

氏名 (生年月日) ^{いまよし なつき}
今吉 菜月 (1991年8月22日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬 第219号

学位授与の日付 2022年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 マルチプロモドメイン阻害に基づき BRD4 および CBP/p300 を標的とした MLL 遺伝子再構成陽性の小児急性リンパ芽球性白血病治療に関する基礎検討

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 中田 徹男

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

序章

“がん”は私たちにとって大変身近な疾患となり、これまでに多くの治療薬・治療法が開発され、治療が進められてきた。医療の進歩に伴い、小児がんの約40%を占めるといわれる白血病は、高い生存率を維持するようになった。しかし、MLL (*mixed-lineage leukemia*) 遺伝子に転座を生じた急性リンパ芽球性白血病 (MLL-r ALL) は未だに予後不良であり、より有効性の高い治療薬開発が求められる。

MLL-r ALL の治療標的の1つとして、BET (bromodomain and extra-terminal domain) ファミリータンパク質が挙げられる。BET ファミリータンパク質は、2つのプロモドメインがヒストンのアセチル化されたリジン残基を認識し、遺伝子の転写を制御するタンパク質である。特に BRD4 は、転座に伴って形成される MLL 融合タンパク質複合体の構成分子の1つであるとともに、がん遺伝子である MYC の発現を制御することが知られている。すでに I-BET151 や OTX015 などの BET 阻害剤が臨床試験段階にあり、造血器腫瘍を中心に注目されている。加えて、近年の医薬品開発においては、従来の “one target and one drug” という考え方にとらわれることなく、複数の標的に作用するマルチ阻害剤の開発も進んでいる。このように、マルチに作用点を有することは、より高い有効性を得るための効果的な戦略の1つであると考えられる。

したがって本研究では、プロモドメインを標的とし、BRD4 ならびに同じくエピジェネティック制御に関わるヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 をマルチに阻害する化合物を用い、小児 MLL-r ALL に対する抗腫瘍効果を細胞株およびモデルマウスを用いて検討した。

第1章 *In vitro* 系における抗腫瘍効果の検討

はじめに、プロモドメイン阻害活性評価法である BROMOscan を用い、BET 阻害剤として開発された CN470 が、BRD4 および CBP/p300 のマルチプロモドメイン阻害剤 (それぞれ $K_d = 23, 32, 20$ nM) であることを見出した。一方で、既存の BET 阻害剤である OTX015 は、BRD4 のプロモドメインに対しては阻害活性を有する ($K_d = 2.5$ nM) もの、CBP/p300 のプロモドメインに対しては阻害活性を示さなかった (CBP, p300 ともに $K_d > 10000$ nM)。また、CN470 および OTX015 は、ヒト小児 MLL-r ALL

細胞株 9 株 (SEM, KOCL-45, KOCL-58, KOCL-69, KOPB-26, YAOL-95, KOCL-44, KOCL-50, KOPN-1) および小児 MLL-r ALL 患者細胞 (K103, K107, K110, K114) において濃度依存的に細胞増殖を抑制することが示された。

次に、小児 MLL-r ALL 細胞株の中でも *MLL* 融合遺伝子として頻度の高い *MLL-AF4* から SEM 細胞を、*MLL-ENL* から KOPN-1 細胞の 2 株を用い、より詳細な抗腫瘍効果を検討した。CN470 は、OTX015 同様に細胞周期を G1 期で停止し、アポトーシスを誘導した。また CN470 は、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を抑制した。一方で、アポトーシスを誘導を示す cleaved caspase-3 や cleaved PARP-1 のタンパク質発現は上昇した。加えて、CN470 はアセチル化ヒストン (H3K27ac) と BRD4 との結合を OTX015 よりも強力に阻害した。以上の結果より、CN470 は OTX015 と異なり BRD4 阻害作用を有するだけでなく、同時に CBP/p300 のプロモドメイン阻害作用を有することで OTX015 よりも強力に細胞周期停止やアポトーシスを誘導をもたらすことが示唆された。

第2章 *In vivo* 系における抗腫瘍効果の検討

次に、CN470 が前章で述べた *in vitro* 系での抗腫瘍効果に加えて、*in vivo* 系においても抗腫瘍効果を示すかを検討した。本検討においては、細胞株を用いたマウスモデル (CDX モデル; cell line-derived xenograft モデル) に加え、昨今の医薬品開発において重要視されつつある患者検体を用いたマウスモデル (PDX モデル; patient-derived xenograft モデル) を用いて評価した。

CDX モデルにおいては、SEM 細胞に *Luciferase* 遺伝子と *GFP* 遺伝子をレンチウイルスベクターにて導入した細胞株 (SEM^{Luc/GFP} 細胞) を樹立し、免疫不全マウスである BALB/c Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} (BRJ) マウスを用いて正所性担がんモデルマウスを作製して検討した。SEM^{Luc/GFP} 細胞の着が確認されたのち、CN470 を 10 mg/kg、1 日 1 回、連日経口投与した。その結果、CN470 投与群における生体発光量は有意に減少し、生存期間も有意に延長した。

PDX モデルは、京都大学大学院医学研究科発達小児科学が保有する小児 MLL-r ALL 患者検体を NOD/SCID/γc^{null} (NOG) マウスに移植し、PDX モデルマウスを作製した。本検討においては、移植翌日より CDX モデル同様の用法・用量にて連日経口投与を行った。その結果、CN470 投与群における末梢血中の白血病細胞の割合は有意に減少し、生存期間も有意に延長した。以上の結果より、CN470 は MLL-r ALL において *in vitro* 系のみならず、*in vivo* 系においても抗腫瘍効果を示した。

第3章 造血系に及ぼす影響について

第 1 章および第 2 章で述べた有効性に加え、医薬品として開発されるには安全性も重要な評価ポイントとなる。そこで最後に、CN470 の安全性、特に造血系に及ぼす影響について評価した。CN470 投与中の CDX モデルや PDX モデルでは、顕著な体重減少や既存の BET 阻害剤で問題視される血小板減少は確認されなかった。加えて、CN470 を 10 mg/kg、1 日 1 回、6 週間、健常の BRJ マウスに連日経口投与を行った結果においても、顕著な有害事象は確認されなかった。さらに、健常な NOG マウスに 2 週間、同様の用法・用量で連日経口投与を行い、骨髓細胞を回収して培養した結果、CN470 の投与有無によらず、同等数の造血コロニーが形成された。以上の結果より、CN470 が造血系に及ぼす影響は少ないことが示唆された。

総括

本研究では、CN470 が BRD4 および CBP/p300 に対する新規マルチプロモドメイン阻害剤であることを見出した。また本化合物は、正常な造血系に大きな影響を及ぼすことなく、小児 MLL-r ALL に対

して *in vitro* 系および *in vivo* 系において抗腫瘍効果を示した。予後不良である小児 MLL-r ALL において有効性および安全性を示した本研究の成果は、今後の治療薬創出につながる新たな知見である。

審査の結果の要旨

《緒言》

MLL (*mixed-lineage leukemia*) 遺伝子に転座を生じた小児急性リンパ芽球性白血病 (MLL-r ALL) は予後不良な疾患であり、より有効な治療薬開発が求められる。本論文ではエピジェネティクス制御機構に着目し、治療標的の1つである BET (bromodomain and extra-terminal domain) ファミリータンパク質に焦点を当てた。近年では“polypharmacology”に基づく複数の標的に作用する医薬品開発も進んでいることから、ブロモドメインがヒストンのアセチル化リジンを認識することで転写制御を担う BRD4 に加え、同じくブロモドメインを有するヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 にも注目した。

本論文では、BET 阻害剤として開発された CN470 が BRD4 および CBP/p300 のブロモドメインをマルチに阻害することを見出し、小児 MLL-r ALL 治療におけるマルチブロモドメイン阻害の有効性と造血系への安全性を明らかにした。

《審査結果》

第1章では、*in vitro* 系における抗腫瘍効果を検討した。BET 阻害剤として開発された CN470 が、既存の BET 阻害剤 OTX015 とは異なり、BRD4 に加えて CBP/p300 のブロモドメインを阻害することを BROMOScan 法にて示し、さらに CN470 が小児 MLL-r ALL 細胞株および患者由来細胞の増殖を濃度依存的に抑制することを明らかにした。

次に、CN470 が OTX015 同様に細胞周期の G1 期停止およびアポトーシスを誘導し、BRD4 が発現を制御する分子の mRNA およびタンパク質の発現を抑制することを見出した。加えて、CN470 は H3K27ac と BRD4 との結合を OTX015 より強力に阻害した。以上より、CN470 は BRD4 および CBP/p300 のブロモドメインをマルチに阻害することで、OTX015 よりも強力に細胞周期停止やアポトーシスを誘導することが示唆された。

第2章では、*in vivo* 系での抗腫瘍効果を、小児 MLL-r ALL 細胞株を用いた cell line-derived xenograft (CDX) マウスモデルおよび患者検体を用いた patient-derived xenograft (PDX) マウスモデルを用いて評価した。SEM^{Luc}GFP 細胞株を用いた CDX モデルの検討では、CN470 投与群における生体発光量は有意に減少し、生存期間も有意に延長した。さらに PDX モデルの検討では、CN470 投与群にて末梢血中の白血病細胞の割合は有意に減少し、生存期間も有意に延長した。以上より、*in vivo* 系においても CN470 は小児 MLL-r ALL に対して抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

第3章では、安全性評価の一環として、造血系への影響を検討した。白血病マウスにおいて、CN470 投与による顕著な体重減少や既存の BET 阻害剤で問題視される血小板減少は認めなかった。健常マウスにおいても、CN470 投与による顕著な有害事象は確認されなかった。加えて、CN470 を2週間投与した健常マウスより骨髓細胞を回収して培養した結果、CN470 無処置マウスと同等数の造血コロニーが形成された。以上より、CN470 が造血系に及ぼす影響は少ないことを明らかにした。

《審査の結論》

本論文では、CN470がBRD4およびCBP/p300に対する新規マルチプロモドメイン阻害剤であることを見出し、造血系へ大きく影響することなく、小児MLL-r ALLへの抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。予後不良である小児MLL-r ALLにおいてBRD4およびCBP/p300に対するマルチプロモドメイン阻害の有効性及び安全性を示した本成果は、今後の治療薬創出につながる新たな知見である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。