, D.; Kearns, J. D.; Ioannidis, S.; Katz, M.; McKinnon, C.; O'connell, J.; Moncaut, N.; Rosewell, I.; Nye, E.; Jones, N.; Heride, C.; Gersch, M.; Wu, M.; Dinsmore, C. J.; Hammonds, T. R.; Kim, S.; Komander, D.; Urbe, S.; Clague, M. J.; Kessler, B. M.; Behrens, A. Usp28 Deletion and Small-Molecule Inhibition Destabilizes c-Myc and Elicits Regression of Squamous Cell Lung Carcinoma. *Elife.* **2021**, *10*, 1–23.
74. Nagasaka, M.; Inoue, Y.; Yoshida, M.; Miyajima, C.; Morishita, D.; Tokugawa, M.; Nakamoto, H.; Sugano, M.; Ohoka, N.; Hayashi, H. The Deubiquitinating Enzyme USP17 Regulates C-Myc Levels and Controls Cell Proliferation and Glycolysis. *FEBS Lett.* **2022**, 1–14.
75. Niederkorn, M.; Ishikawa, C.; M. Hueneman, K.; Bartram, J.; Stepanchick, E.; R. Bennett, J.; E. Culver-Cochran, A.; Bolanos, L. C.; Uible, E.; Choi, K.; Wunderlich, M.; Perentesis, J. P.; M. Chlon, T.; Filippi, M. D.; Starczynowski, D. T. The Deubiquitinase USP15 Modulates Cellular Redox and Is a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia.* **2022**, *36*, 438–451.
76. Tian, Z.; D'Arcy, P.; Wang, X.; Ray, A.; Tai, Y. T.; Hu, Y.; Carrasco, R. D.; Richardson, P.; Linder, S.; Chauhan, D.; Anderson, K. C. A Novel Small Molecule Inhibitor of Deubiquitylating Enzyme USP14 and UCHL5 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma and Overcomes Bortezomib Resistance. *Blood.* **2014**, *123*, 706–716.
77. Adams, J. Potential for Proteasome Inhibition in the Treatment of Cancer. *Drug Discov. Today.* **2003**, *8*, 307–315.
78. Lopez-Girona, A.; Mendy, D.; Ito, T.; Miller, K.; Gandhi, A. K.; Kang, J.; Karasawa, S.; Carmel, G.; Jackson, P.; Abbasian, M.; Mahmoudi, A.; Cathers, B.; Rychak, E.; Gaidarova, S.; Chen, R.; Schafer, P. H.; Handa, H.; Daniel, T. O.; Evans, J. F.; Chopra, R. Cereblon Is a Direct Protein Target for Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Lenalidomide and Pomalidomide. *Leukemia.* **2012**, *26*, 2326–2335.
79. Wang, S. A.; Young, M. J.; Wang, Y. C.; Chen, S. H.; Liu, C. Y.; Lo, Y. A.; Jen, H. H.; Hsu, K. C.; Hung, J. J. USP24 Promotes Drug Resistance during Cancer Therapy. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 2690–2707.
80. Wang, W.; Tang, Y. A.; Xiao, Q.; Lee, W. C.; Cheng, B.; Niu, Z.; Oguz, G.; Feng, M.; Lee, P. L.; Li, B.; Yang, Z. huan; Chen, Y. feng; Lan, P.; Wu, X. J.; Yu, Q. Stromal Induction of BRD4 Phosphorylation Results in Chromatin Remodeling and BET Inhibitor Resistance in Colorectal Cancer. *Nat. Commun.* **2021**, *12*.
81. Frank, S. B.; Schulz, V. V.; Miranti, C. K. A Streamlined Method for the Design and Cloning of ShRNAs into an Optimized Dox-Inducible Lentiviral Vector. *BMC Biotechnol.* **2017**, *17*, 1–10.
82. Burrows, J. F.; McGrattan, M. J.; Rasclé, A.; Humbert, M.; Baek, K. H.; Johnston, J. A. DUB-3, A Cytokine-Inducible Deubiquitinating Enzyme That Blocks Proliferation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13993–14000.

83. Yoshida, H.; Jono, H.; Kai, H.; Li, J. D. The Tumor Suppressor Cylindromatosis (CYLD) Acts as a Negative Regulator for Toll-like Receptor 2 Signaling via Negative Cross-Talk with TRAF6 and TRAF7. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41111–41121.
84. López-Otín, C.; Hunter, T. The Regulatory Crosstalk between Kinases and Proteases in Cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2010**, *10*, 278–292.
85. Liu, T.; Yu, J.; Deng, M.; Yin, Y.; Zhang, H.; Luo, K.; Qin, B.; Li, Y.; Wu, C.; Ren, T.; Han, Y.; Yin, P.; Kim, J. J.; Lee, S. B.; Lin, J.; Zhang, L.; Zhang, J.; Nowsheen, S.; Wang, L.; Boughey, J.; Goetz, M. P.; Yuan, J.; Lou, Z. CDK4/6-Dependent Activation of DUB3 Regulates Cancer Metastasis through SNAIL1. *Nat. Commun.* **2017**, *8*.
86. Mahanic, C. S.; Budhavarapu, V.; Graves, J. D.; Li, G.; Lin, W. C. Regulation of E2 Promoter Binding Factor 1 (E2F1) Transcriptional Activity through a Deubiquitinating Enzyme, UCH37. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 26508–26522.
87. Klein, M. E.; Kovatcheva, M.; Davis, L. E.; Tap, W. D.; Koff, A. CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell.* **2018**, *34*, 9–20.
88. Shi, X.; Mihaylova, V. T.; Kuruvilla, L.; Chen, F.; Viviano, S.; Baldassarre, M.; Sperandio, D.; Martinez, R.; Yue, P.; Bates, J. G.; Breckenridge, D. G.; Schlessinger, J.; Turk, B. E.; Calderwood, D. A. Loss of TRIM33 Causes Resistance to BET Bromodomain Inhibitors through MYC and TGF- β -Dependent Mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E4558–E4566.
89. Goetz, M. P.; Toi, M.; Campone, M.; Trédan, O.; Bourayou, N.; Sohn, J.; Park, I. H.; Paluch-Shimon, S.; Huober, J.; Chen, S. C.; Manso, L.; Barriga, S.; Freedman, O. C.; Jaliffe, G. G.; Forrester, T.; Frenzel, M.; Smith, I. C.; Di Leo, A. MONARCH 3: Abemaciclib as Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3638–3646.
90. Rugo, H. S.; Finn, R. S.; Diéras, V.; Ettl, J.; Lipatov, O.; Joy, A. A.; Harbeck, N.; Castrellon, A.; Iyer, S.; Lu, D. R.; Mori, A.; Gauthier, E. R.; Bartlett, C. H.; Gelmon, K. A.; Slamon, D. J. Palbociclib plus Letrozole as First-Line Therapy in Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer with Extended Follow-Up. *Breast Cancer Res. Treat.* **2019**, *174*, 719–729.

Supplementary information

BET 阻害剤耐性を獲得した MLL 遺伝子関連白血病細胞株の
性状解析および BET 阻害剤耐性化機序の解明

2021 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

甘利 圭悟

Supplementary Table 1.

Primer and probe sequences used for detection of human mRNA transcripts in this study.

Target		Length (bp)	Sequence	Accession Number
<i>18S rRNA</i>	Fw	20	5'-GGATCCATTGGAGGGCAAGT-3'	NR_003286.4
	Rv	23	5'-TCCCAAGATCCAACACTACGAGCTT-3'	
	Pr	26	5'-CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA-3'	
<i>BRD4</i>	Fw	22	5'-GCACTGGGCCTACACGACTACT-3'	NM_001379291.1
	Rv	22	5'-GAGAACATCAATCGGACGTCAG-3'	
	Pr	29	5'-CACAAATCAAGTCTAAACTGGAGGCCCGTG-3'	
<i>MYC</i>	Fw	18	5'-GAGCCCCTGGTGCTCCAT-3'	NM_002467.6
	Rv	23	5'-GCAGAAGGTGATCCAGACTCTGA-3'	
	Pr	25	5'-CACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAA-3'	
<i>CDK6</i>	Fw	25	5'-CACTACTCGGTGTGAATGAAGAAAG-3'	NM_001145306.2
	Rv	23	5'-TTGAACATGTGATCAAGACTTG-3'	
	Pr	30	5'-CATATCCTTTATGGTTTCAGTGGGCACTCC-3'	
<i>CDK4</i>	Fw	22	5'-TCAGATCAAGGGAGACCCTCAC-3'	NM_000075.4
	Rv	17	5'-CTGCTCCGGACCGAGCT-3'	
	Pr	20	5'-CCGGAGCCGGTTCCTACGGC-3'	
<i>BCL2</i>	Fw	22	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	NM_000633.3
	Rv	24	5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCTGAA-3'	
	Pr	22	5'-CACAAAGGCATCCCAGCCTCCG-3'	
<i>UCHL5</i>	Fw	20	5'-AAGGCTTGGCACTGAGCAAT-3'	NM_15984.5
	Rv	25	5'-TGCTGATGTCTTCGTATCAAATTCA-3'	
	Pr	29	5'-CAAGTACACAACAGTTTCGCCAGACAGCA-3'	

Fw, forward; Rv, reverse; Pr, probe; bp, base pair.

Supplementary Table 2.

Primer sequences used for detection of mouse mRNA transcripts in this study.

Target	Length (bp)		Sequence	Probe Number	Accession Number
<i>18S rRNA</i>	Fw	20	5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3'	#48	NR_003286.2
	Rv	20	5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'		
<i>Brd4</i>	Fw	26	5'-CCAGGACTTCAACACTATGTTTACAA-3'	#80	NM_001286630.1
	Rv	21	5'-GCTTCTGCCATTAAGACGATG-3'		
<i>Myc</i>	Fw	21	5'-TAGTGCTGCATGAGGAGACAC-3'	#77	NM_001177354.1
	Rv	21	5'-TCTCCACAGACACCACATCAA-3'		
<i>Cdk6</i>	Fw	18	5'-GCCCTTACCTCGGTGGTC-3'	#15	NM_009873.3
	Rv	18	5'-ACAGGGGTGGCATAGCTG-3'		
<i>Bcl2</i>	Fw	20	5'-AGTACCTGAACCGGCATCTG-3'	#75	NM_009741.5
	Rv	21	5'-GGGGCCATATAGTTCACAAA-3'		
<i>Uchl5</i>	Fw	19	5'-GCAGCCAGGAGAAGAACCT-3'	#21	NM_019562.2
	Rv	20	5'-ATAGCCTGAGTGGCACAAGC-3'		
<i>Spop</i>	Fw	22	5'-GGCTCACAAGGCTATCTTAGCA-3'	#25	NM_025287.2
	Rv	22	5'-AATCTCAACCCGATTCTTTTTG-3'		
<i>Dub3</i>	Fw	20	5'-GCTCTTTCCTTCCCAGAAGC-3'	#25	NM_001256973.1
	Rv	23	5'-GACTGTGCTTTCCATTGGTAGTT-3'		
<i>Usp10</i>	Fw	20	5'-CCCTCCATACAGTGGGACTC-3'	#41	NM_001310630.1
	Rv	20	5'-CTCTGGTGCTCCTGTCCATC-3'		
<i>Usp39</i>	Fw	22	5'-CTGGAGACCCTAGGAGTAAACG-3'	#66	NM_138592.4
	Rv	22	5'-GGAGCTACAGGAAAGCCACTAC-3'		

Fw, forward; Rv, reverse; bp, base pair.

Supplementary Table 3.
Primary antibodies used for western blot analysis in this study.

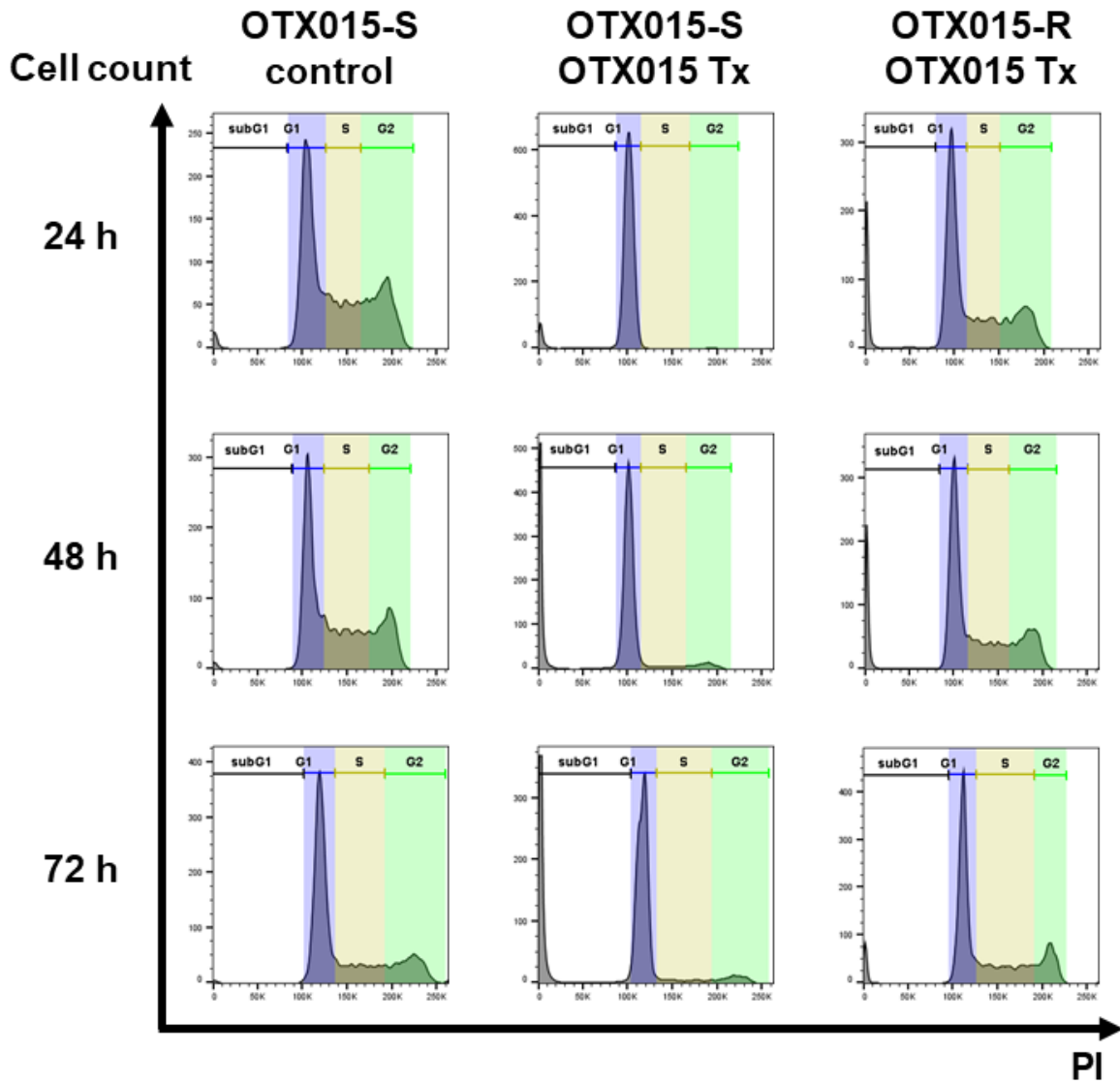
Antibody	Source	Identifier
Anti-c-MYC	Cell Signaling Technology	#5605
Anti-caspase-3	Cell Signaling Technology	#9662
Anti-cleaved caspase-3	Cell Signaling Technology	#9661
Anti-BRD4	Bethyl Laboratories	A301-985A100
Anti-BCL-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-7382
Anti-CDK6	Santa Cruz Biotechnology	sc-7961
Anti-CDK4	Santa Cruz Biotechnology	sc-23896
Anti-UCHL5	Santa Cruz Biotechnology	sc-271002
Anti-Vinculin	Santa Cruz Biotechnology	sc-73614
Anti- β -actin	Sigma-Aldrich	A5441

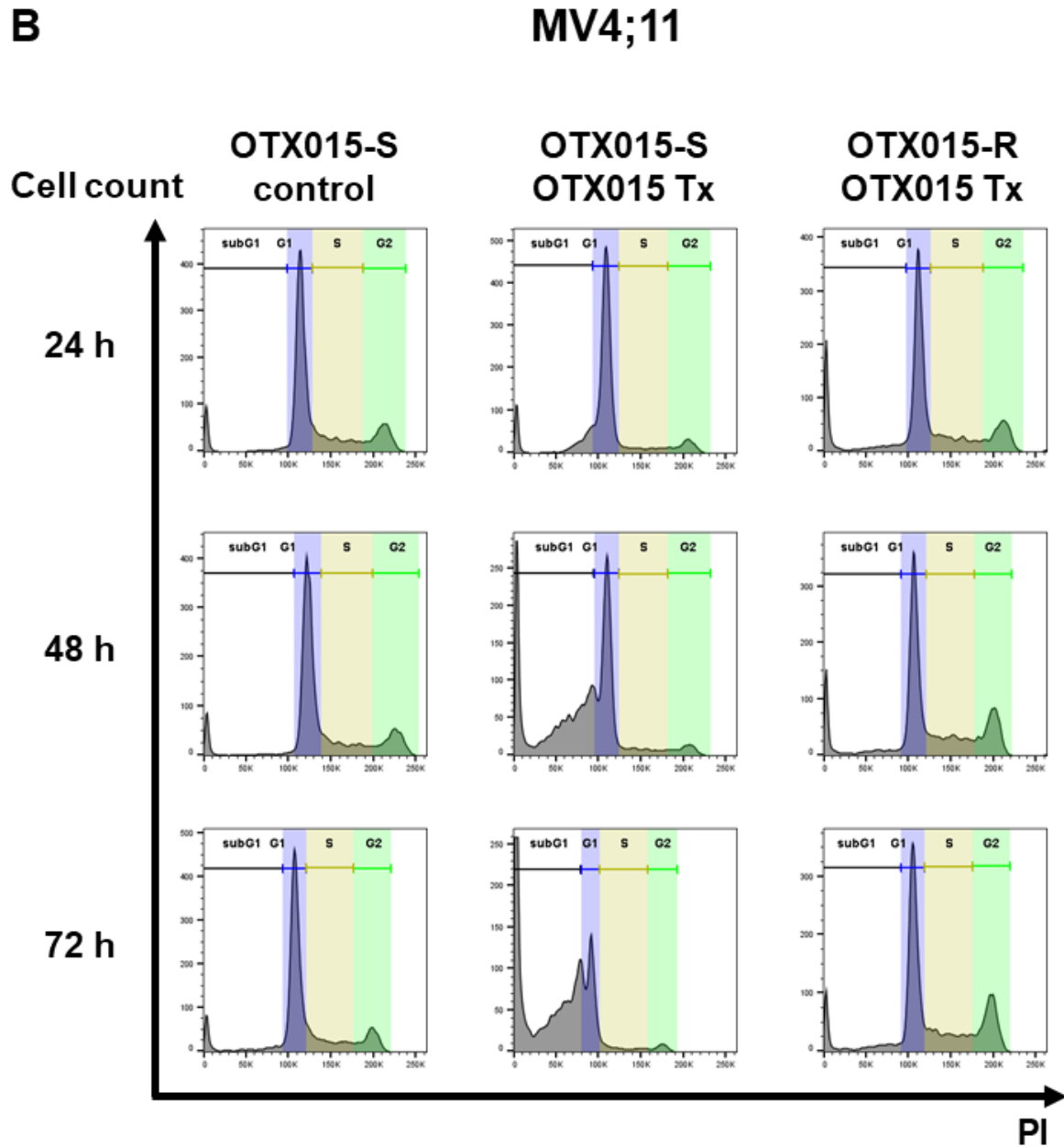
Supplementary Table 4. shRNA sequences used in this study.

Target	Sequence
shUCHL5 #1	5'-GCATGCAATCAAGATGATTGG-3'
shUCHL5 #2	5'-GCAGAAGATAGCAGAGTTACA-3'
shCtrl	5'-CGCTGAGTACTTCGAAATGTC-3'

A

MLL-AF5q31

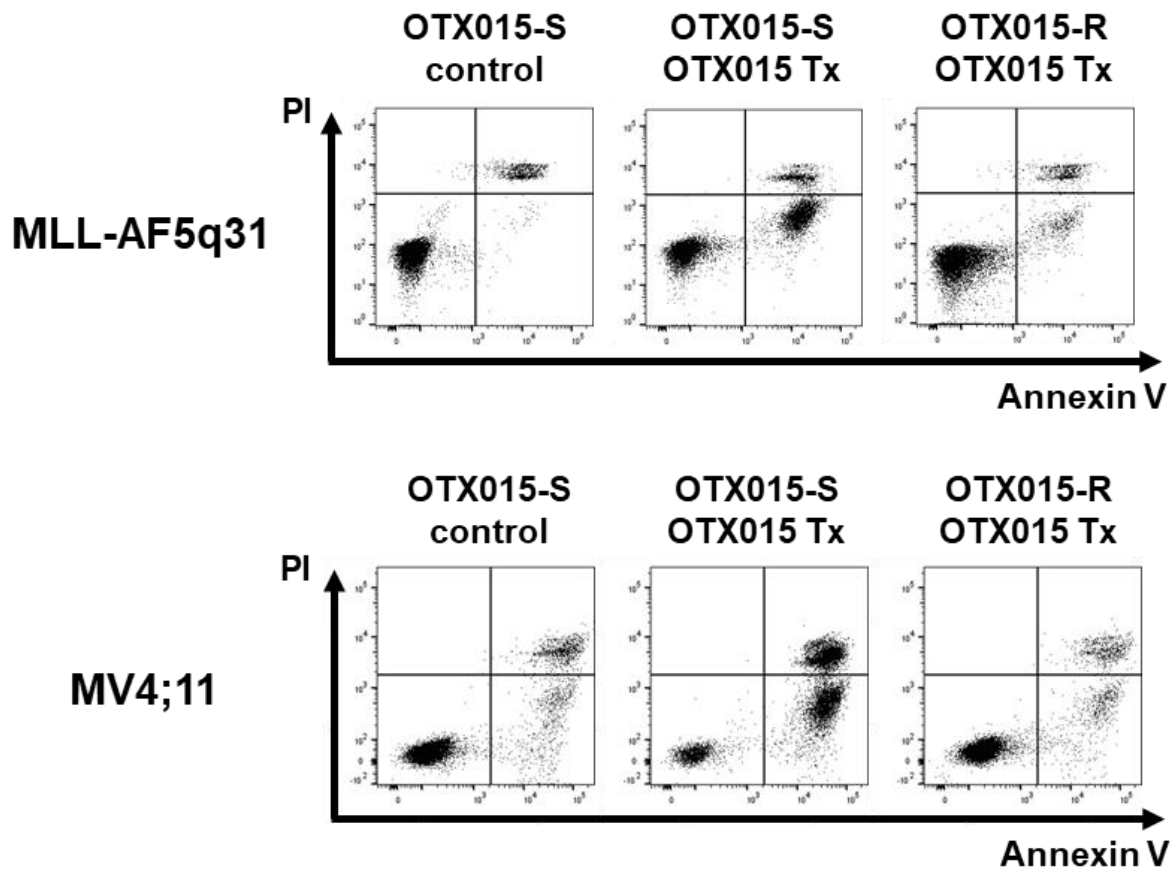




Supplementary Figure 1. Histograms showing the effects of OTX015 treatment on the cell cycle of MLL-r cells.

(A) MLL-AF5q31 cells and (B) MV4;11 cells were treated with DMSO or OTX015, followed by analysis of cell cycle status. Results shown are representative of three independent experiments. Control, DMSO treatment; OTX015 Tx, OTX015 treatment.

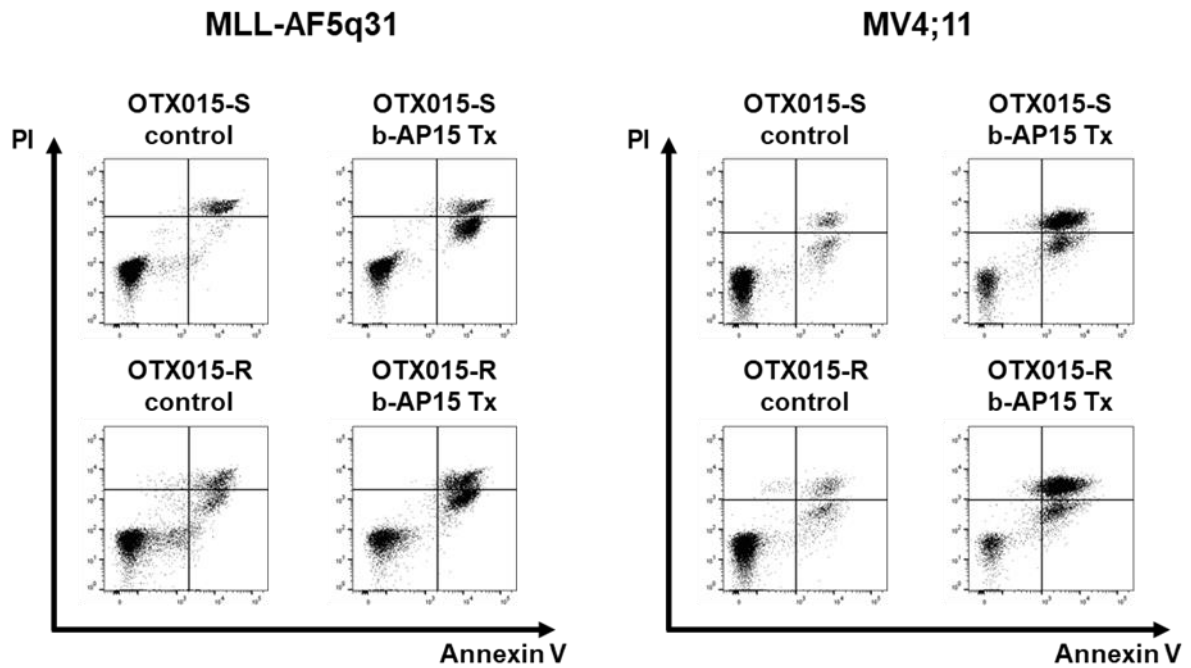
Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)



Supplementary Figure 2. Dotplots showing the effects of OTX015 treatment on MLL-r cell apoptosis.

MLL-r cells were treated with DMSO or OTX015, followed by analysis of apoptosis by Annexin V/PI double staining. Results shown are representative of three independent experiments. Control, DMSO treatment; OTX015 Tx, OTX015 treatment.

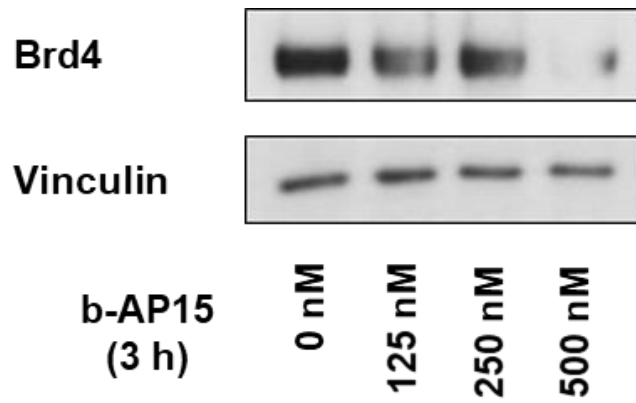
Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)



Supplementary Figure 3. Dotplots showing the effects of b-AP15 treatment on MLL-r cell apoptosis.

MLL-r cells were treated with DMSO or b-AP15, followed by analysis of apoptosis by Annexin V/PI double staining. Results shown are representative of three independent experiments. Control, DMSO treatment; b-AP15 Tx, b-AP15 treatment.

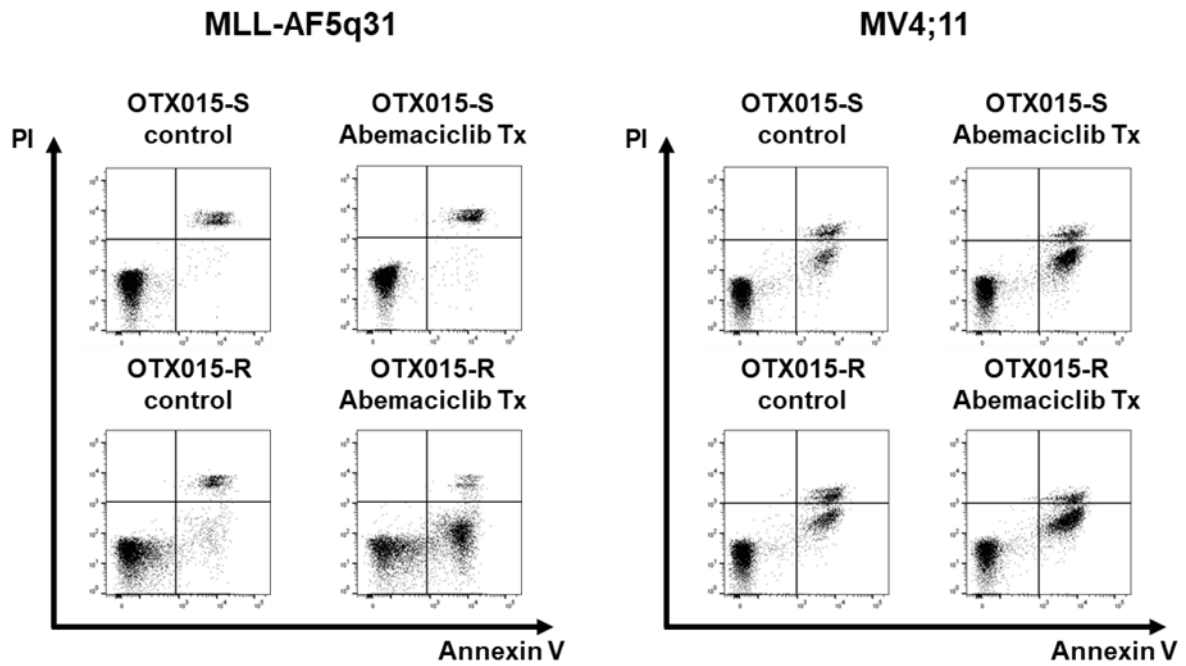
Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)



Supplementary Figure 4. Effect of b-AP15 on BRD4 protein levels in OTX015-R MLL-AF5q31 cells.

OTX015-resistant MLL-AF5q31 cells were treated with b-AP15 at the indicated concentrations for 3 h, and then western blotting was performed. Results shown are representative of two independent experiments.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)



Supplementary Figure 5. Dotplots showing the effects of Abemaciclib treatment on MLL-r cell apoptosis.

MLL-r cells were treated with DMSO or Abemaciclib, followed by analysis of apoptosis by Annexin V/PI double staining. Results shown are representative of three independent experiments. Control, DMSO treatment; Abemaciclib Tx, Abemaciclib treatment.

Amari, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 147-153 (2022)