

マルチブ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

2022 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

今吉 菜月

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 今吉菜月 (Natsuki Imayoshi)
学位論文題目 : マルチブ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

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つのブ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、ブ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、ブ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 のマルチブ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 のブ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 のブ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

ポトシス誘導を示す 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^{LucGFP} 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^{LucGFP} 細胞の生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。

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) Natsuki Imayoshi, Makoto Yoshioka, Kuniaki Tanaka, Shyh-Ming Yang, Koshi Akahane, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Takeshi Inukai, Seiji Okada, David J. Maloney, Tatsutoshi Nakahata, Junko Takita, Itaru Kato, Eishi Ashihara. 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. [第 1-3 章]. Copyright Elsevier

目次

序論.....	1
第1章 <i>In vitro</i> 系における抗腫瘍効果の検討.....	5
第1節 緒言.....	5
第2節 材料と方法.....	6
1. 試薬.....	6
2. 細胞株およびヒト検体.....	6
3. ブロモドメインに対する阻害活性の評価 (BROMOscan).....	7
4. 細胞株における細胞増殖抑制効果の評価 (WST-8 assay).....	7
5. 患者由来細胞における細胞増殖抑制効果の評価 (Cell Titer-Glo® 2.0 assay).....	8
6. 細胞周期解析.....	8
7. アポトーシス解析.....	8
8. mRNA 発現変化解析.....	9
9. タンパク質発現変化解析.....	10
10. BRD4 と相互作用を示すタンパク質解析 (共免疫沈降法).....	11
第3節 結果.....	12
1. BRD4 およびCBP/p300 マルチブロモドメイン阻害剤の発見.....	12
2. 細胞増殖への影響.....	13
3. 細胞周期およびアポトーシスへの影響.....	16
4. BRD4 関連 mRNA およびタンパク質発現変化.....	20
5. BRD4 と相互作用を示すタンパク質解析.....	22
第4節 考察.....	23
第5節 小括.....	26
第2章 <i>In vivo</i> 系における抗腫瘍効果の検討.....	27
第1節 緒言.....	27
第2節 材料と方法.....	28
1. 試薬.....	28
2. 細胞株およびヒト検体.....	28
3. CDX モデルマウス作製と抗腫瘍効果の検討.....	29
4. PDX モデルマウス作製と抗腫瘍効果の検討.....	29
5. 統計解析.....	30

第3節 結果.....	31
1. CDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討.....	31
2. PDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討.....	33
第4節 考察.....	34
第5節 小括.....	36
第3章 造血系に及ぼす影響について.....	37
第1節 緒言.....	37
第2節 材料と方法.....	38
1. 試薬.....	38
2. マウス.....	38
3. CBC 解析.....	38
4. 造血前駆細胞に及ぼす影響 (CFC assay).....	38
第3節 結果.....	40
1. MLL-r ALL モデルマウスにおける造血系への影響.....	40
2. 健常マウスにおける造血系への影響.....	41
3. 造血前駆細胞に及ぼす影響.....	43
第4節 考察.....	45
第5節 小括.....	47
総括.....	48
結語.....	50
謝辞.....	51
参考文献.....	52
Supplementary information.....	59

略語一覧

18S rRNA	18S ribosomal RNA
ALL	acute lymphoblastic leukemia
AMED	Japan Agency for Medical Research and Development
BET	bromodomain and extra-terminal
BiTE	Bispecific T cell engager
BRDT	bromodomain testis-specific protein
BRJ	BALB/c Rag2 ^{-/-} /Jak3 ^{-/-}
CBC	complete blood count
CBP	cyclic AMP response element binding protein-binding protein
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CDX	cell line-derived xenograft
CFC	colony-forming cell
CI	cranial irradiation
CNS	central nervous system
DMSO	dimethyl sulfoxide
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
H3K27ac	acetylated histone H3 lysine27
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	half-maximal inhibition concentration
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
MLL	mixed-lineage leukemia
MLL-r ALL	mixed-lineage leukemia-rearranged acute lymphoblastic leukemia
NCI	National Cancer Institute
NOG	NOD/SCID/ γ c ^{null}
p300	E1A binding protein p300
PB	peripheral blood
PBS (-)	phosphate-buffered saline
PC/SM	penicillin-streptomycin
PDX	patient-derived xenograft
PI	propidium iodide

PLT	platelet
PROTACs	proteolysis-targeting chimeras
PVDF	polyvinylidene difluoride
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RBC	red blood cell
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCT	stem cell transplantation
SE	standard error
SD	standard deviation
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
WBC	white blood cell

序論

がんは私たちにとって大変身近な疾患となり、本邦においては生涯のうち2人に1人が罹患し、3人に1人が死亡する疾患である。¹ がんは小児においても重要な疾患であり、5歳以上の子どもにおける死亡原因の第1位（自殺を除く）を占め、年間2000～2500人が小児がんと診断される。特に白血病は、小児がんの約40%と最も大きな割合を占めており、その多くは急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) である。²

ALLはリンパ系白血病細胞が骨髄内で異常増殖し、その結果、正常な血球が減少することによって貧血や出血傾向、易疲労感や易感染性を引き起こす。昨今の目覚ましい医療の進歩によって、小児ALL患者の80～90%で治療が得られるようになった。小児ALL治療においては、予後因子に基づく層別化治療が重要であり、標準的寛解導入療法にはプレドニゾロンまたはデキサメタゾン、ビンクリスチン、L-アスパラギナーゼの3剤またはアントラサイクリンを加えた4剤が用いられる。³ また、髄液中に白血病細胞を認めることも多く、中枢神経系 (central nervous system; CNS) における再発予防も視野にいれた治療が行われる。CNS 予防治療においては頭蓋照射 (cranial irradiation; CI) が用いられてきたが、二次がん発症や認知機能障害を含む成長・発達における晩期合併症の観点から代替療法^{4,5}が検討され、メトトレキサートの髄注や静注療法が用いられる場合もある。

その一方で、染色体11q23領域に存在する *mixed-lineage leukemia (MLL)* 遺伝子に転座を生じた白血病 (MLL-rearranged ALL; MLL-r ALL) は、未だ予後不良とされる。⁶ 正常な *MLL* 遺伝子からなる *MLL* タンパク質は、転写因子としてヒストンのメチル化に関与し、造血細胞の分化・成熟に関与する *HOXA9* を中心とした遺伝子発現を調節している。しかし、*MLL* 遺伝子は *AF4*、*AF9*、*ENL* 遺伝子を中心に90種類以上のパートナー遺伝子と相互転座を引き起こすことが報告されており⁷、この *MLL* 融合遺伝子からなる *MLL* 融合タンパク質複合体は、恒常的に異常な転写活性化を生じることで白血病化に寄与する (Figure 1)。

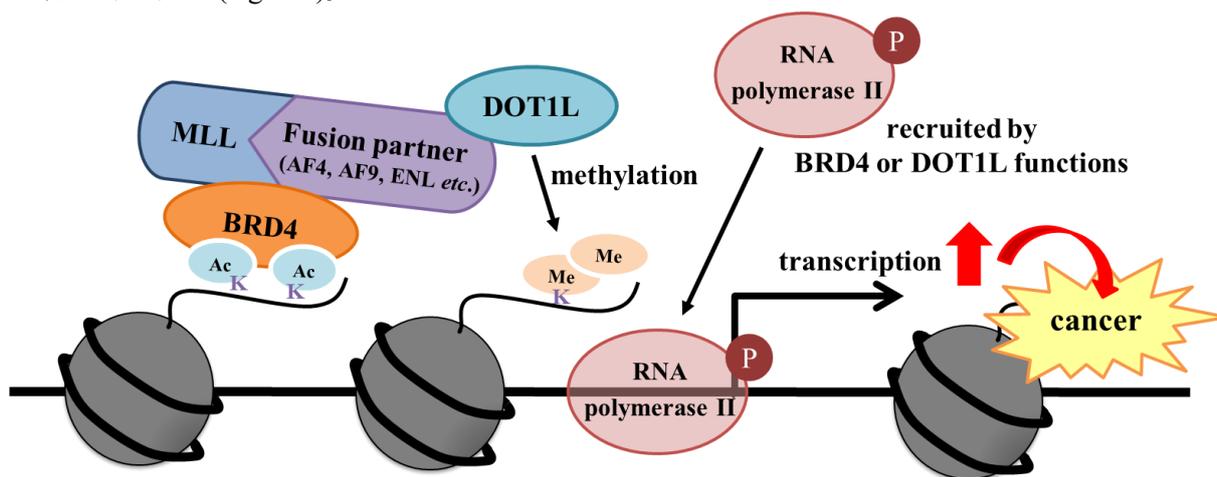


Figure 1. MLL-r 白血病における転写活性化機構

MLL-r 白血病における異常な転写活性化機構の概略図を示す。MLL 融合タンパク質複合体は、DOT1Lによるヒストンのメチル化修飾およびBRD4(後述)によるヒストンのアセチル化修飾の認識により、RNA polymerase IIの動員を介して、遺伝子の転写活性化をきたし、白血病化に寄与する。

現在の MLL-r ALL の治療においてはパートナー遺伝子の種類によらず、シタラビンやシクロホスファミドなどを含む強力な多剤併用化学療法や同種造血細胞移植 (stem cell transplantation; SCT) が推奨される。これは本邦における MLL96/98 研究や JPLSG MLL03 試験など様々な臨床試験が行われた結果に基づいたガイドラインではあるが、いずれの試験においても 5 年無イベント生存率は約 40% 程度と低く⁶⁸、有効性の高い新規治療法・治療薬の開発が求められる。小児においては、療養期間を通じた心の問題や、就労・自立などの社会問題に加え、先述の CI や SCT においては成長障害をはじめとする晩期合併症が問題視されている。⁹ すなわち、現在進められている長期フォローアップガイドライン¹⁰の作成といったサポート体制の整備のみならず、今後の治療法・治療薬の開発においてはより一層高い安全性が求められる。

これまでの創薬開発においては大きく 3 つの改革の波があったと言われ、いずれの波においても“one target and one drug”と呼ばれる単一標的に作用する薬剤を開発する考え方が一般的であった。¹¹ このような創薬研究の流れの中で、小児 MLL-r ALL においてはヒストンメチル化に注目した DOT1L 阻害剤 (EPZ-5676) が開発されたが、臨床試験結果は芳しくないようである。¹² このように単一標的に作用する医薬品では生体内の複雑なネットワークに対応できないことも多く、実臨床では様々な複数の薬剤を併用することで治療を行うことも多い。そこで、polypharmacology と呼ばれる疾患に関連する複数の因子を同時に標的とする考え方が注目された。¹³ すなわち、“multi-target”を念頭においた医薬品開発における新たな 4 つ目の改革の波が始まった。その結果、イマチニブやラパチニブのように複数のチロシンキナーゼに阻害作用を有する、いわゆるマルチキナーゼ阻害薬が開発され、臨床応用されるようになった。ALL 治療においては、2018 年に白血病細胞の表面抗原である CD19 と免疫細胞である T 細胞の表面抗原である CD3 に対する特異性をもつ画期的な医薬品 (Bispecific T cell engager; BiTE) として、ブリナツモマブ¹⁴と呼ばれる抗体製剤が承認された。いずれの医薬品においても、多くの患者に対し大きな福音をもたらした。このように複数の標的に作用する医薬品開発は、想像の域を遥かに超えた治療効果を生み出す可能性を秘めている。

近年、造血器腫瘍に対する治療標的として注目されるものの1つに、エピジェネティクス制御機構が挙げられる。特にヒストンのアセチル化修飾は、細胞周期や転写制御において重要な役割を担っており、ヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase; HAT) である cyclic AMP response element binding protein-binding protein (CBP) や E1A binding protein p300 (p300) に代表される “writer”、ヒストン脱アセチル化酵素である histone deacetylase (HDAC) に代表される “eraser”、ヒストンのアセチル化を認識し、転写制御を担う bromodomain and extra-terminal (BET) ファミリータンパク質に代表される “reader” の3つによって制御される (Figure 2)。この “eraser” 機能を担う HDAC に対する阻害剤は、多発性骨髄腫に対してパノビノスタットが2015年に、成人 T 細胞白血病リンパ腫に対してツシジノスタットが2021年に承認され、臨床で使用されている。一方で、“writer” や “reader” に対する治療薬は未だ承認されていないものの、これらの機能を担うタンパク質の阻害剤の研究・開発が数多く進められている。

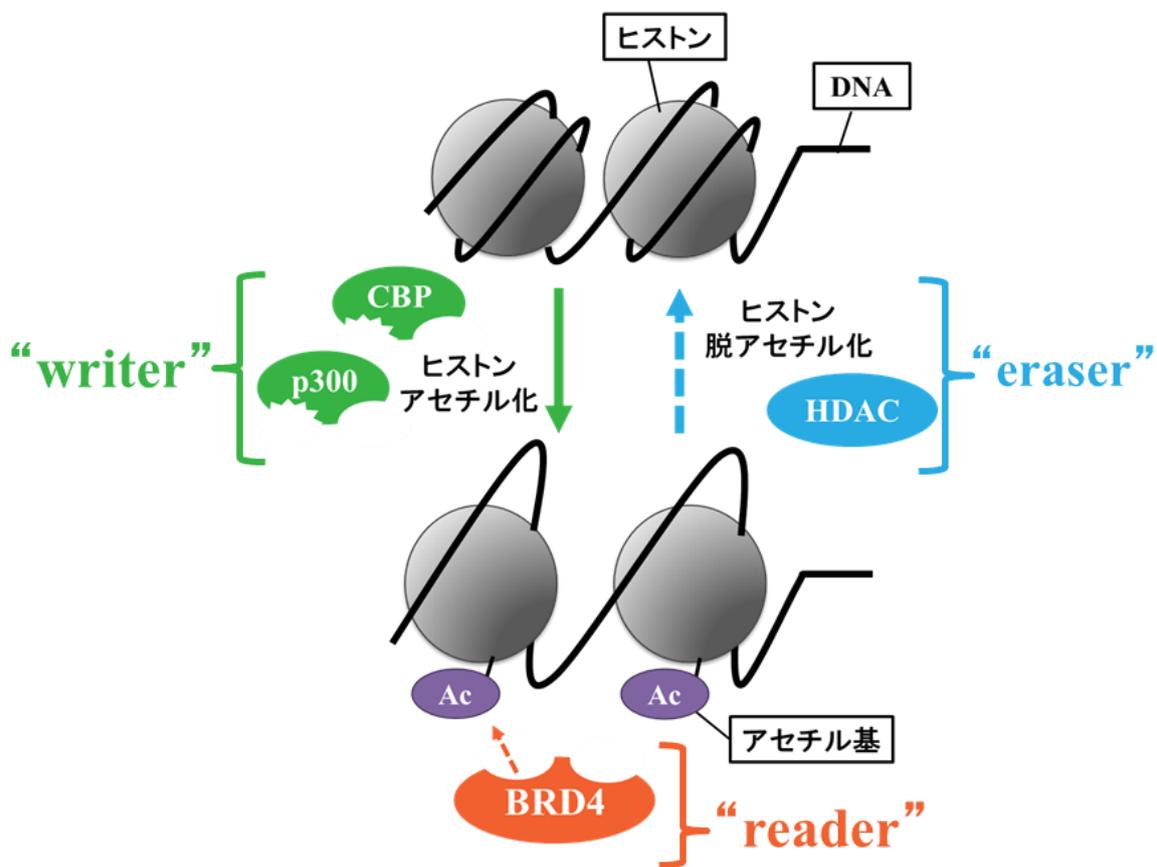


Figure 2. ヒストンアセチル化修飾機構

ヒストンアセチル化修飾機構における関連分子の概略図を示す。ヒストンのアセチル化修飾では、ヒストンアセチル化酵素である “writer” およびヒストン脱アセチル酵素である “eraser”、ヒストンのアセチル化を認識し、転写制御を担う “reader” の3つによって制御される。

中でも“reader”機能を担う BET ファミリータンパク質は、BRD2、BRD3、BRD4 および精巣特異的に発現する bromodomain testis-specific protein (BRDT) の4つからなり、特に BRD4 に対しては注目度が高い。¹⁵⁻¹⁷ これは BRD4 ががん遺伝子である *MYC*をはじめ、細胞周期の進行や抗アポトーシスに関与する *cyclin-dependent kinase (CDK) 6* や *BCL2* などの遺伝子発現を制御していることによる。¹⁸ 小児 MLL-r ALL においても、転座によって生じた MLL 融合タンパク質が転写・翻訳機能を担う際に形成する複合体に関連する1つとして BRD4 も存在することが知られており²⁴、有望な治療標的の1つとして注目されている。このように BRD4 阻害作用に注目した BET 阻害剤は、基礎研究においても多くの化合物が見いだされ、OTX015¹⁹ や I-BET762^{20,21}、ABBV-075²² などの一部の化合物においては固形がんを含めた様々ながん種において臨床試験が進められている。

これらの BET 阻害剤は、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を標的としている。ヒトゲノムには、46 個のタンパク質において 61 個のブロモドメインの情報がコードされており、これらは大きく 8 つにクラス分けされる。²³ ヒストンのアセチル化修飾機構に注目すると、クラス II には2つのブロモドメインを有する BRD4 を含む BET ファミリータンパク質が、クラス III には1つのブロモドメインを有する CBP や p300 が分類される。このようにブロモドメインは、アセチル化リジンを認識する機能的ドメインとして多くのタンパク質に存在し、全体的な配列の相同性こそ低いものの、いずれも4つの α -ヘリックスおよびそれらに挟まれた2つの ZA ループで形成されている。そこで本研究では、ブロモドメイン阻害に注目し、“reader”機能を担う BRD4 のブロモドメインを主な標的として定め、“writer”機能を担う CBP や p300 のブロモドメインを標的として加えることで、より高い有効性および安全性を目指した小児 MLL-r ALL 治療に関する基礎検討を行った (Figure 3)。

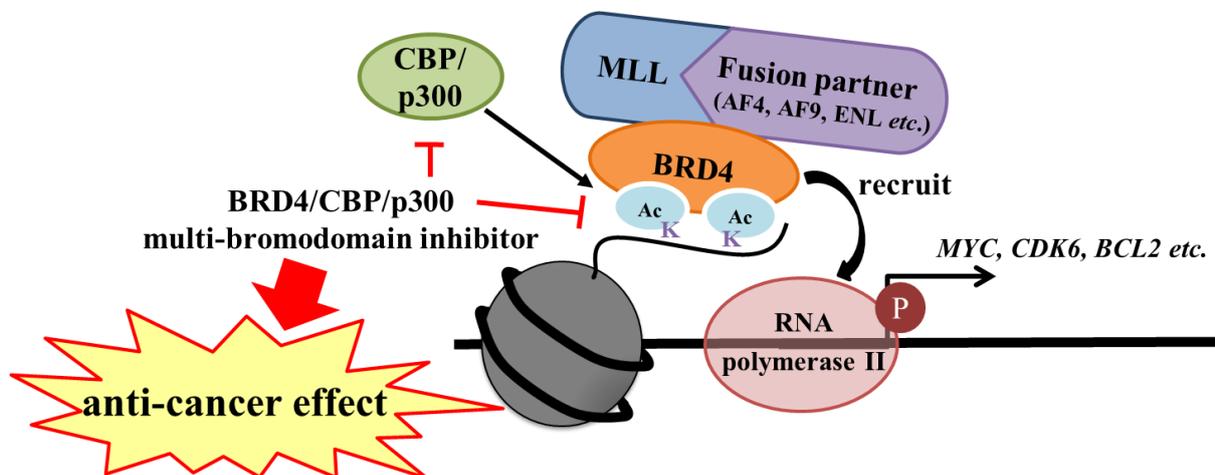


Figure 3. 本研究における概念図

ヒストンアセチル化修飾に注目し、MLL-r ALL において MLL 融合タンパク質が転写・翻訳機能を担う際に影響を及ぼす概略図を示す。BRD4 は *MYC* や *CDK6*、*BCL2* などの遺伝子発現を制御しており、多くの悪性腫瘍において注目されている。本研究では“reader”機能を担う BRD4 に加え、“writer”機能を担う CBP や p300 のブロモドメインを阻害することでより高い抗腫瘍効果を目指す。

第1章 *In vitro* 系における抗腫瘍効果の検討

第1節 緒言

BET 阻害剤は、(+)-JQ-1²⁵ を皮切りに数多くの研究者の手によって開発が進んできた。これらの BET 阻害剤の多くは、いずれも BRD4 のブロモドメインを主な標的としており、アセチル化されたリジン残基を模倣した triazolodiazepine 骨格や quinolinone 骨格、quinazoline 骨格、3,5-dimethylisoxazole 骨格などを有する。^{15,26} すでに triazolodiazepine 骨格を有する (+)-JQ-1 と類似構造をもつ OTX015 や I-BET762、CPI-0610 に加え、3,5-dimethylisoxazole 構造をもつ PLX51107²⁷ などの BET 阻害剤が臨床試験に進み、造血器腫瘍に限らず前立腺がんや乳がんといった固形腫瘍においても新規治療薬の候補として期待が高まっている。また先行研究として、quinolinone 骨格を有する CG13250 が多発性骨髄腫に対し有効性を示すことを明らかにしている。²⁸

近年では創薬研究における“multi-target”を念頭に、BET 阻害剤に複数の作用点を持たせた化合物の研究も盛んに行われるようになった。基礎研究においても、複数の標的に作用させることを考え、compound 13a²⁹ や TW09³⁰ などの BET 阻害剤と HDAC 阻害剤の 2 つの阻害剤をリンカーでつないだ構造をもつ化合物も開発されている。さらには、ユビキチン・プロテアソーム系に注目し、E3 ユビキチンリガーゼに対して結合する構造と BET 阻害剤をリンカーでつなぐことにより BET タンパク質を特異的に分解させる ARV825³¹ や dBET1³² などの BET 分解誘導剤として、proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) の開発も進められている。しかし、これらの化合物は 2 つの化合物をつなぎ合わせるため、非常に大きな分子構造をもつ。その一方で、dinaciclib³³ や alvocidib³⁴ など既存の低分子化合物がブロモドメイン阻害作用を有することが明らかになった研究もあり、いわゆる BET/キナーゼ二重阻害剤の探索や開発も進められている。

本章では、今もなお予後の悪い小児 MLL-r ALL に対し、“multi-target”に基づいた創薬研究を行うことによって更なる抗腫瘍効果をもたらすことを目指し検討した。また、その標的としては、同じくブロモドメインを有するタンパク質、特に BRD4 同様にエピジェネティクス制御に関連する CBP や p300 に注目した。そこで、既存の quinazoline 骨格をもつ BET 阻害剤³⁵ の中から、CBP/p300 のブロモドメインに対しても阻害活性を有する化合物として、低分子のマルチブロモドメイン阻害剤 (CN470) を見出した。加えて、CN470 における小児 MLL-r ALL に対する抗腫瘍効果を小児 MLL-r ALL 細胞株および小児 MLL-r ALL 患者由来細胞を用いて検討した。

第2節 材料と方法

1. 試薬

既存の BET 阻害剤である OTX015 は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より購入した (Figure 4A)。CN470 は、開発者である National Center for Advancing Translational Sciences の David J. Maloney 博士および Shyh-Ming Yang 博士らより分与いただいた (Figure 4B)。本検討においては、各化合物を dimethyl sulfoxide (DMSO) (ナカライテスク、京都、日本) を用いて溶解し、OTX015 は 10 mM で溶解して -80°C で保管し、CN470 は 50 mM で溶解して -20°C に保管して使用した。

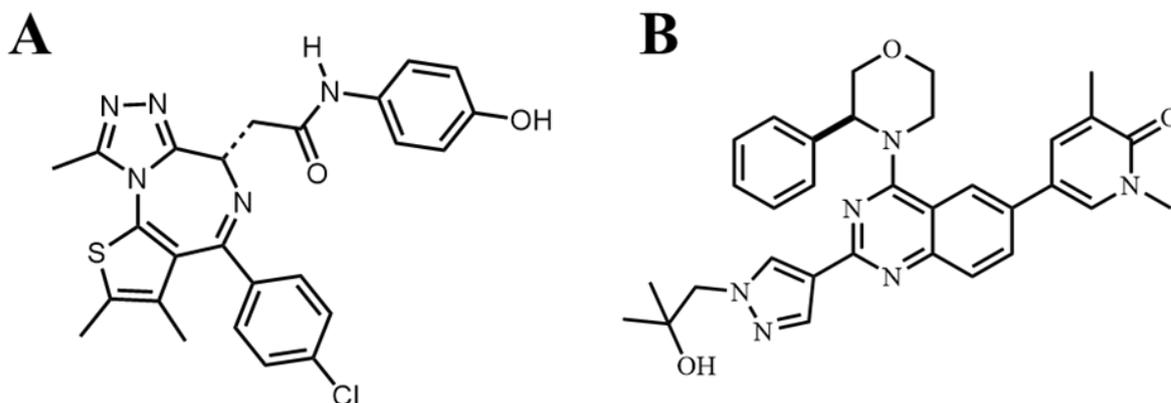


Figure 4. OTX015 (A) および CN470 (B) の構造式

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. S1A) を一部含む

2. 細胞株およびヒト検体

本研究では、MLL-r ALL 細胞株として計 9 株 (*MLL-AF4*; SEM, KOCL-45, KOCL-58, KOCL-69, *MLL-AF9*; KOPB-26, YAQL-95, *MLL-ENL*; KOCL-44, KOCL-50, KOPN-1) を用いた。SEM 細胞は、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) より購入した。その他 8 株 (KOCL-45, KOCL-58, KOCL-69, KOPB-26, YAQL-95, KOCL-44, KOCL-50, KOPN-1) においては、山梨大学医学部附属病院小児科学講座の犬飼岳史教授および赤羽弘資助教より分与いただいた。これらの細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1% penicillin-streptomycin (PC/SM) (終濃度 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン混合溶液、富士フィルム和光純薬、大阪、日本) 含有 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (富士フィルム和光純薬) にて培養した。これらすべての細胞は、 37°C 、20% O_2 、5% CO_2 、75% N_2 における加湿条件下にて培養を行った。

小児 MLL-r ALL 患者由来細胞においては、京都大学医学部附属病院発達小児科学にて保有されている患者検体 (K103, K107, K110, K114) を用いた。なお、患者情報は Table 1 に示す。ヒト検体を用いる検討においては、本学「人を対象とする研究」倫理審査委員会 (#20-19-06) および京都大学医の倫理委員会 (G1030-6) の承認を得て実施している。検体採取においては、患児の代諾者であるご両親にインフォームドコンセントを得て実施した。これらの小児 MLL-r ALL 患者由来細胞は、患児の骨

髄穿刺によって得られた骨髓液あるいは末梢血から Lymphoprep™ (Abbott Diagnostics Technologies AS, Oslo, Norway) を用いた密度勾配遠心分離にて ALL 細胞を分取し、8~12 週齢の NOD/SCID/ γ c^{null} (NOG) マウス (実験動物中央研究所、川崎、日本) に尾静脈から移植することで患者由来の ALL 細胞を増幅した。さらに増幅が必要な場合や、増幅を維持するには、NOG マウスを用いて増幅した MLL-r ALL 患者由来細胞を NOG マウス両下肢 (大腿骨および脛骨) から回収し、再び密度勾配遠心分離にて ALL 細胞を分取した後、再度 NOG マウスに尾静脈移植する serial transplantation を実施した。

Table 1. 小児 MLL-r ALL 患者情報

Code	Year	Sex	MLL fusion
K103	0.5	M	MLL-AF4
K110	10	M	MLL-AF4
K114	14	F	MLL-AF4
K107	2	M	MLL-ENL

3. ブロモドメインに対する阻害活性の評価 (BROMOscan)

BRD4 および CBP/p300 のブロモドメインに対する阻害活性の評価には、BROMOscan (Eurofins DiscoverX, Fremont, CA, USA) を用いた。BROMOscan は、アセチル化ヒストンを模倣した固相のリガンドに対して DNA タグが付加された BRD4 や CBP および p300 のブロモドメインと試験化合物を反応させる。このリガンドと結合したブロモドメインの DNA タグを quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法にて検出することにより、ブロモドメインに対する阻害活性の評価を行う手法である。³⁶

4. 細胞株における細胞増殖抑制効果の評価 (WST-8 assay)

小児 MLL-r ALL 細胞株に対する細胞増殖抑制効果については、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES、熊本、日本) を用いた WST-8 assay により評価した。小児 MLL-r ALL 細胞株計 8 株 (KOCL-45, KOCL-58, KOCL-69, KOPB-26, YAOL-95, KOCL-44, KOCL-50, KOPN-1) を $0.3 \sim 4.0 \times 10^4$ cells/90 μ L/well ずつ 96 well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に播種した後、各化合物 (OTX015, CN470) の段階希釈溶液を 10 μ L/well ずつ処置し、72 時間暴露させた。Cell Counting Kit-8 は測定を行う 3 時間前に 10 μ L/well ずつ処置し、マイクロプレートリーダーである GloMax® (Promega, Madison, WI, USA) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。なお、各処置濃度において 4 well 分の平均値を n=1 として評価した。また、50%の阻害濃度 (half-maximal inhibition concentration; IC₅₀) の値は、CalcuSyn (BIOSOFT, Cambridge, UK) を使用して算出した。

5. 患者由来細胞における細胞増殖抑制効果の評価 (Cell Titer-Glo® 2.0 assay)

小児 MLL-r ALL 患者由来細胞に対する細胞増殖抑制効果については、CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, Madison, WI, USA) を用いて評価した。小児 MLL-r ALL 患者由来細胞 (K103, K107, K110, K114) は、NOG マウス (実験動物中央研究所) に対し serial transplantation を 2~3 回繰り返すことで増幅して本検討に用いた。これらの患者由来細胞の分取においては、NOG マウス両下肢 (大腿骨および脛骨) から得られた骨髓液を Lymphoprep™ (Abbott Diagnostics Technologies AS) を用いて密度勾配遠心分離し、human CD19 MACS beads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) と反応 (4°C、30 分) させ、CD19 陽性 ALL 細胞を autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) を用いて分取した。なお、いずれの細胞も純度 99%以上であることを確認している。得られた患者由来細胞を 20% FBS、1% PC/SM を含有する RPMI1640 培地を用いて、 1.0×10^4 cells/90 μ L/well ずつ白色 96 well plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した後、各化合物 (OTX015, CN470) の段階希釈溶液を 10 μ L/well ずつ処置し、72 時間暴露させた。CellTiter-Glo® 2.0 (Promega) を 100 μ L/well ずつ添加後、プレート を 2 分間穏やかに振とうし、細胞を溶解した。室温・遮光下で 10 分間インキュベートし、発光シグナルを安定化させた後、マイクロプレートリーダーである GloMax® (Promega) を用いて発光を測定した。なお、各処置濃度において 4 well 分の平均値を評価した。また、IC₅₀ 値は、CalcuSyn (BIOSOFT) を使用して算出した。

6. 細胞周期解析

細胞周期への影響においては、ヨウ化プロピジウム (propidium iodide; PI, 富士フィルム和光純薬) を用いて染色を行い、フローサイトメトリー法にて評価した。MLL-r ALL 細胞株 (SEM, KOPN-1) を 0.5×10^4 cells/mL (SEM 細胞) および 0.3×10^4 cells/mL (KOPN-1 細胞) の細胞密度で播種し、3 時間培養した後、各化合物 (OTX015, CN470) を WST-8 assay で得られた IC₅₀ 値の 0.75 倍および 1.5 倍で処置した。48, 72 時間後に細胞を回収し、phosphate-buffered saline (PBS) (-) にて洗浄後、-20°C に冷却した 70%エタノール 2 mL を用いて 1.0×10^6 cells/sample で固定し、-20°C 冷凍庫で 12 時間以上保存した。フローサイトメトリー法を用いた評価日においては、70%エタノールを除去後、終濃度 20 μ g/mL PI および 100 μ g/mL RNase (Sigma Aldrich) を含む PBS (-) にて染色 (4°C、30 分) し、BD FACSDiva™ software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) を搭載した BD LSRFortessa™ (BD Bioscience) を使用して分析した。得られた結果は、FlowJo version 10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

7. アポトーシス解析

化合物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) を用いてフローサイトメトリー法にて評価した。細胞周期解析と同様に、MLL-r ALL 細胞株 (SEM, KOPN-1) を播種し、各化合物 (OTX015, CN470) を処置した。72 時間後に細胞を回収し、PBS (-) にて洗浄後、本キットのプロトコルに従って染色し、BD FACSDiva™ software (BD Bioscience) を搭載した BD LSRFortessa™ (BD Bioscience) を使用して分析した。得られた結果は、FlowJo version 10 software (FlowJo LLC) を用いて解析した。

8. mRNA 発現変化解析

化合物により誘導される mRNA の発現変化解析においては、quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) 法にて解析を行った。細胞周期解析およびアポトーシス解析と同様に、MLL-rALL 細胞株 (SEM, KOPN-1) を播種し、各化合物 (OTX015, CN470) を処置した。24 時間後に細胞を回収し、氷冷した PBS (-) で洗浄後、Nucleo Spin RNA Kit (タカラバイオ、草津、日本) を用いて total RNA を抽出した。NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) にて RNA を測定し、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (東洋紡、大阪、日本) を使用して逆転写し complementary DNA (cDNA) を合成した。これらの cDNA を、各プライマー (Thermo Fisher Scientific) および TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific)、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (東洋紡) を含む 20 μ L/well の反応系にて Thermal Cycler Dice system (タカラバイオ) を用いて qRT-PCR を行った。mRNA 発現量は *18S ribosomal RNA (18S rRNA)* を内標準として、 $\Delta\Delta$ Ct 法により相対的に定量した。本検討に用いたプライマーおよび probe は、Table 2 および Table 3 に示した。

Table 2. プライマー情報

Target	Forward sequences (5' to 3')	Reverse sequences (5' to 3')
<i>MYC</i>	GAGCCCCTGGTGCTCCAT	GCAGAAGGTGATCCAGACTCTGA
<i>CDK6</i>	CACTACTCGGTGTGAATGAAGAAAG	TTGAACATGTCGATCAAGACTTG
<i>BCL2</i>	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA	CCTGTGGATGACTGAGTACCTGAA
<i>18S rRNA</i>	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	TCCAAGATCCAACACTACGAGCTT

Table 3. probe 情報

Target	Probe sequences (5' to 3')
<i>MYC</i>	CACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAA
<i>CDK6</i>	CATATCCTTTATGGTTTCAGTGGGCACTCC
<i>BCL2</i>	CACAAAGGCATCCCAGCCTCCG
<i>18S rRNA</i>	CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA

9. タンパク質発現変化解析

化合物処置によるタンパク質発現変化への解析においては、ウエスタンブロッティング法にて解析を行った。mRNA 発現変化の解析と同様に、MLL-r ALL 細胞株 (SEM, KOPN-1) を播種し、各化合物 (OTX015, CN470) を処置した。72 時間後に細胞を回収し、氷冷した PBS (-) で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma Aldrich) および 40 mM sodium fluoride (富士フィルム和光純薬)、2 mM sodium orthovanadate (Sigma Aldrich) を含む lysed in radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (富士フィルム和光純薬) を用いて溶解 (4°C, 20 分) した。溶解後、20 分間遠心 (4°C, 13,000 × g) し、上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは、Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) および Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量し、3-メルカプト-1, 2-プロパンジオール含有試料用緩衝液 (富士フィルム和光純薬) と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。

電気泳動には 20 µg の調製したサンプルを用い、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) に転写した。PVDF 膜への非特異的結合を防止するため、ブロッキング剤には 5% スキムミルク (雪印メグミルク、東京、日本) または 5% ウシ血清アルブミン (BSA; 富士フィルム和光純薬) を使用し、室温にて 1 時間反応させた。1 次抗体は 4°C で一晩反応させ、2 次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識された抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて 30 分~1 時間、室温にて反応させた。これらのブロッキング剤および各種抗体は、Tween-20 含有 tris-buffered saline を用いて溶解または希釈した。タンパク質の検出は、ECL Western Blotting Detection Kits (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) または ECL Prime Western Blotting Detection Kits (GE Healthcare) を用いて X 線フィルム (ケアストリームヘルス株式会社、東京、日本) に焼き付けた。なお、本検討に用いた 1 次抗体は Table 4 に示した。

Table 4. ウエスタンブロッティング法に用いた 1 次抗体

Antibody	Source	Identifier
anti-c-Myc	Cell Signaling Technology	#5605
anti-CDK6	Cell Signaling Technology	#13331
anti-BCL2	Santa Cruz Biotechnology	sc-7382
anti-caspase-3	Cell Signaling Technology	#9662
anti-cleaved caspase-3	Cell Signaling Technology	#9661
anti-PARP-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-8007
anti-cleaved PARP-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-56196
anti-β-actin	Sigma-Aldrich	A5441

10. BRD4 と相互作用を示すタンパク質解析 (共免疫沈降法)

化合物処置により BRD4 と相互作用を示すタンパク質変化については、共免疫沈降法にて解析を行った。mRNA 発現変化の解析と同様に、MLL-r ALL 細胞株 (SEM, KOPN-1) を播種し、各化合物 (OTX015, CN470) を処置した。48 時間後に細胞を回収し、氷冷した PBS(-) で洗浄後、IP Lysis/Wash buffer (25 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 5% glycerol) にて溶解した。得られたタンパク質は、タンパク質発現解析時と同様に定量を行い、200 μ g/200 μ L となるようにサンプルを調製した。調製したサンプルに抗 BRD4 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) または anti-rabbit IgG isotype control (Abcam, Cambridge, UK) を 5 μ g/sample となるよう添加し、4°C で一晩反応させた後、50 μ L/sample の Dynabeads protein G (Thermo Fisher Scientific) と反応 (4°C, 2 時間) させる。反応後の Dynabeads は、IP Lysis/Wash buffer で 3 回洗浄後、150 mM NaCl 溶液にて 1 回洗浄し、IP Lysis/Wash buffer および 2-メルカプトエタノール含有試料用緩衝液 (富士フィルム和光純薬) を加えて 100 μ L/sample とし、10 分間煮沸することでサンプルを調製した。電気泳動には 20 μ L のサンプルを使用し、タンパク質発現変化の解析と同様にウエスタンブロットティング法にて解析を行った。

第3節 結果

1. BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害剤の発見

BRD4(BD1-BD2) および CBP/p300 のプロモドメインに阻害作用を有するマルチプロモドメイン阻害剤を見出すために、BROMOscan を利用した。本検討では、共同研究者である David J. Maloney 博士および Shyh-Ming Yang 博士らが開発してきた quinazoline 骨格を有する BET 阻害剤を、比較対照には既存の BET 阻害剤である OTX015 を用いた。

BROMOscan の結果、CN470 を新規マルチプロモドメイン阻害剤として見出すことに成功した。CN470 は BRD4、CBP、p300 のプロモドメインに対し阻害活性を有したが、OTX015 は BRD4 のプロモドメインに対しては阻害活性を有するものの、CBP/p300 のプロモドメインに対しては阻害作用を示さなかった (Table 5)。

Table 5. BROMOscan における K_d 値

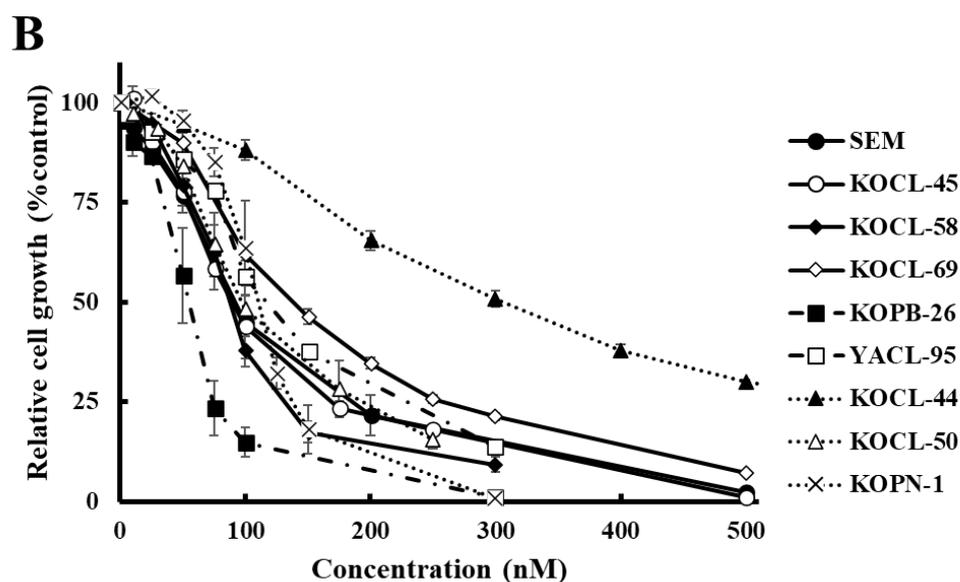
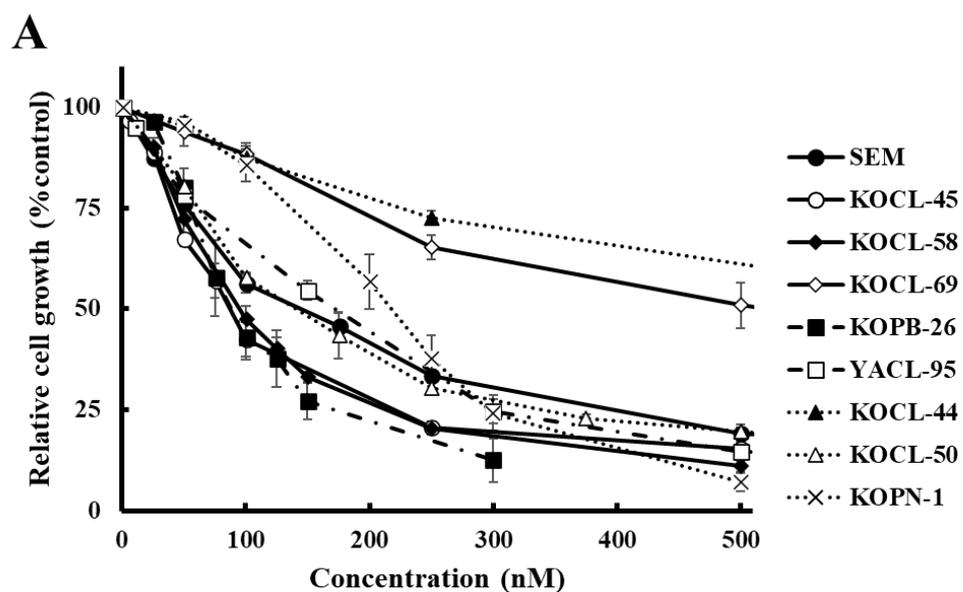
Compound	BROMOscan K _d (nM)		
	BRD4 (BD1-BD2)	CBP	p300
OTX015	2.5	> 10000	> 10000
CN470	23.0	32.0	20.0

Imayoshi, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 1A)

2. 細胞増殖への影響

初めに、CN470 における MLL-r ALL 細胞株および小児 MLL-r ALL 患者細胞における処置後 72 時間における細胞増殖への影響を、WST-8 assay および Cell Titer-Glo® 2.0 assay を用いて検討した。CN470 は、小児 MLL-r ALL 細胞株 (KOCL-45, KOCL-58, KOCL-69, KOPB-26, YAACL-95, KOCL-44, KOCL-50, KOPN-1) に対して、OTX015 と同様に濃度依存的に細胞増殖を抑制した (Figure 5A-D)。加えて、小児 MLL-r ALL 患者由来細胞 (K103, K107, K110, K114) においても、小児 MLL-r ALL 細胞株と同様に OTX015 および CN470 は細胞増殖を抑制した。また、CalcuSyn にて算出した IC₅₀ 値は、いずれの細胞株および患者由来細胞においても CN470 が OTX015 よりも低濃度であった (Table 6)。

なお、今後の検討では MLL 融合遺伝子の代表例として、MLL-AF4 から SEM 細胞を、MLL-ENL から KOPN-1 細胞を用いた。薬物処置濃度は、本検討で得られた IC₅₀ 値の 0.75 倍と 1.5 倍の 2 つの濃度を用いた。



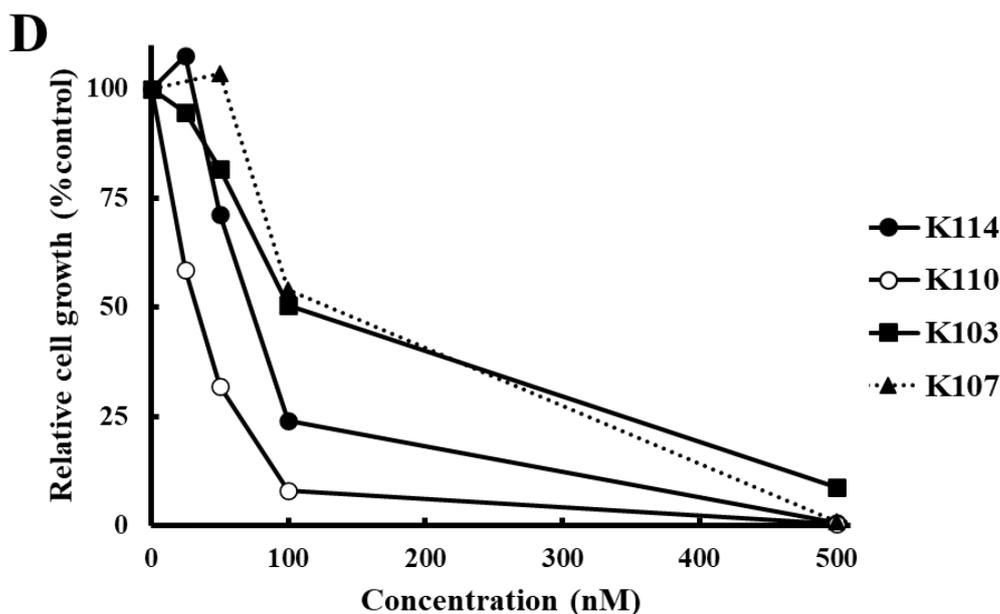
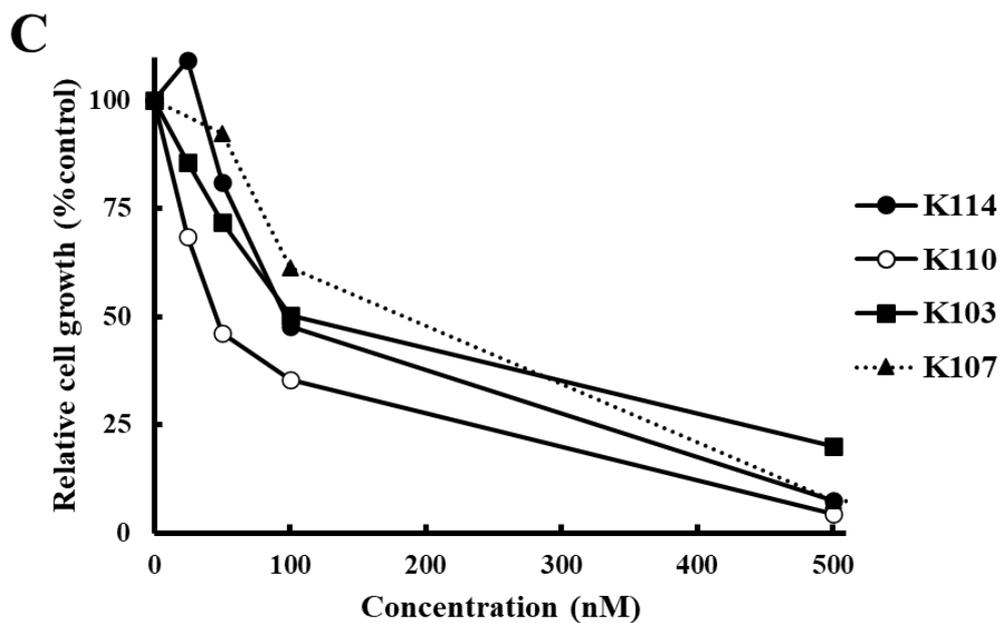


Figure 5. 小児 MLL-r ALL 細胞株および患者由来細胞における細胞増殖抑制効果の検討

WST-8 assay を用いた小児 MLL-r ALL 細胞株における (A) OTX015 および (B) CN470 の細胞増殖に及ぼす影響と、Cell Titer-Glo® 2.0 assay を用いた小児 MLL-r ALL 患者由来細胞における (C) OTX015 および (D) CN470 の細胞増殖に及ぼす影響を評価した結果を示す。細胞株を用いた検討結果は、3 回の検討の平均値 ± 標準誤差 (standard error; SE) にて示した。一方で、患者由来細胞を用いた検討結果は、代表的な 1 回分の結果を示した。

Imayoshi, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 1B, C, and Fig. S1B, C)

Table 6. 小児 MLL-r ALL 細胞株および患者由来細胞における IC₅₀ 値

Cell line	IC ₅₀ values (nM)	
	OTX015	CN470
SEM	141.1	71.2
KOCL-45	96.9	86.1
KOCL-58	100.5	88.6
KOCL-69	522.0	133.7
KOPB-26	99.3	38.6
YACL-95	143.3	124.1
KOCL-44	1078.0	300.1
KOCL-50	142.5	105.3
KOPN-1	194.4	106.1
K114	108.4	68.2
K110	46.6	29.2
K103	124.7	119.9
K107	122.7	102.3

3. 細胞周期およびアポトーシスへの影響

各化合物 (OTX015, CN470) による細胞周期への影響に関しては、フローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、処置後 48, 72 時間における SEM 細胞および KOPN-1 細胞ともに、濃度依存的に G1 期分画の増加および subG1 期分画の増加傾向を示した (Figure 6A, B and S1A, B)。特に KOPN-1 細胞では、高濃度処置群において subG1 期分画の顕著な増加が確認された。各分画 (subG1, G1, S, G2/M) の割合 (%) は Table 7 および Table 8 に示す。

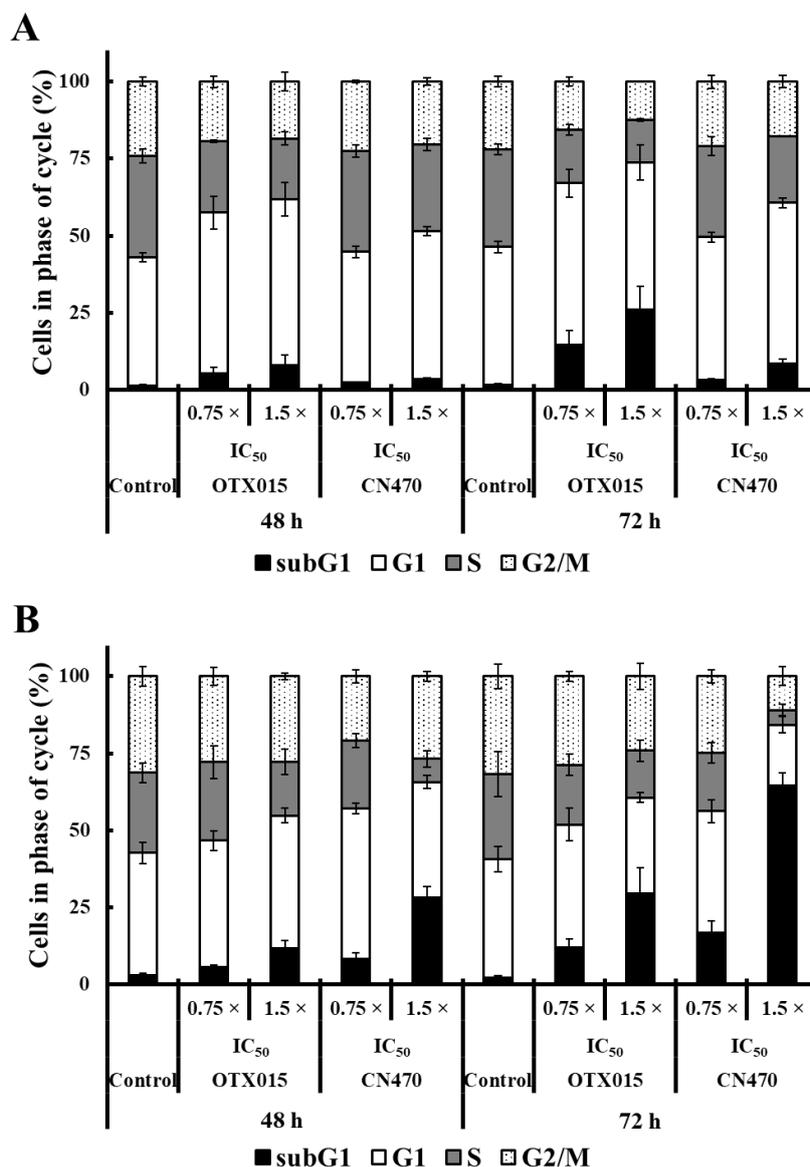


Figure 6. 細胞周期への影響

SEM 細胞 (A) および KOPN-1 細胞 (B) における細胞周期への影響をフローサイトメトリー法にて解析した結果を示す。各分画 (subG1, G1, S, G2/M) における割合 (%) は、3 回の検討の平均値 ± 標準偏差 (standard deviation; SD) にて示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 1D) 一部改変

Table 7. SEM 細胞における各細胞周期の分画 (%)

Time	Treatments	subG1	G1	S	G2/M	
48 h	Control	1.5 ± 0.3	41.6 ± 1.4	32.8 ± 1.4	24.1 ± 1.5	
	OTX015	0.75 × IC ₅₀	5.4 ± 2.0	52.1 ± 5.3	23.2 ± 2.2	19.3 ± 1.9
		1.5 × IC ₅₀	7.9 ± 3.5	54.0 ± 5.5	19.7 ± 0.4	18.4 ± 3.0
	CN470	0.75 × IC ₅₀	2.3 ± 0.2	42.5 ± 1.9	32.7 ± 2.2	22.5 ± 0.4
		1.5 × IC ₅₀	3.4 ± 0.5	48.1 ± 1.6	28.1 ± 2.0	20.5 ± 1.1
72 h	Control	1.6 ± 0.4	44.7 ± 1.9	31.6 ± 2.0	22.0 ± 1.8	
	OTX015	0.75 × IC ₅₀	14.7 ± 4.5	52.3 ± 4.6	17.3 ± 1.8	15.7 ± 1.4
		1.5 × IC ₅₀	26.0 ± 7.7	47.9 ± 5.7	13.8 ± 1.8	12.3 ± 0.2
	CN470	0.75 × IC ₅₀	3.2 ± 0.4	46.4 ± 1.6	29.5 ± 0.4	20.9 ± 2.1
		1.5 × IC ₅₀	8.5 ± 1.4	52.1 ± 1.7	21.6 ± 3.0	17.7 ± 2.1

各分画における割合 (%) は、3回の検討の平均値 ±SD を示す。

Table 8. KOPN-1 細胞における各細胞周期の分画 (%)

Time	Treatments	subG1	G1	S	G2/M	
48 h	Control	2.9 ± 0.7	39.8 ± 3.3	26.1 ± 3.2	31.2 ± 3.2	
	OTX015	0.75 × IC ₅₀	5.6 ± 0.8	41.0 ± 3.2	25.5 ± 5.2	27.8 ± 2.9
		1.5 × IC ₅₀	11.7 ± 2.5	43.1 ± 2.4	17.5 ± 4.1	27.6 ± 1.1
	CN470	0.75 × IC ₅₀	8.4 ± 1.8	48.8 ± 1.7	22.0 ± 2.2	20.8 ± 2.2
		1.5 × IC ₅₀	28.2 ± 3.6	37.4 ± 2.1	7.5 ± 2.7	26.8 ± 1.5
72 h	Control	2.3 ± 0.5	38.4 ± 4.0	27.6 ± 7.2	31.8 ± 4.1	
	OTX015	0.75 × IC ₅₀	11.9 ± 2.8	40.0 ± 5.3	19.3 ± 3.5	28.8 ± 1.5
		1.5 × IC ₅₀	29.4 ± 8.5	31.3 ± 1.6	15.2 ± 3.5	24.1 ± 4.2
	CN470	0.75 × IC ₅₀	16.8 ± 3.8	39.4 ± 3.8	19.0 ± 3.4	24.8 ± 2.2
		1.5 × IC ₅₀	64.5 ± 4.2	19.7 ± 2.6	4.8 ± 1.9	10.9 ± 3.1

各分画における割合 (%) は、3回の検討の平均値 ±SD を示す。

また、細胞周期解析の結果より、DNA 断片化に伴う subG1 期の増加が確認され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。そこで、処置後 72 時間におけるアポトーシス誘導の有無を Annexin-V/PI 染色によるフローサイトメトリー法およびウエスタンブロッティング法を用いて検討した。フローサイトメトリー法の結果より SEM 細胞、KOPN-1 細胞ともに、早期アポトーシス分画 (Annexin-V+/PI-) および後期アポトーシス分画 (Annexin-V+/PI+) が濃度依存的に増加したが、KOPN-1 細胞においては早期アポトーシス分画が後期アポトーシス分画よりも顕著に増加する傾向が見られた (Figure 7A, B and S2A, B)。

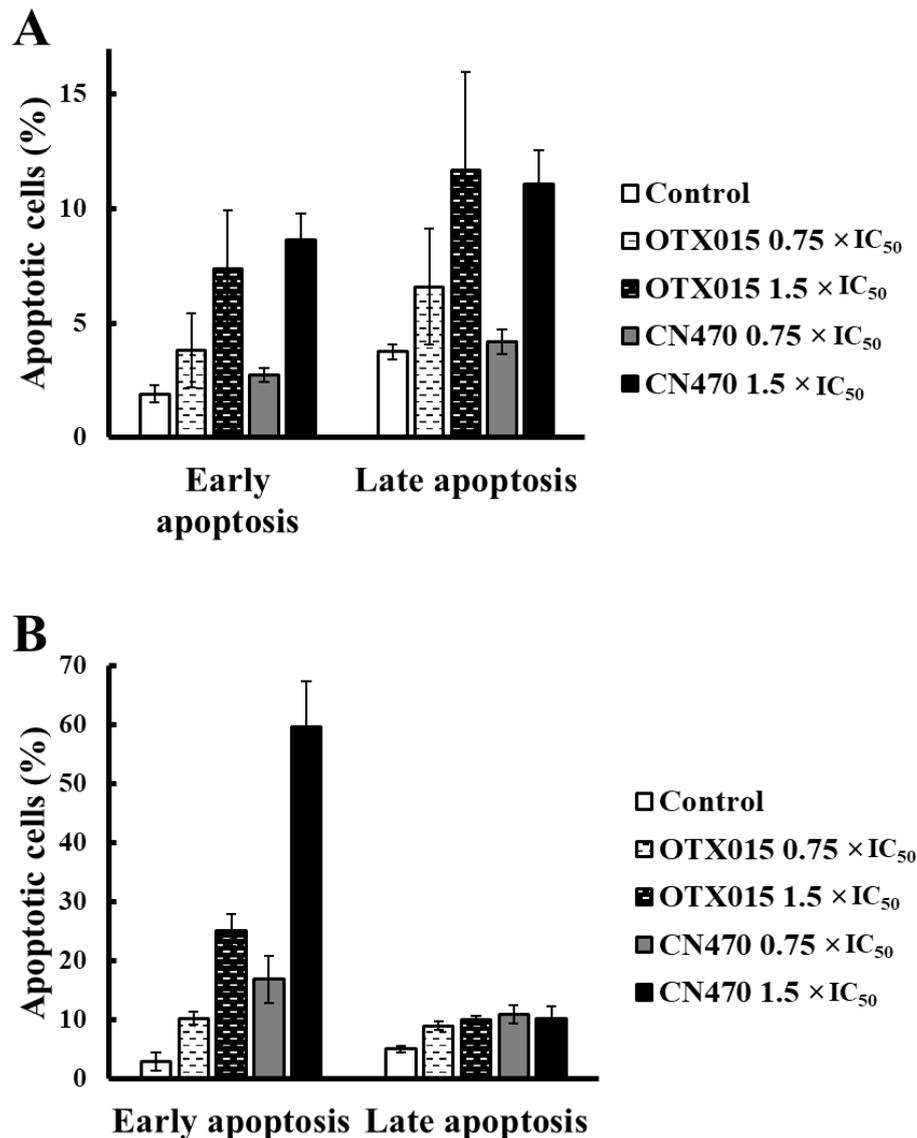


Figure 7. アポトーシスへの影響

SEM 細胞 (A) および KOPN-1 細胞 (B) におけるアポトーシスへの影響をフローサイトメトリー法にて解析した結果を示す。各分画における結果は、3 回の検討の平均値 ±SD にて示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 1E) 一部改変

さらに、アポトーシス関連タンパク質の発現変化を、ウェスタンブロッティング法にて解析を行った。その結果、SEM 細胞、KOPN-1 細胞ともに、処置後 72 時間において caspase-3 や PARP-1 の活性化に伴う cleaved caspase-3 や cleaved PARP-1 の発現の増加が濃度依存的に確認され、これらの活性化に伴うアポトーシスが誘導されていることが示された (Figure 8)。

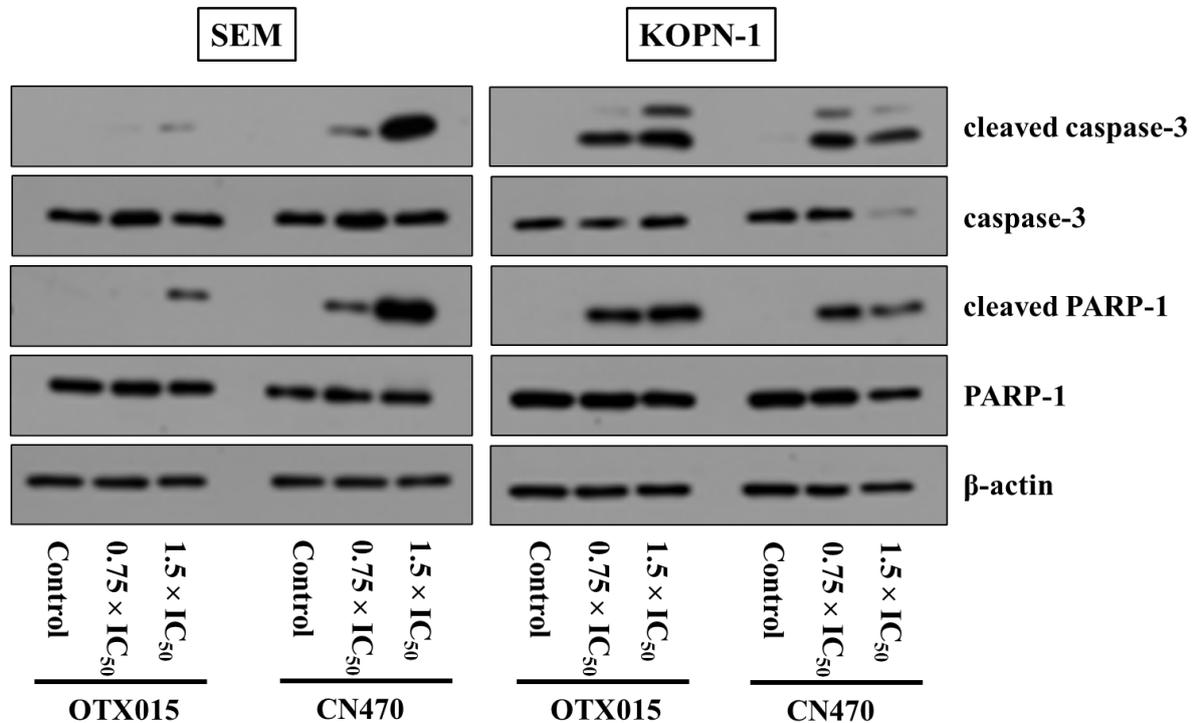


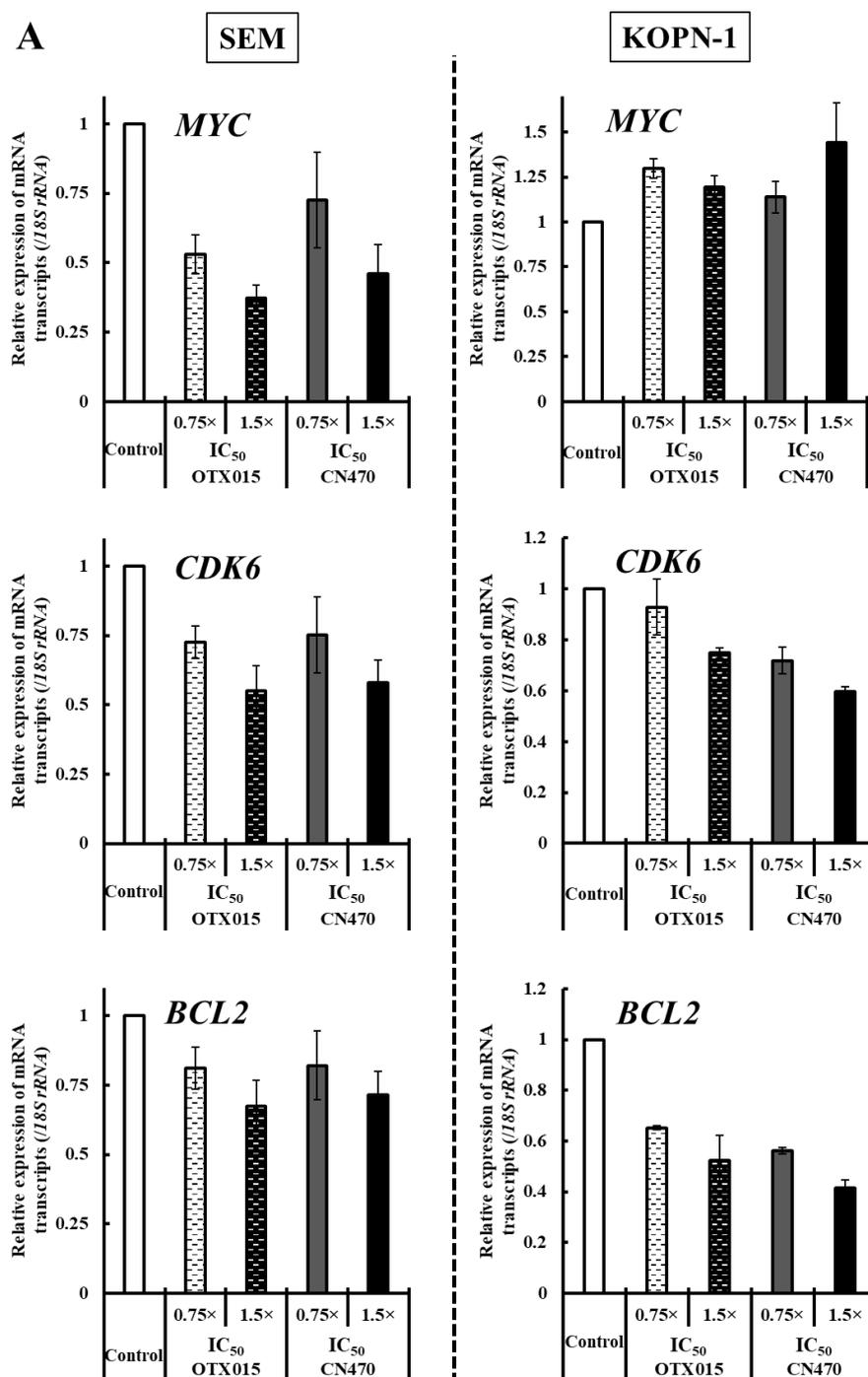
Figure 8. アポトーシス関連タンパク質の発現変化

SEM 細胞および KOPN-1 細胞におけるアポトーシス関連タンパク質の発現変化をウェスタンブロッティング法にて解析した結果を示す。これらの結果は、2 回の検討の代表的な結果を示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 2B) 一部改変

4. BRD4 関連 mRNA およびタンパク質発現変化

各化合物 (OTX015, CN470) 処置による、BRD4 が制御する mRNA やタンパク質の発現変化を qRT-PCR 法やウエスタンブロッティング法にて解析した。BRD4 は *MYC* や *CDK6*、*BCL2* などの mRNA 発現を制御していることが知られており、処置後 24 時間の mRNA 発現量および 72 時間のタンパク質発現量は、SEM 細胞および KOPN-1 細胞とも概ね減少傾向を示した。しかし、KOPN-1 細胞における *MYC* の mRNA 発現量の変化は確認されなかったが、*MYC* タンパク質の発現量は低下した (Figure 9A and B)。



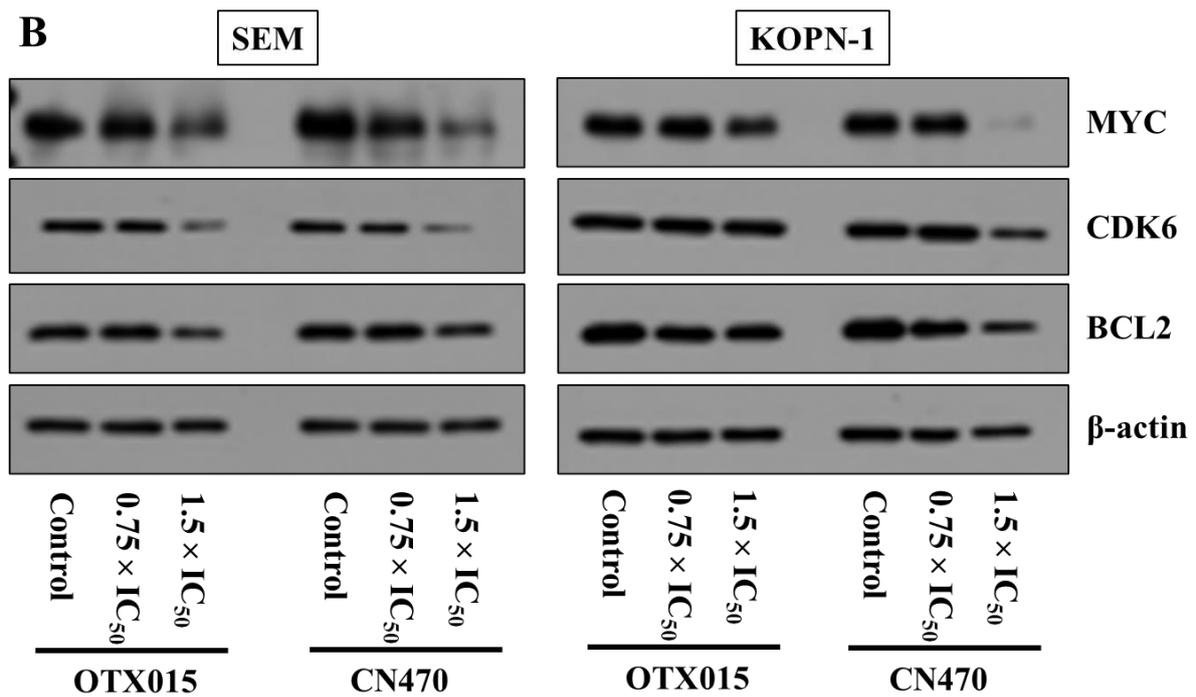


Figure 9. BRD4 関連 mRNA およびタンパク質発現変化

SEM 細胞と KOPN-1 細胞における各化合物処置に伴う (A) qRT-PCR 法にて解析した mRNA 発現変化および、(B) ウェスタンブロッティング法にて解析したタンパク質の発現変化を示す。これらの結果は、mRNA においては3回の検討の平均値 ±SE の値を、タンパク質においては2回の検討の代表的な結果を示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 2A and B) 一部改変

5. BRD4 と相互作用を示すタンパク質解析

さらに、BRD4 と相互作用を示すタンパク質については、共免疫沈降法にて解析を行った。BRD4 はヒストン3の27番目にあるリジン残基のアセチル化修飾 (H3K27ac) を認識し、RNA polymerase II の動員を誘導することでその下流に存在する遺伝子の発現を制御する。抗 BRD4 抗体を用いて免疫沈降を行った結果、処置後48時間における SEM 細胞および KOPN-1 細胞ともに、CN470 処置群では H3K27ac や RNA polymerase II のタンパク質はほとんど確認されなかった (Figure 10)。一方、OTX015 処置群では、H3K27ac や RNA polymerase II のタンパク質はわずかに減少傾向がみられるものの、CN470 処置群ほどの顕著な変化は認められなかった。

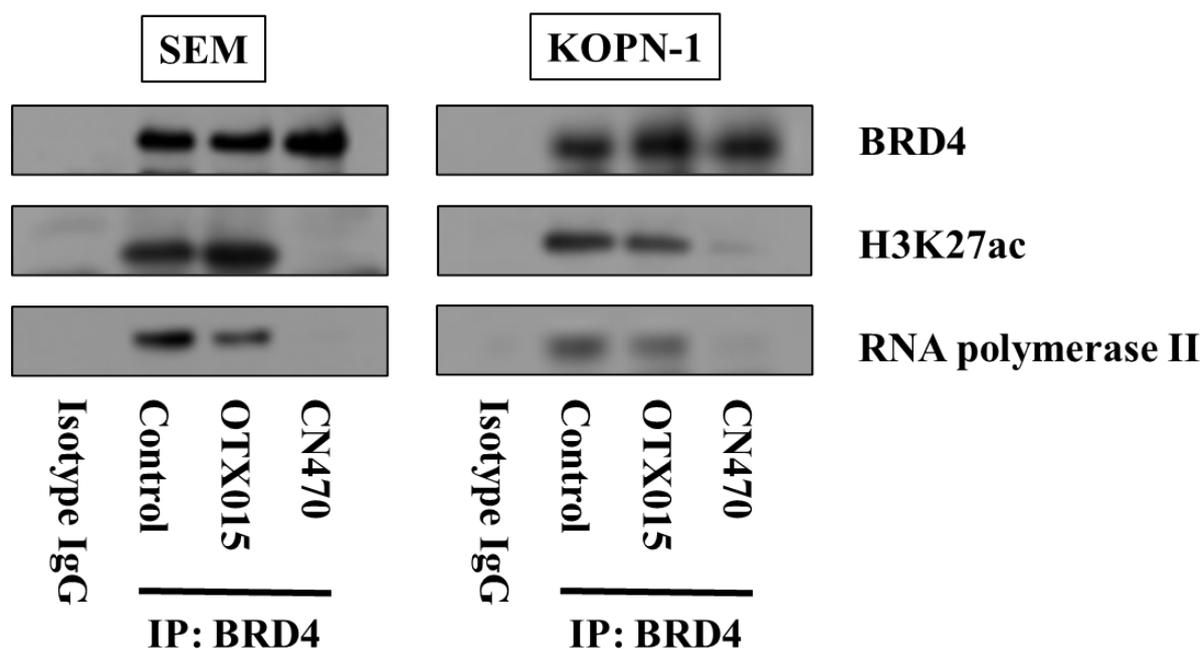


Figure 10. BRD4 と相互作用を示すタンパク質解析

各化合物 (OTX015, CN470) 処置により BRD4 と相互作用を示すタンパク質 (H3K27ac, RNA polymerase II) の変化を、SEM 細胞および KOPN-1 細胞において共免疫沈降法にて解析した結果を示す。これらの結果は、2回の検討の代表的な結果を示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 2C) 一部改変

第4節 考察

これまでに (+)-JQ-1 をはじめとした多くの BET 阻害剤が開発され、造血器腫瘍および固形腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討がなされてきた。臨床試験の結果も報告されつつあるが、ClinicalTrials.gov のデータベースを確認すると、効果が不十分であるという理由で中止になっている試験もある。近年では、BRD4 阻害を中心とした BET 阻害作用に加え、より高い有効性を得るための効果的な戦略の 1 つとして他の標的にも作用点を有する “multi-target” を念頭においた創薬研究も行われている。そこで本検討においては、既存の quinazoline 骨格を有する BET 阻害剤において、CBP/p300 を加えたマルチプロモドメイン阻害という付加的な作用を見出し、未だ予後の悪い小児 MLL-r ALL に対する新たな治療薬としての可能性を見出すための検討を行った。

BROMOscan の結果から、CN470 が BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害剤であることが示された。BRD4 にはアセチル化されたリジン残基を認識する 2 つのプロモドメイン (BD1, BD2) が存在するが、この BD1 と CBP や p300 におけるプロモドメインの構造は、アミノ酸配列では 30% 程度しか相同性がないものの、それらの立体構造はほぼ類似している。実際に、CN470 の構造に類似した CN210 が BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害として報告されており、結晶構造解析の結果から、6 位の 3, 5-dimethylisoxazole が BRD4 (BD1) の Asn 140 や、CBP や p300 のプロモドメインの Asn1168, Asn1132 と水素結合を形成すると報告されている³⁷。本検討において CN470 の結晶構造解析は実施できていないが、CN210 との構造的な違いは *N*-methyl pyridone 骨格が 3, 5-dimethylisoxazole に置換されているのみであり、ほぼ同様の結晶構造をとっていると推測される。この構造の違いは、BROMOscan を用いた K_d 値にも現れており、3, 5-dimethylisoxazole を有する CN210 の K_d 値が 70 nM と報告されているのに対し、*N*-methyl pyridone 骨格を有する CN470 の K_d 値は 23 nM と小さく、さらに WST-8 assay による細胞増殖抑制効果も、CN470 の方が高いことを確認している (未発表データ)。

本章では、小児 MLL-r ALL に対し、細胞株および患者由来細胞を用いて *in vitro* 系での抗腫瘍効果を検討した。その結果、CN470 は既存の BET 阻害剤 OTX015 同様に小児 MLL-r ALL 細胞株および患者由来細胞に対し増殖抑制効果を示し、その IC_{50} 値はいずれの細胞においても CN470 の方が低かった (Figure 5 and Table 6)。本検討では、小児 MLL-r ALL として代表的な *AF4* や *AF9*、*ENL* 遺伝子などと再構成をきたした細胞株や患者由来細胞を複数用いて検討した。さらに具体的な抗腫瘍効果の検討においては、小児 MLL-r ALL において最も代表的な *MLL* 融合遺伝子である *MLL-AF4* を有する SEM 細胞を、ALL 全体でみると次に多い *MLL-ENL* を有する KOPN-1 細胞を用いた。細胞株間における細胞増殖抑制効果に程度の違いは認められたが、パートナー遺伝子ごとによる明らかな違いは確認できていない。臨床的にもパートナー遺伝子ごとに治療法を選択・変更するような指標はなく、今後の研究課題と考える。

腫瘍細胞の増殖や細胞死のメカニズムを知ることは、抗腫瘍用薬の開発には欠かせない。そこで、フローサイトメトリー法を用いて細胞周期およびアポトーシスの解析を行った。その結果、OTX015 および CN470 とともに、細胞周期を G1 期で停止させる G1 arrest の傾向がみられ、薬物濃度や処置時間に依存して DNA 断片化が生じた sub G1 期の分画が増加することが示された (Figure 6, S1 and Table 7, 8)。また、早期アポトーシス分画 (Annexin-V+/PI-) および後期アポトーシス分画 (Annexin-V+/PI+)

の増加傾向も確認され、化合物処置によりアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった (Figure 7 and S2)。また、CN470 は OTX015 と同等、あるいはそれ以上に早期および後期アポトーシス分画を増加している傾向も確認された。アポトーシス経路は、BCL-2 family によるミトコンドリアを介する内因性経路と、tumor necrosis factor (TNF) 受容体や Fas 受容体などによるミトコンドリアを介さない外因性経路の2つに大別される。いずれの経路を辿っても、最終的には caspase-3 や PARP-1 などの活性化を引き起こし、アポトーシスに至る。BRD4 が多くの転写制御に関連することに起因すると推察するが、BET 阻害剤がアポトーシス誘導を引き起こすメカニズムには諸説ある。BRD4 は BCL2 の転写制御を担うことに基づき、ミトコンドリアを介するアポトーシス経路であるとする報告も多いが、(+)-JQ-1 や OTX015 においては TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 誘発のアポトーシスを増強するという報告^{38,39}や、フェルトーシスと呼ばれる細胞死を誘導する報告など様々な細胞死に関連する報告⁴⁰がなされている。本検討では、OTX015 や CN470 処置により BCL2 の mRNA やタンパク質発現は抑制される傾向が認められている (Figure 9) が、外因性経路の活性化の有無は検討していない。そのため、内因性経路のみのアポトーシス誘導による細胞死とは断定することはできないが、化合物処置により少なくとも内因性経路は活性化されたことが推察され、その結果、cleaved caspase-3 や cleaved PARP-1 のタンパク質発現が増加し、アポトーシスが誘導されていることが示された (Figure 8)。

CN470 は BET 阻害剤としての性質を有することから、BRD4 が転写制御をすると報告されている MYC や CDK6 の mRNA やタンパク質発現への影響を検討した。その結果、SEM 細胞においてはこれら全ての mRNA およびタンパク質発現は低下した。一方で、KOPN-1 細胞では 24 時間処置における MYC の mRNA 変化は確認されなかったものの、72 時間処置におけるタンパク質の発現は低下し、CDK6 の mRNA およびタンパク質発現は SEM 細胞同様に減少した (Figure 9)。さらに、BRD4 が H3K27ac を認識し、RNA polymerase II の動員を引き起こすことで転写制御を担っていることから、BRD4 阻害におけるこれらタンパク質との相互作用への影響を評価した。BRD4 で免疫沈降を行った結果、SEM 細胞、KOPN-1 細胞ともに、OTX015 処置では H3K27ac や RNA polymerase II のタンパク質はわずかな変化しか引き起こさなかった。しかし、興味深いことに、マルチプロモドメイン阻害作用を有する CN470 処置では、いずれの細胞でも H3K27ac や RNA polymerase II のタンパク質はほとんど確認されなかった (Figure 10)。CBP/p300 は、プロモドメインを有するだけでなく HAT 活性を有するタンパク質として知られているが、CN470 処置に伴う H3K27ac のタンパク質発現量に、変化は確認されていない (未発表データ)。加えて CBP や p300 は、アセチル化されたリジン残基をプロモドメインで認識することで HAT 活性としてのアセチル化を行うだけでなく、BRD4 をはじめとした多くの転写因子と複合体を形成する際の足場として機能することで転写制御を担っていると報告されている。⁴¹⁻⁴³このことから、CN470 は BRD4 および CBP/p300 のプロモドメインをマルチに阻害することにより、BRD4 と H3K27ac との結合や RNA polymerase II の動員をより強く抑制し、BRD4 が転写制御を担う分子の mRNA やタンパク質発現を抑制することで細胞周期の停止や細胞死を誘導したと推測される。

また、CBP や p300 はがんに対する治療標的になりうると考えられている⁴⁴⁻⁴⁶だけでなく、これらが相補的に機能を担っていることから、CBP および p300 ともに機能が阻害されるもしくは機能欠失すると合成致死が生じるとも報告されている。⁴⁷ 加えて、CBP/p300 は HAT 活性としてヒストンのアセチル化だけでなく、CBP/p300 はがん抑制遺伝子産物である p53 のアセチル化や NF- κ B 転写因子ファミリーである RelA のアセチル化を担っている。CBP/p300 は p53 の C 末にあるリジン残基をアセチル化することで、p53 の安定化に寄与する。^{48,49} がんにおいては p53 の DNA 結合領域に変異を有することが多く、CBP/p300 阻害によるアセチル化抑制によって、変異を有する p53 のアセチル化に伴う安定化機構が抑制され、抗腫瘍効果に寄与すると考えられる。また RelA においても、CBP/p300 によって 310 番目のリジン残基がアセチル化されることで BRD4 と相互作用を引き起こし、NF- κ B 関連サイトカイン遺伝子の転写調節を担うことが知られている。⁵⁰ NF- κ B 経路は多くのがんにおいて活性化状態にあり、腫瘍形成に大きく関与する。したがって、BRD4 および CBP/p300 をともに阻害することは、抗炎症効果や抗腫瘍効果を示すと考えられる。がん領域だけでなく免疫疾患においても BET 阻害剤を用いた研究成果が報告⁵¹されており、臨床試験も実施されている。CBP/p300 における HAT 活性の阻害には必ずしもプロモドメイン阻害作用を伴う必要がないと考えられる⁵²が、CBP/p300 のプロモドメイン阻害によってヒストンのアセチル化が抑制されるという報告⁵³もあるため、CN470 が HAT 活性を抑制している可能性は否定できない。しかし、残念ながら本検討においては H3K27ac を除いた他のヒストンや非ヒストンタンパク質でのアセチル化の変化を検討できていないため、詳細は不明である。なお、今回用いた小児 MLL-r ALL 細胞株の中には p53 変異を有する細胞株もいくつか存在するが、p53 変異の有無による抗腫瘍効果の差異については明らかなものは確認できておらず、細胞株を増やして詳細に検討することが必要である。

このように、BRD4 および CBP/p300 のプロモドメインをともに阻害することは、BRD4 阻害による転写制御に依存した経路のみならず、CBP/p300 がアセチル化修飾を担うことによる転写調節機構を加えた多岐にわたる影響が考えられる。Benzoimidazole 骨格を有する NEO2734 と呼ばれる BRD4 および CBP/p300 のプロモドメイン阻害剤も、前立腺がんや急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫において高い抗腫瘍効果を示していることが報告されており、悪性腫瘍における BRD4 および CBP/p300 プロモドメイン阻害を標的とした治療薬開発に期待が高まっている。⁵⁴⁻⁵⁶ 本章では *in vitro* 系に注目して抗腫瘍効果を評価してきたが、次章では CN470 が *in vivo* 系においても抗腫瘍効果を評価し、小児 MLL-r ALL に対する治療薬のリード化合物としての可能性を追究する。

第5節 小括

本章では、小児 MLL-rALL に対し、BRD4 および CBP/p300 を標的としたマルチプロモドメイン阻害剤を用いて *in vitro* 系における抗腫瘍効果を検討し、以下の知見を得た。

1. 既存の quinazoline 骨格を有する BET 阻害剤の中から、BRD4 および CBP/p300 のプロモドメインを阻害するマルチプロモドメイン阻害剤として、CN470 を見出した。
2. 小児 MLL-rALL 細胞株および患者由来細胞に対して、CN470 は既存の BET 阻害剤 OTX015 と同様に濃度依存的に増殖抑制効果を示し、算出された IC₅₀ 値は、いずれの細胞でも CN470 の方が低かった。
3. CN470 は OTX015 と同様に、BRD4 阻害に伴う mRNA およびタンパク質発現を抑制し、G1 期の停止を引き起こし、活性化した caspase-3 や PARP-1 の発現を上昇させることでアポトーシスを誘導した。
4. マルチプロモドメイン阻害作用を有する CN470 は、BRD4 のプロモドメインのみを阻害する OTX015 よりも顕著に H3K27ac との結合や RNA polymerase II の動員を抑制した。

第2章 *In vivo* 系における抗腫瘍効果の検討

第1節 緒言

昨今の分子生物学や細胞生物学の発展により、医薬品開発は目覚ましい発展を遂げた。臨床研究につなげるためには、細胞株を用いた *in vitro* 系の研究で抗腫瘍効果を示す化合物が同定されたのち、マウスモデルを用いた前臨床研究で抗腫瘍効果および動態や毒性の評価が求められる。様々ながん種のモデルマウスが作製され、候補化合物の抗腫瘍効果が検討されているが、これらのマウスモデルの多くは細胞株を用いた **cell line-derived xenograft (CDX)** モデルである。この CDX モデルは、医薬品開発において最も一般的な *in vivo* 系での抗腫瘍効果の検討手法であり、造血器腫瘍においては皮下腫瘍モデルのみならず、尾静脈移植による正所性担がんモデルマウスも用いられる。また細胞株に *Luciferase* 遺伝子や *GFP* 遺伝子を導入することにより、*in vivo* imaging system (IVIS) やフローサイトメトリー法を用いて腫瘍量の変化や体内分布を比較的簡便に確認できるなど、利便性にも優れている。

しかし、前臨床研究で薬効を認めた抗がん剤のうち、米国 Food and Drug Administration (FDA) で承認された薬剤はわずか 5%程度と報告されている。^{57,58} この要因として、培養段階で培養されやすい細胞になってしまうことや、患者がん組織の不均一性が CDX モデルでは再現されにくいことなどが挙げられている。そこで近年注目を浴びている手法として、**patient-derived xenograft (PDX)** モデルがある。PDX モデルでは、患者検体を用いることでこれらの問題点を克服できると期待されている。すでに PDX モデルでの投与結果が臨床現場での反応性と的一致率が高いという報告もある。⁵⁹ 2015 年には米国がん研究所 (National Cancer Institute; NCI) が細胞株パネル NCI-60 を用いた抗がん剤のスクリーニングから、PDX モデルを活用したスクリーニングに切り替える意向を示しており、製薬業界でも、1000 種類以上の PDX モデルを用いたスクリーニング結果が報告される⁶⁰ など、化合物の評価系が大きく変化しつつある。その一方で、患者検体を用いることから限られた研究者しか使用できないこと、品質管理や品質保証についての整備が求められていること、重度の免疫不全マウスを用いても PDX モデルの樹立自体が難しい場合も多いことなどから、汎用されるには至っていない。

本章では、臨床応用を念頭においてマルチプロモドメイン阻害剤の抗腫瘍効果を評価するためには、*in vitro* 系の評価に加え、*in vivo* 系の評価として経時的に ALL 細胞の体内分布を確認できる CDX モデルおよび、より臨床試験結果に近い挙動を示すと考えられる PDX モデルともに用いることが重要と考え検討した。そこで CDX モデルにおいては、小児 MLL-r ALL において最も代表的な *MLL-AF4* である *MLL* 遺伝子再構成を有する SEM 細胞に *Luciferase* 遺伝子および *GFP* 遺伝子を導入した細胞株を樹立し検討した。PDX モデルにおいては、最も予後不良で治療早期に再発をきたした K110 細胞を用いて検討した。

第2節 材料と方法

1. 試薬

CN470 は、第 1 章同様、開発者である National Center for Advancing Translational Sciences の David J. Maloney 博士および Shyh-Ming Yang 博士らより分与いただいた。マウスへの投与には、精製した蒸留水を用いて調整した 30% (v/v) Kolliphor® HS 15 (Sigma Aldrich) に溶解し、1.05 当量の塩酸 (富士フィルム和光純薬) を添加したものを用事調製して使用した。

レンチウイルスのパッケージングベクター (pRSV-Rev (#12253), pMD2.G (#12259), pMDLg/pRRE (#12251)) は、Addgene (Watertown, MA, USA) より購入した。*Luciferase* 遺伝子および *Green fluorescent protein (GFP)* 遺伝子の導入には、BLIV-MSCV-Luciferase-EF1a-copGFP-T2A-Puro (#BLIV713PA-1; System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) のプラスミドを用いた。これらのプラスミドは、XL10-Glod Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて増幅し精製した後、 -80°C にて保管した。

2. 細胞株およびヒト検体

SEM^{Luc/GFP} 細胞は、第 1 章で用いた SEM 細胞 (DSMZ) にレンチウイルスベクターを用いて *Luciferase* 遺伝子および *GFP* 遺伝子を導入し、 $0.4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシン (富士フィルム和光純薬) で選択後、BD FACSJazz™ (BD Biosciences) を用いて一定の GFP 強度有する細胞のみをソーティング後、クローニングすることで樹立した。レンチウイルスベクターの作製には、HEK293T 細胞 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, USA) に FuGENE® HD (Promega) を使用して HEK293T 細胞にパッケージングベクター (Addgene) と BLIV-MSCV-Luciferase-EF1a-copGFP-T2A-Puro (System Biosciences) を co-transfection し、48 時間後に上清中に産生されたウイルス粒子を回収し、Vivaspin Turbo 15 (Sartorius, Goettingen, Germany) を用いてウイルス粒子を濃縮した。作製したウイルス粒子を SEM 細胞に感染する際には、 $8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ポリブレン (ナカライテスク) を加えた。すべての細胞培養においては、10% FBS (Sigma Aldrich)、1% PC/SM (富士フィルム和光純薬) 含有 RPMI1640 培地 (富士フィルム和光純薬) を使用し、 37°C 、20% O_2 、5% CO_2 、75% N_2 における加湿条件下にて培養を行った。なお、一連の遺伝子組み換え実験においては、本学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認 (#422) の承認を得て実施している。

小児 MLL-r ALL 患者由来細胞においては、第 1 章と同様に京都大学医学部附属病院発達小児科学にて保有されている患者由来細胞の中から K110 細胞を用いた。ヒト検体を用いる検討においては、本学「人を対象とする研究」倫理審査委員会 (#20-19-06) および京都大学医の倫理委員会 (G1030-6) の承認を得て実施した。ヒト検体採取においては、患児の代諾者であるご両親にインフォームドコンセントを得て実施した。第 1 章同様に増幅を行うが、本検討においては、NOG マウス (実験動物中央研究所) に serial transplantation を 2 度繰り返し、NOG マウス両下肢 (大腿骨および脛骨) から Lymphoprep™ (Abbott Diagnostics Technologies AS) を用いた密度勾配遠心分離にて分取した ALL 細胞を用いた。

3. CDX モデルマウス作製と抗腫瘍効果の検討

CDX モデルマウスの作製には、ヒトレトロウイルス学共同研究センターの岡田誠治教授より分与いただき自家繁殖させた BALB/c Rag2^{+/+}/Jak3^{+/+} (BRJ) マウス⁶¹を用いた。樹立した SEM^{LucGFP} 細胞を 2×10^6 cells/200 μ L となるように PBS (-) に希釈し、11 週齢の雌の BRJ マウスに尾静脈移植することで CDX モデルマウスを作製した。移植後の生着確認においては、IVIS Lumina III *In vivo* imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) にて週 1 回発光量を測定した。IVIS での発光量測定は、吸入イソフルランによる麻酔下のもと、PBS (-) を用いて希釈したルシフェリン (富士フィルム和光純薬) を 3 mg/kg で腹腔内投与し、投与 7 分後に露光時間を 5 分に設定して撮影した。加えて、隔週で骨髄穿刺を実施し、採取された骨髄細胞を、フローサイトメトリー法を用いて解析し、骨髄中の ALL 細胞の比率 (キメリズム; $\text{chimerism} = \text{ALL cell} / (\text{ALL cell} + \text{mouse CD45}^+ \text{ cell})$) を評価した。吸入イソフルランによる麻酔下のもと、骨髄穿刺によって BRJ マウスの脛骨より得られた骨髄細胞は、抗 mouse CD45-APC 抗体 (#103111; Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いて遮光下で染色 (4°C, 30 分) 後、BD Pharm Lyse™ (BD Bioscience) を用いて溶血 (室温、15 分) させ、PBS (-) で洗浄した。骨髄中の細胞の表面抗原解析には BD FACSDiva™ software (BD Bioscience) を搭載した BD LSRFortessa™ (BD Bioscience) を使用した。また、得られた結果は、FlowJo version 10 software (FlowJo LLC) を用いて解析した。

抗腫瘍効果の検討においては、vehicle 群には溶媒のみ、CN470 群には 10 mg/kg を 1 日 1 回、連日経口投与することで化合物の有効性を評価した。主な有効性の評価は全生存期間とし、下肢麻痺や体重減少などの人道的エンドポイント⁶²に抵触した時点で安楽死させた。副次的な評価指標には、IVIS を用いて測定した発光量を用いた。SEM^{LucGFP} 細胞を移植後、IVIS にて週 1 回発光量を測定し、IVIS にて発光を確認した時点より、経口投与による治療を開始した。なお、これらの検討においては、本学動物実験委員会の承認 (#18-15-001, CTPH-20-005) を得て実施している。

4. PDX モデルマウス作製と抗腫瘍効果の検討

PDX モデルマウスの樹立および抗腫瘍効果の検討には、京都大学大学院医学研究科発達小児科学の加藤格助教および田中邦昭博士らにご協力いただき検討した。PDX モデルマウスの作製には、NOG マウス (実験動物中央研究所) を用いた。2 回の serial transplantation により増幅した K110 細胞を 0.5×10^6 cells/200 μ L となるように FBS および PC/SM 不含の RPMI1640 培地 (富士フィルム和光純薬) で希釈し、11 週齢の雌の NOG マウスに尾静脈移植することで PDX モデルマウスを作製した。

抗腫瘍効果の検討においては、CDX モデルマウスでの検討と同様に、vehicle 群には溶媒のみ、CN470 群には 10 mg/kg を 1 日 1 回、連日経口投与することで化合物の有効性を評価した。主な有効性の評価は全生存期間とし、下肢麻痺や体重減少などの人道的エンドポイントに抵触した時点で安楽死させた。副次的な評価指標には、末梢血 (peripheral blood; PB) 中のキメリズムを用いた。キメリズムの解析にはフローサイトメトリー法を用いた。得られた PB は抗 human CD19-PE 抗体 (#12-0199-42; eBioscience) と抗 mouse CD45-APC 抗体 (#559864; BD Bioscience) を用いて染色し、CDX モデルマウス同様の手順にて溶血および洗浄を行った。ネガティブコントロールの染色には、抗 mouse IgG1 κ -PE isotype control 抗体 (#555749, BD Bioscience) および抗 mouse IgG1 κ -APC isotype control 抗体 (#550854, BD Bioscience) を用い、解析時には、4',6-diamidino-2-phenylindole を用いた死細胞除去を行い、BD

FACSuite™ software (BD Bioscience) を搭載した BD FACSVerser™ (BD Bioscience) を使用した。また、得られた結果は FlowJo version 10 software (FlowJo LLC) を用いて解析した。なお、これらの検討においては、京都大学医学研究科・医学部 動物実験委員会の承認 (Med Kyo 21291-2) を得て実施している。

5. 統計解析

CDX モデルマウスおよび PDX モデルマウスの生存曲線は Kaplan-Meier 法により作成し、log-rank 法にて解析した。発光量の解析には、標本分布を Shapiro-Wilk 検定にて解析したのち、t 検定を用いて群平均にて比較検討した。キメリズムの解析には、Wilcoxon 順位和検定を用いた。なお、これらの統計解析には、統計分析ソフトである R (version 4.0.3; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。

第3節 結果

1. CDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

初めに *in vivo* 系における経時的評価を簡便に行うため、レンチウイルスベクターを用いて SEM 細胞に *luciferase* 遺伝子および *GFP* 遺伝子を導入した SEM^{Luc/GFP} 細胞を樹立した。SEM^{Luc/GFP} 細胞を BRJ マウスの尾静脈から移植することで、移植後 2 週目より下肢に発光が確認され (Figure 11A)、約 6~7 週間で下肢麻痺を生じ、人道的エンドポイントを迎えたため、死亡と判断した。一方で、骨髄穿刺における生着確認においては、移植後 2 週目で骨髄中の SEM^{Luc/GFP} 細胞を確認できるとは限らなかった (Figure 11B)。そのため今後の検討においては、骨髄穿刺による骨髄中の ALL 細胞の同定ではなく、IVIS での発光量を用いて評価した。

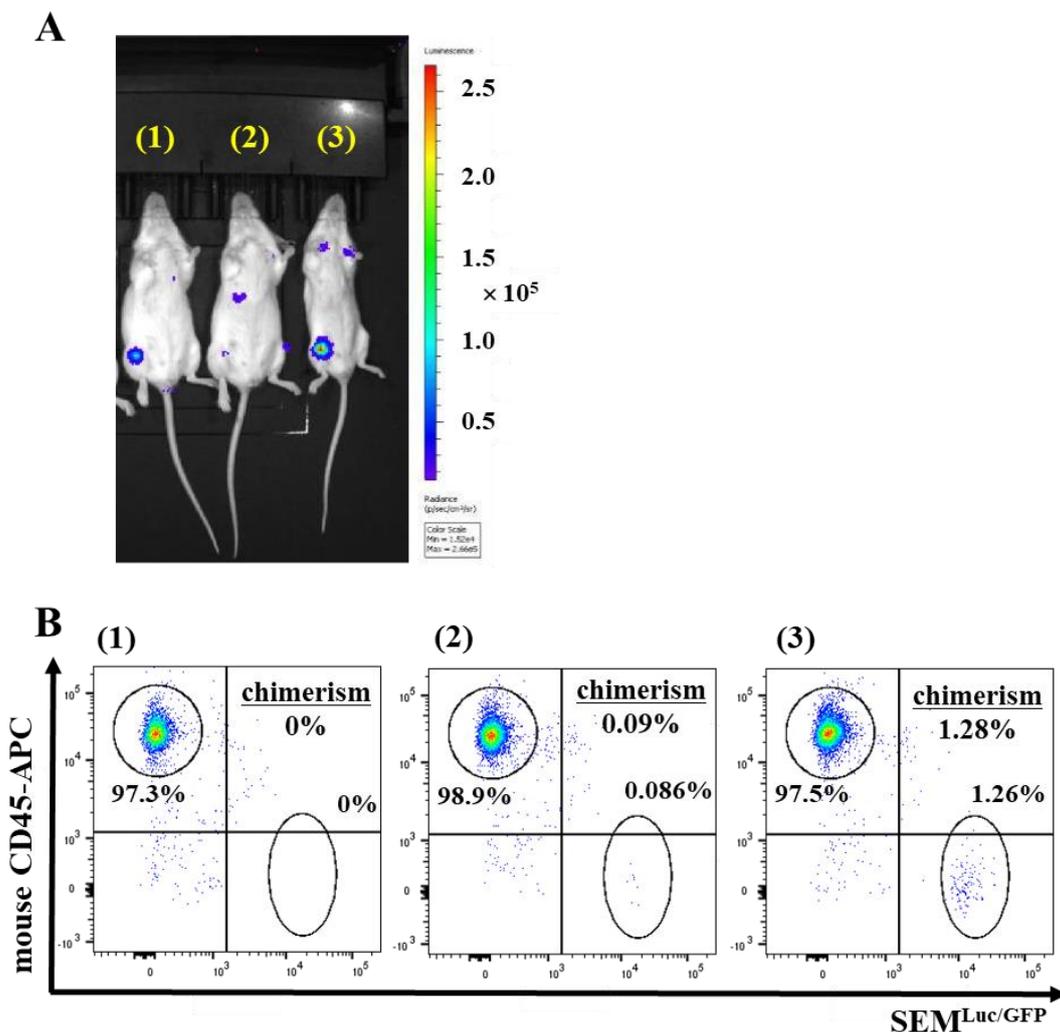


Figure 11. CDX モデルマウスの樹立

SEM^{Luc/GFP} 細胞を用いて CDX モデルマウスを樹立した際の、移植後 2 週目における検討結果を示す。(A) IVIS にて撮影した画像を示す。(B) 骨髄穿刺を用いた生着確認時の dot plot を示す。

抗腫瘍効果の確認においては、SEM^{Luc/GFP}細胞の生着を発光にて確認した時点より投与を開始した。なお、各群において投与開始時点の発光量に統計学的に有意な差がないことを確認後、投与を開始している。CN470を10 mg/kgで1日1回、連日経口投与することにより、投与開始14日目および21日目の仰臥位における発光量は vehicle 群と比較し、有意に減少した (Figure 12A)。IVIS の撮像画像からも、下肢や上肢の骨を中心に頭部を含む全身の発光が CN470 投与群において減少傾向にあることが確認できる (Figure 12B)。さらに、Kaplan-Meier 曲線より、CN470 投与群は vehicle 群と比較し、生存期間も有意に延長した (Figure 12C)。

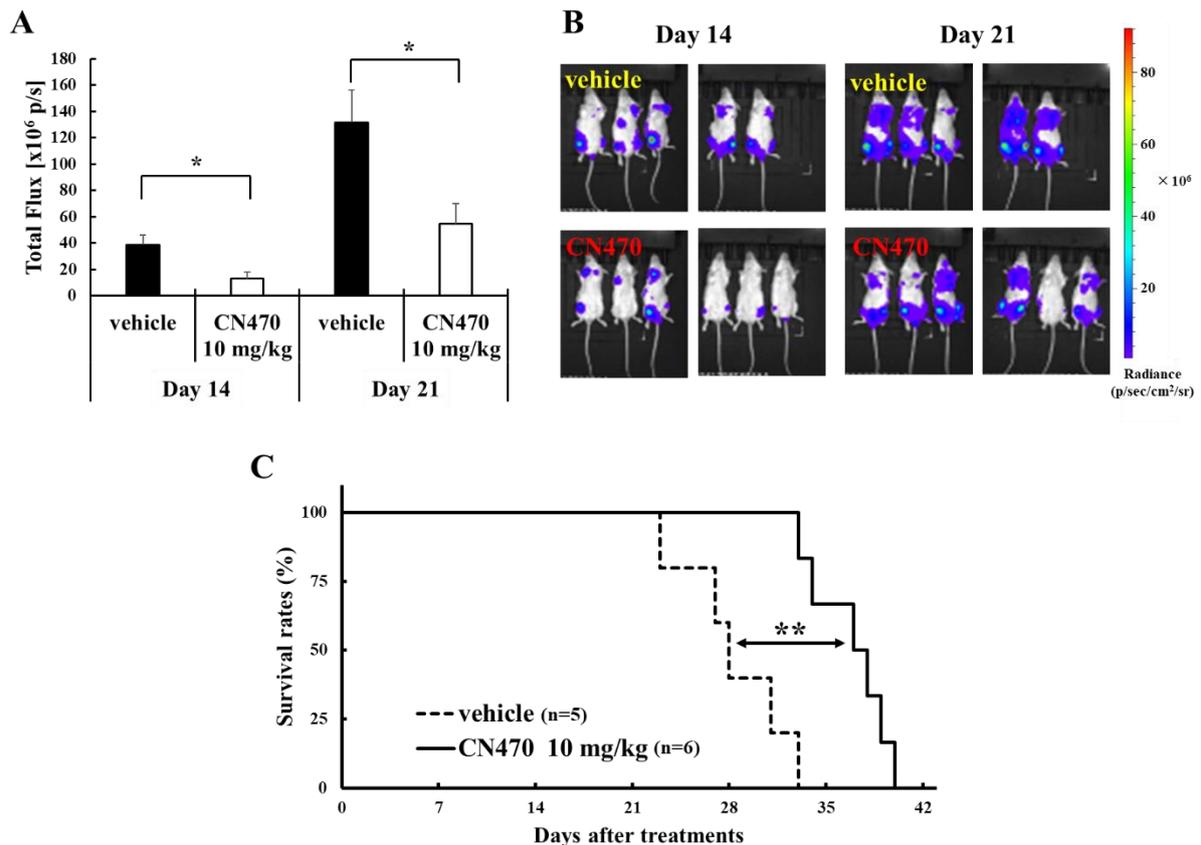


Figure 12. CDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果

SEM^{Luc/GFP}細胞を用いた CDX モデルマウスにおいて、CN470 による治療効果を検討した。(A) 投与開始14日目および21日目に IVIS にて計測した生体発光量を示す。CN470 投与群では、vehicle 群と比較して有意な生体発光量の差が確認された (day 14, * $p = 0.015$; day 21, * $p = 0.022$)。これらの結果は、各群のマウスの平均値 \pm SD にて示す。(B) 投与開始14日目および21日目の IVIS にて撮影した写真を示す。(C) CN470 投与中の生存曲線を示す。CN470 投与によって有意に生存期間が延長した (** $p = 0.003$)。

Imayoshi, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. 3B and C) 一部改変

2. PDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

次に、K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルマウスを用いて抗腫瘍効果を検討した。本モデルでは、モデル樹立時の基礎検討において、移植後 1 週目の骨髄穿刺にて ALL 細胞が確認されるなど、早期に生着が確認された。そのため、本検討においては移植翌日より投与を開始した。CN470 を 10 mg/kg で 1 日 1 回、連日経口投与することにより、投与開始 42 日目における PB 中のキメリズムは、vehicle 群 ($79.8 \pm 1.7\%$) と比較し CN470 投与群 ($68.8 \pm 2.3\%$) で有意に減少した (Figure 13A)。さらに、Kaplan-Meier 曲線より、CN470 投与群は vehicle 群と比較し、生存期間も有意に延長した (Figure 13B)。

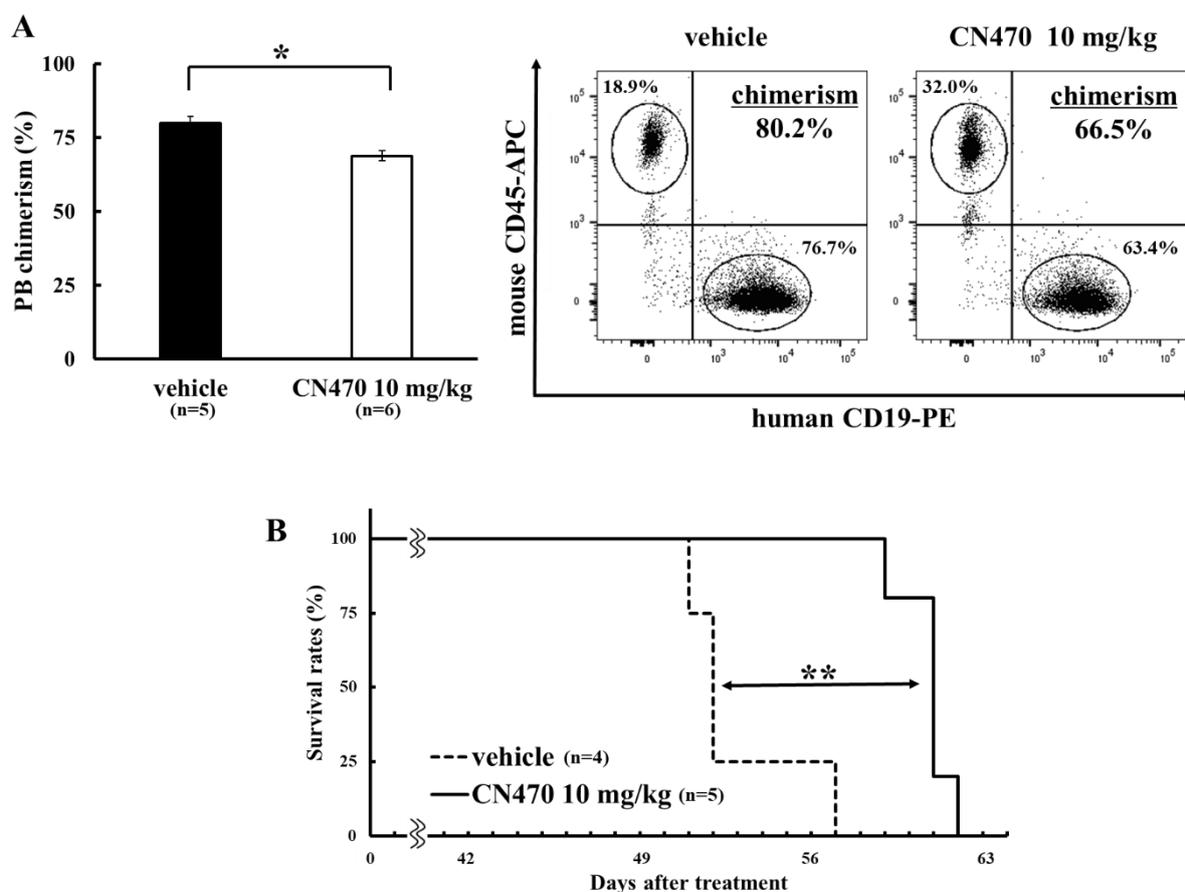


Figure 13. PDX モデルマウスを用いた抗腫瘍効果

K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルマウスにおいて、CN470 による治療効果を検討した。(A) 投与開始 42 日目における PB 中のキメリズム解析結果を示す。CN470 投与群では、vehicle 群と比較して有意なキメリズムの減少が確認された ($p=0.02$)。また各群における代表的な dot plot を示す。これらの結果は、各群のマウスの平均値 \pm SE にて示す。(B) CN470 投与中の生存曲線を示す。CN470 投与によって有意に生存期間が延長した ($**p=0.002$)。

Imayoshi, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2022, 590, 49-54. (Fig. 4A and B) 一部改変

第4節 考察

本章では、第1章での *in vitro* 系での結果を受けて、CN470 の *in vivo* 系における抗腫瘍効果を検討した。はじめに、小児 MLL-r ALL において最も頻度の高い *MLL-AF4* 融合遺伝子を有する SEM^{Luc/GFP} 細胞および K110 細胞を用いて、CDX モデルおよび PDX モデルを作製した。いずれのモデルにおいても、尾静脈から細胞を移植することで下肢の骨髄を中心に生着する正所性担がんモデルマウスを作製することができた。臨床的には ALL は髄液中に ALL 細胞を認めることも多いと言われているが、本検討のモデルではともに一部のマウスで CNS への浸潤が確認された。PDX モデル作製においては、PDX モデルの利用および品質管理について多くの議論がされており、明確に定まった指針は未だに存在していない。本邦でも日本医療研究開発機構 (Japan Agency for Medical Research and Development; AMED) において調査研究が行われており、2020 年の調査研究報告では 10 継代以降のモデルは使用すべきでないと提案されるなど、指針の策定を目指した動きが始まったところである。⁵⁸ なお、本検討においては 2 継代目の細胞を用いたことから、これらの提案を満たした PDX モデルを用いて検討できたと考えている。

抗腫瘍効果の検討においては、全生存期間だけでなく体内の ALL 細胞の増殖を抑制することも重要な治療の指標であることから、生体発光量の測定や PB 中のキメリズムを解析し、評価した。CDX モデルでは SEM^{Luc/GFP} 細胞の特性を生かし、IVIS を用いて生体発光量を計測することで体内の SEM^{Luc/GFP} 細胞の増殖程度を確認することができる。なお、これらの測定は仰臥位にて行ったが、その結果、腹臥位では測定しにくい大腿骨や脛骨といった下肢の骨髄を中心とした評価を可能とした。CN470 投与開始 14 日目および 21 日目では vehicle 群と比較して生体発光量が有意に減少し、CN470 投与によってマウス体内の SEM^{Luc/GFP} 細胞の増殖が抑制されていることが示された (Figure 12A)。PDX モデルでは、最も臨床予後の悪かった K110 細胞を用いたモデルマウスにて検討を行い、PB 中のキメリズム解析を行った。キメリズム解析は、vehicle 群が全例生存しており、かつ病状が最も進行していると考えられる投与開始 42 日目に実施した。その結果、vehicle 群と比較して CN470 投与群では PB 中のキメリズムは有意に低下した (Figure 13A)。これまでの PDX モデル樹立の基礎検討の結果から、PB 中に多くの ALL 細胞が検出されるには、骨髄中に占める ALL 細胞の割合が非常に高くなっている必要があり (未発表データ)、vehicle 群では骨髄の 90%以上を ALL 細胞が占めていると推測される。すなわち、CN470 投与は骨髄中の K110 細胞の増殖を抑制することで PB 中に検出される K110 細胞の割合を低下させたと考えられる。このように CN470 は、CDX モデルおよび PDX モデルともにマウス体内の ALL 細胞の増殖を抑制することにより、CN470 投与群における生存期間を有意に延長した (Figure 12C and 13B)。

これまでの *in vitro* 系で得られた特徴に加え、CN470 は経口投与可能な化合物であり、非侵襲的で患者の身体的負担軽減につながるという点でも、非常に利便性に優れていると考えられる。OTX015 を始めとした BET 阻害剤の多くは経口投与による臨床試験が実施されており、構造的にも経口投与に適した化合物が多い可能性はある。また、quinazoline 骨格を有する BET 阻害剤においては、2 位や 4 位を置換することで ADME 特性を改善することができると報告されており³⁵、CN470 も CD-1 マウスを用いた動態解析において良好な ADME 特性を示し、そのバイオアベイラビリティは 85%であると報告されている。⁶³ さらに、ALL においては先述したように CNS 再発の予防も重要視される。こ

の予防治療にはメトトレキサートの髄注や静注あるいはCIを行うが、本検討においてCN470のCNSへの移行性は検証できていないため、治療中において同時にCNS予防効果を示すことができるのか、あるいは予防治療としてCN470を用いることができるかは明らかではない。しかし、悪性膠芽腫に対してOTX015を経口投与する臨床試験が実施されたことから、アセチル化リジン残基を模倣した構造をもつBET阻害剤の一部にはCNSへの高い移行性を有するものも存在する。⁶⁴

本章での検討結果から、*in vivo*系において、CN470は経口投与かつ10 mg/kgという比較的低用量で抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。また、K110細胞という予後不良の患者検体を用いたPDXモデルにおいても抗腫瘍効果を示したことは非常に評価すべき点であり、今後の小児MLL-r ALLの治療におけるBRD4およびCBP/p300マルチプロモドメイン阻害の有用性を支持する結果と考えられる。高い有効性は抗腫瘍効果の検討において重要視される点であるが、次章では安全性、特に抗腫瘍用薬においてしばしば問題視される造血系への影響について、検討を加える。

第5節 小括

本章では、小児 MLL-rALL に対し、BRD4 および CBP/p300 を標的としたマルチプロモドメイン阻害剤 (CN470) を用いて *in vivo* 系における抗腫瘍効果を検討し、以下の知見を得た。

1. レンチウイルスベクターを用いて樹立した SEM^{Luc/GFP} 細胞を BRJ マウスに尾静脈移植することで、IVIS を用いた経時的評価可能な CDX モデルマウスを作製できた。
2. SEM^{Luc/GFP} 細胞を用いた CDX モデルマウスにおいて、CN470 投与によって発光量の減少および生存期間の延長が認められた。
3. K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルマウスにおいて、CN470 投与によって PB 中のキメリズム減少および生存期間の延長が認められた。

第3章 造血系に及ぼす影響について

第1節 緒言

医薬品開発において、グローバル化に伴って様々なガイドラインが定められており、これらのガイドラインは医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH) によって定められ、本邦では厚生労働省医薬・生活衛生局から通知される。このガイドラインは、有効性に限らず、品質や安全性などの項目を多く含み、非臨床段階においても効果だけではなく毒性を含めた安全性の評価結果を示すように定められている。このように医薬品開発においては、安全性の観点を含めたうえで有効性を示すことが求められる。

抗腫瘍用薬で問題視される代表的な副作用の1つに、骨髄抑制が挙げられる。骨髄抑制によって白血球 (white blood cell; WBC)、特に好中球の数が減少することに起因した感染症を引き起こすことも多い。小児 ALL 治療における保護者視点での副作用評価を解析したインドネシアからの報告があり、83%の患児が感染症に罹患したことが記されている。⁶⁵ 国により衛生環境が違うことを考慮したとしても、造血系への影響は重要な評価ポイントと考えられる。また BET 阻害剤においては、特に血小板 (platelet; PLT) の減少が報告されており^{19,22}、臨床試験において問題視されている。

造血系に及ぼす影響を評価するにあたり、投与期間中における血球数の変動も重要であるが、最も重要であるのは造血前駆細胞に対する影響である。実臨床においても、休薬あるいは投与量を減らすことによって、低下した好中球数の回復を待つことがしばしばある。好中球は、造血幹細胞から生み出された造血前駆細胞から分化する。この造血前駆細胞における影響を評価する手法の1つとして colony-forming cell (CFC) assay が挙げられる。この手法では、形成されたコロニー数の比較によってヒトの最大耐容量を予測することもできることが報告されており⁶⁶、血液毒性の評価として欠かせない手法である。またマルチ阻害剤の多くは、複数を標的とする特性から有害事象も引き起こしやすいと考えられ、このような安全性の評価は極めて重要であると考ええる。

これらのことから、本章においては BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害剤としての安全性評価の一環として主に造血系への影響に注目し、CN470 が造血系へ及ぼす影響を CFC assay を用いて評価した。なお、造血器腫瘍であることから、病状に伴い全血球数 (complete blood count; CBC) が増減する可能性も考慮し、健常マウスに連続経口投与を行うことで WBC 数や PLT 数などに変動が生じないかも検討した。

第2節 材料と方法

1. 試薬

CN470 は、第1章同様、開発者である National Center for Advancing Translational Sciences の David J. Maloney 博士および Shyh-Ming Yang 博士らより分与いただいた。マウスへの投与においても、第2章同様に用事調製した CN470 を使用した。

2. マウス

CDX モデルおよび PDX モデルを用いた検討には、第2章同様にヒトレトロウイルス学共同研究センターの岡田誠治教授より分与いただき自家繁殖させた BRJ マウス、および京都大学大学院医学研究科発達小児科学の加藤格助教および田中邦昭博士らにご協力いただき NOG マウス (実験動物中央研究所) を用いた。

3. CBC 解析

PB 中における CBC 解析は、全自動血球計測器 CellTac α (日本光電、東京、日本) を用いて測定した。採血は、マウスの尾静脈から、10~20 μ L/回をヘパリン処理済ガラス毛细管 (Drumond Scientific, Broomall, PA, USA) を用いて採取し、EDTA 処理済微量採血管 (テルモ、東京、日本) に移した後、氷上にて保管した。また、採血後は速やかに計測を行った。

第2章で抗腫瘍効果の検討を行った CDX および PDX モデルマウスにおいては、週1回または隔週の頻度で採血を行い、CBC 解析を行った。また、健常なマウスにおける造血系への評価を行うため、13週齢の雌の BRJ マウスに対し、CDX モデルと同様に CN470 を 10 mg/kg で1日1回、6週間連日経口投与した。本検討においては、投与期間中における CBC 解析を週1回の頻度で実施した。

4. 造血前駆細胞に及ぼす影響 (CFC assay)

各化合物 (OTX015, CN470) による造血前駆細胞への影響を、CFC assay にて得られたコロニー数を比較することにより、*in vivo* 系および *in vitro* 系において評価した。CFC assay には、マウス両大腿骨より 10% FBS (Sigma Aldrich) 含有 PBS (-) を用いて、EDTA 処理済微量採血管 (テルモ) に回収した骨髓細胞を用いた。回収した骨髓細胞は、BD Pharm Lyse™ (BD Bioscience) を用いて溶血 (室温、15分) し、PBS (-) で2回洗浄後、2% FBS 含有 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Sigma Aldrich) に希釈した。前処理した骨髓溶液 3×10^4 cells/300 μ L IMDM と MethoCult™ (#ST-03444; STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 3 mL と混和し、35 mm dish (Thermo Fisher Scientific) に 1.1 mL/dish ずつ2枚の dish に播種した。37°C、20% O₂、5% CO₂、75% N₂における加湿条件下にて7日間培養を行い、得られたコロニー数を計測し撮影を行った。なお、各コロニーは50以上の細胞で構成されたものとする。また、代表的なコロニーにおける細胞形態の観察にはギムザ染色を用いた。各コロニーは顕微鏡下で回収後、PBS (-) で2回洗浄し、Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて遠心スライドガラス (松波硝子、大阪、日本) に張り付けた。その後、メタノール (富士フィルム和光純薬) にて固定し、ギムザ染色液 (富士フィルム和光純薬) で染色 (室温、15分) し、細胞形態を評価し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP-70; オリンパス、東京、日本) で撮影を行った。

4-1. CFC assay を用いた経口投与した健常マウスにおける造血前駆細胞に及ぼす影響

In vivo 系における評価として、12 週齢の雌の健常 NOG マウス (実験動物中央研究所) に対し、PDX モデルと同様に CN470 を 10mg/kg で 1 日 1 回、2 週間連日経口投与し、CFC assay を行うことで造血前駆細胞への影響を評価した。最終投与の翌日にマウスを安楽死させ、上記 CFC assay の手法に従って骨髄細胞を回収して培養を行い、得られたコロニー数を計測した。なお、コロニーの撮影には、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-710; キーエンス、大阪、日本) を用いた。

4-2. CFC assay を用いた *in vitro* 系における造血前駆細胞に及ぼす影響

In vitro 系における評価には、各化合物 (OTX015, CN470) を含有する MethoCult™ (STEMCELL Technologies) を用いた。16 週齢の雌の健常 BRJ マウスを安楽死後、上記 CFC assay の手法に従って骨髄細胞を回収し、前処理を行った。前処理した骨髄溶液は 3×10^4 cells/200 μ L IMDM になるよう調製し、IMDM に溶解した各化合物 100 μ L を混合して培養を行い、得られたコロニー数を計測した。コロニーの撮影には、顕微鏡用デジタルカメラ (Leica MC 120 HD; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) を用いた。なお、各化合物の処置濃度は、第 1 章で用いた SEM 細胞における IC₅₀ 値の 1.5 倍とした。

5. 統計解析

CBC 解析結果における血球数の解析には、2 元配置分散分析を用いた。統計分析ソフトである R を用いて log-rank 法にて解析した。コロニー数における検定においては、Bonferroni の多重比較検定を用いた。また、統計解析には、統計分析ソフトである R (version 4.0.3; R Foundation for Statistical Computing) を用いた。

第3節 結果

1. MLL-r ALL モデルマウスにおける造血系への影響

既存の BET 阻害剤を用いた臨床試験において PLT 減少が認められていることから、CN470 投与中の SEM^{Luc/GFP} 細胞を用いた CDX モデルマウスおよび K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルマウスにおいて、CBC 解析を行った。その結果、いずれのモデルにおいても CN470 投与群と vehicle 群で血小板数に有意な差は見られなかった (Figure 14A and B)。

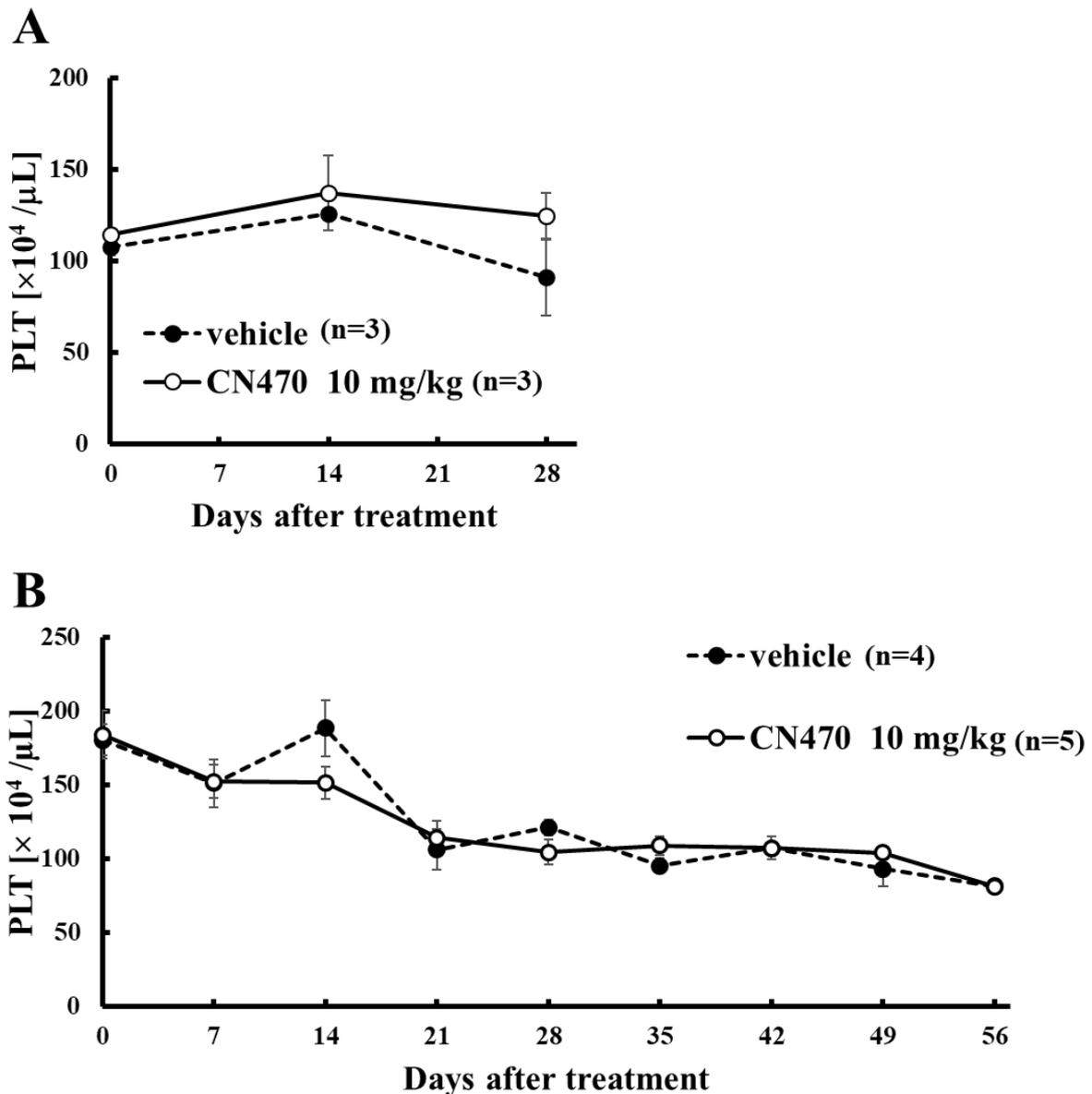


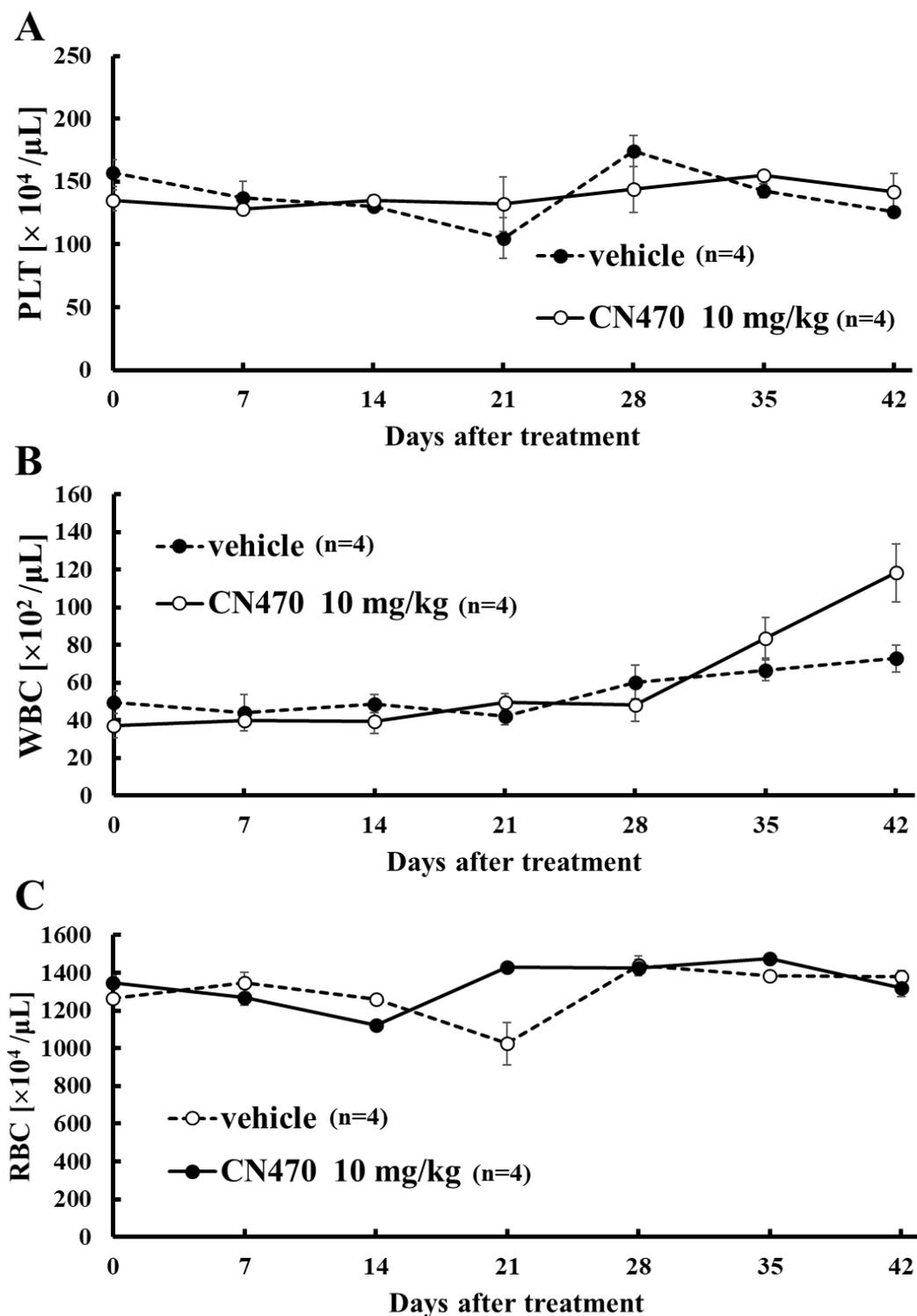
Figure 14. MLL-r ALL モデルマウスにおける血小板数変化

CN470 投与期間中の MLL-r ALL モデルマウスにおける PLT 数を解析した結果を示す。(A) SEM^{Luc/GFP} 細胞を用いた CDX モデルマウス、(B) K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルマウスの結果を示した。なお、いずれの結果も各群のマウスの平均値 \pm SE にて示す。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. S2A and B) を一部含む

2. 健常マウスにおける造血系への影響

次に、健常マウスを用いて検討した。健常 BRJ マウスに、CDX モデルマウスでの検討と同様の用法および用量にて、6 週間連日経口投与を行い、血球数の変化を解析した。その結果、CN470 投与有無によらず、PLT 数および WBC 数、赤血球 (red blood cell; RBC) の血球数は顕著に変化しないことが明らかとなった (Figure 15A-C)。また、投与期間中において体重減少は認められなかった (Figure 15D)。



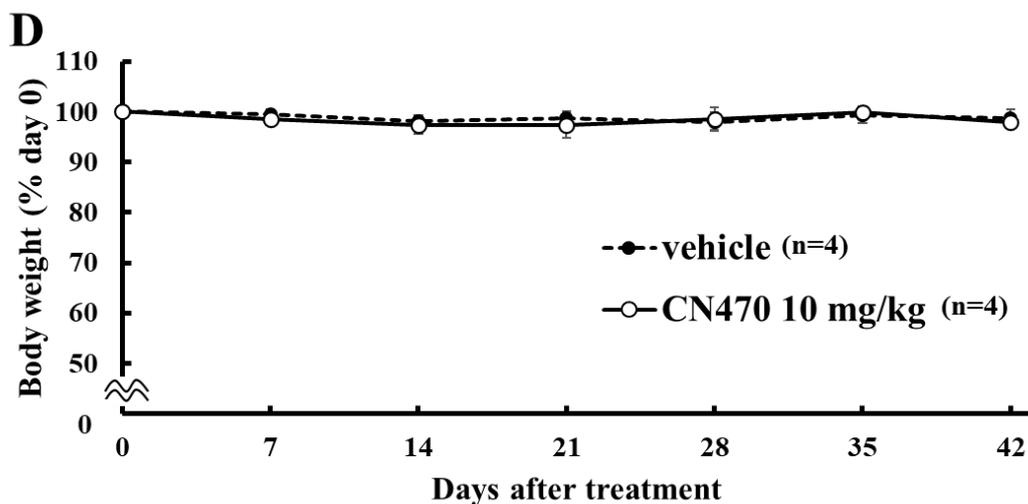


Figure 15. 健常 BRJ マウスにおける血球数変化

CN470 を投与した健常 BRJ マウスにおける末梢血中の経時的な CBC 解析結果を示す。CN470 を 10 mg/kg で 1 日 1 回連日経口投与した際の、(A) PLT 数、(B) WBC 数および (C) RBC 数の変化と、体重変化 (D) を示した。なお、いずれの結果も各群のマウスの平均値 \pm SE にて示す。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. S2C-F) 一部改変

3. 造血前駆細胞に及ぼす影響

3-1. 経口投与した健常マウスにおける造血前駆細胞への影響

In vivo 系における造血前駆細胞に及ぼす影響は、PDX モデルマウスでの検討と同様の用法および用量にて2週間連日経口投与を行った健常 NOG マウスの骨髄細胞を用い、CFC assay にて評価した。その結果、vehicle 群 ($100.0 \pm 5.1\%$) および CN470 投与群 ($108.1 \pm 3.6\%$) で得られたコロニー数に差はなかった (Figure 16A)。またギムザ染色の結果から、多くのコロニーは好中球コロニーであった (Figure 16B)。

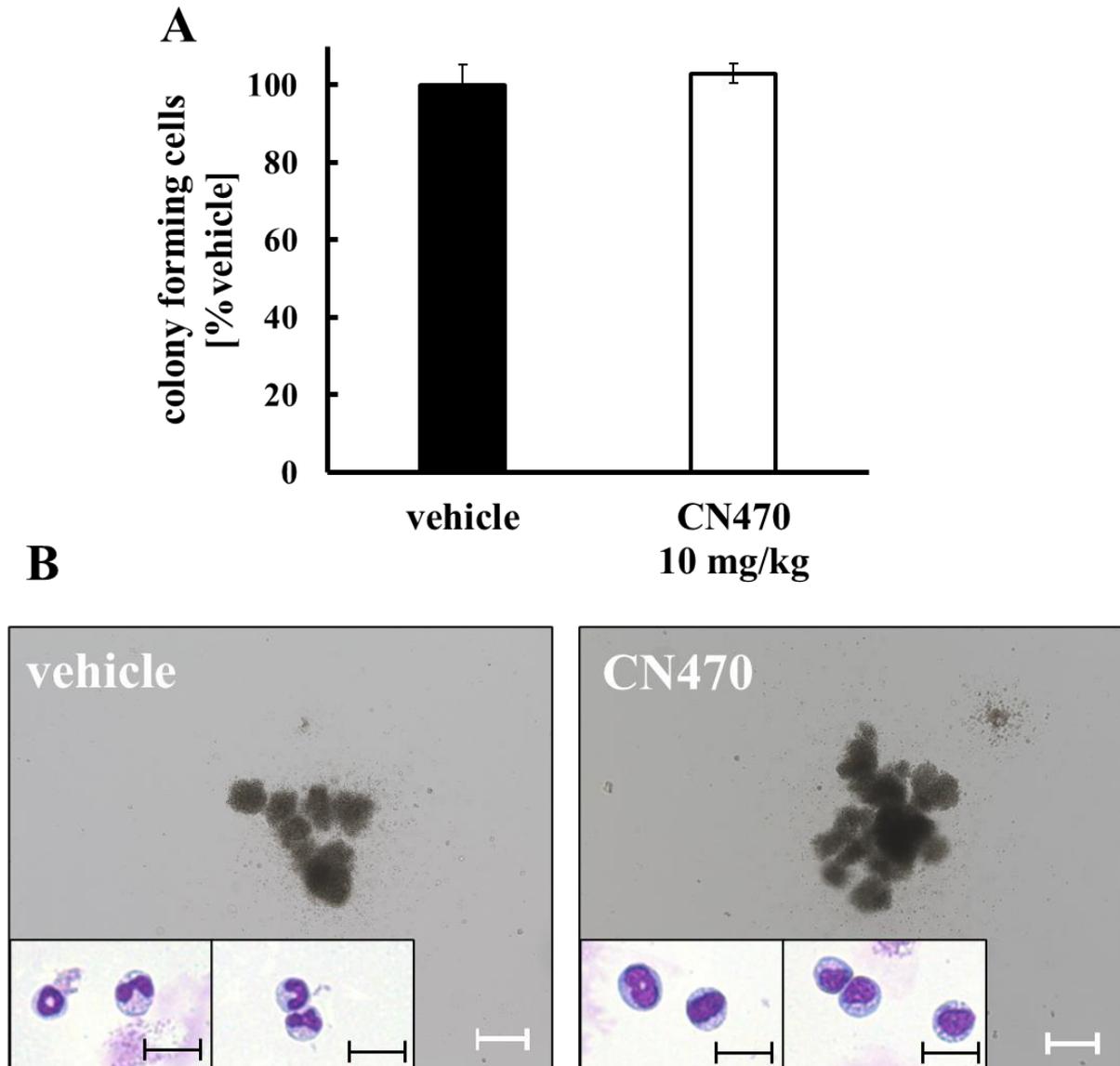


Figure 16. 健常 NOG マウスにおける造血前駆細胞のコロニー形成能への影響

CN470 を投与した健常 NOG マウスの骨髄から得られた造血前駆細胞におけるコロニー形成能について、CFC assay を行った結果を示す。(A) 培養後に得られたコロニー数を示す。なお、各群 3 匹ずつのマウスを用い、得られた平均値 \pm SE にて示す。(B) 代表的なコロニーの全体像とギムザ染色の結果を示す。各スケールバーは、20 μ m (ギムザ染色) および 300 μ m (コロニー写真) を示す。

3-2. 造血前駆細胞への直接的な影響

さらに直接的な造血前駆細胞への影響を評価として、各化合物 (OTX015, CN470) を含有する培地を用いて CFC assay を行った。OTX015 ($24.7 \pm 2.5\%$) および CN470 ($68.2 \pm 2.2\%$) 含有培地群では、化合物無処置群 (100%) と比較してコロニー数は有意に減少したが、OTX015 処置群においてより顕著にコロニー数が減少した (Figure 17A)。またギムザ染色の結果より、多くのコロニーは、経口投与した健常マウスと同様に好中球コロニーであった。一方で、OTX015 処置群においては、コロニーを形成した細胞が遠心時に潰れ、ギムザ染色にて評価できなかった (Figure 17B)。

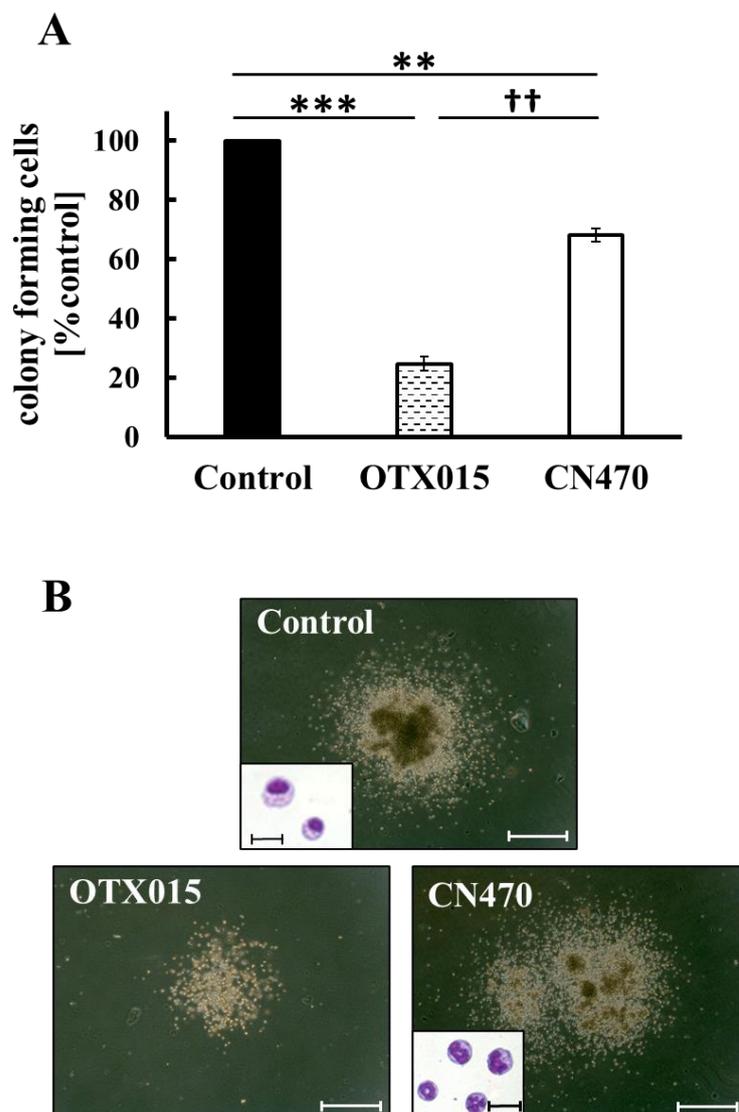


Figure 17. *In vitro* 系における造血前駆細胞のコロニー形成能への影響

OTX015 または CN470 含有培地中にて、骨髄から得られた造血前駆細胞におけるコロニー形成能について、CFC assay を行った結果を示す。(A) 培養後に得られたコロニー数を示し、得られた結果は2回の検討の平均値 \pm SE にて示す。統計解析には Bonferroni の多重比較検定を用いた ($*p=0.004$, $***p=0.0003$, $^{\#}p=0.0016$)。 (B) 代表的なコロニーの全体像とギムザ染色の結果を示す。各スケールバーは、20 μ m (ギムザ染色) および 500 μ m (コロニー写真) を示す。

第4節 考察

本章においては、安全性の側面から抗腫瘍用薬で最も問題視される骨髄抑制、特に BET 阻害剤で問題視される PLT 減少に注目して評価を行った。小児 MLL-r ALL 細胞株および患者検体を用いた CDX モデルおよび PDX モデルにおいて、いずれも CN470 投与による PLT 減少は確認されなかった (Figure 14)。モデルを用いた検討では、病状進行に起因した WBC 数は継時的に増加する傾向がみられたものの、RBC 数やヘモグロビン値等を含む CBC 解析結果においては CN470 投与有無による顕著な差異は確認されず、下痢や嘔吐などの目立った消化器症状は確認されなかった。さらに、健常 BRJ マウスを用い、CDX モデルの治療期間である 6 週間にわたり、CN470 を 1 日 1 回、10 mg/kg で経口投与した結果においても、WBC 数や PLT 数、RBC 数を含む CBC 解析結果に著明な変化は確認されなかった (Figure 15A-C)。なお、この投与期間において体重変化は確認されず (Figure 15D)、下痢や嘔吐などの顕著な消化器症状も認められなかったことから、摂餌障害もなかったと推測される。加えて、投与期間終了後の臓器においても、肉眼的変化は確認されなかった。これらの結果より、CN470 は *in vivo* 系において顕著な有害事象を示さず、比較的安全性の高い化合物であると推察される。

さらに詳細な造血系に及ぼす影響を評価すべく、*in vivo* 系および *in vitro* 系ともに CFC assay を行い、造血前駆細胞への影響を評価した。CFC assay は造血毒性の評価に用いられる手法の 1 つであるが、各化合物処置により形成されるコロニー数が減少するほど造血毒性が強く、コロニー数が増加するほど造血前駆細胞における分化・増殖に寄与していることが示唆される。健常 NOG マウスを用いた *in vivo* 系の評価において、CN470 を経口投与されたマウス骨髄から得られた造血前駆細胞は vehicle 群と同等のコロニー数が確認された (Figure 16A)。骨髄に存在する造血前駆細胞に対し *in vitro* 系において直接的に CN470 を暴露させた評価においては、control 群と比較し CN470 群ではコロニー数は 7 割程度に減少した。一方で、BET 阻害剤である OTX015 においては、顕著にコロニー数が減少し、control 群の 3 割弱にとどまった (Figure 17A)。いずれの系においても好中球を中心にコロニーを形成しており (Figure 16B, 17B)、一部ではマクロファージや赤芽球からなるコロニーが確認された (未発表データ)。本検討では、各分画の割合は検討できておらず詳細は不明だが、コロニー数の比較より、CN470 は OTX015 よりも造血前駆細胞のコロニー形成能に影響を与えにくいと考えられる。加えて、好中球が多く確認されたことから、一般的な抗腫瘍用薬で問題視される好中球減少を誘発しにくい可能性も示唆される。

このように、BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害剤 CN470 は、BET 阻害剤 OTX015 と比較し、造血前駆細胞や PLT 数への影響を及ぼしにくいことが示唆された。その要因としては、CN470 が造血系に作用する他の標的へ阻害作用をもたない、あるいは、BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害剤として高い抗腫瘍効果を実現し、より低濃度で用いられた結果、造血系への影響が抑えられたとも考えられる。造血系に影響する因子として、BRD3 と造血系転写因子である GATA-1 が挙げられる。⁶⁷ BET ファミリータンパク質のうち、BRD3 は GATA-1 と複合体を形成し、赤血球や巨核球の分化・成熟に寄与していると報告されている。(+)JQ-1 や I-BET151 などの BET 阻害剤は BRD4 だけでなく BRD3 も阻害することが知られており、(+)JQ-1 と類似構造を有する OTX015 も同様に BRD3 阻害を介して PLT 減少を引き起こしている可能性は高いと考えられる。本検討で BRD3 に対するプロモドメイン阻害活性は評価できていないが、構造的にも OTX015 と大きく異なる

CN470 は、BRD3 阻害作用が弱い可能性はあるが、詳細については今後検討する必要がある。

以上のように、CN470 における安全性評価としてはまだ不十分かつ多くの検討が求められるものの、BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害は、有効性・安全性ともに評価の高い小児 MLL-rALL に対する 1 つの戦略であると考えられる。

第5節 小括

本章では、小児 MLL-rALL に対し、BRD4 および CBP/p300 を標的としたマルチプロモドメイン阻害剤 (CN470) を用いて造血系に及ぼす影響について検討し、以下の知見を得た。

1. CN470 投与中の CDX モデルマウスおよび PDX モデルマウスにおいて、既存の BET 阻害剤治療において問題視されている PLT 減少は認められなかった。
2. 健常な BRJ マウスを用いた CN470 の安全性評価において、6 週間の連日経口投与期間中に顕著な体重減少や PLT 減少などの有害事象は認められなかった。
3. 2 週間にわたり CN470 を連日経口投与した健常な NOG マウスにおいて、造血前駆細胞が形成するコロニー数への影響は確認されなかった。
4. 造血前駆細胞に直接 CN470 を作用させた場合においては、造血前駆細胞が形成するコロニー数は control 群よりは減少したものの、既存の BET 阻害剤である OTX015 ほどのコロニー数の減少は認められなかった。
5. BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害は、BRD4 を中心とした既存の BET 阻害よりも造血系への影響が低く、安全性の高い治療法となりうる可能性が示唆された。

総括

がんが私たちにとって身近な疾患となるにつれ、抗腫瘍用薬の開発も目覚ましい成長を遂げた。しかし、小児科領域においては医薬品の開発だけでなく、医療体制ですらまだまだ不十分さが残っている。本邦のがん対策推進基本計画においても、第2期にあたる2012年に初めて「小児」の文言が追加され、2017年の第3期には「小児・AYA世代」の項目が立てられたばかりである。調剤報酬においても2022年に小児特定加算が追加されるなど、医療業界における小児科領域への注目度は年々高まっているものの、これからに期待されるところが大きいのが現状である。一方で、がんに関する研究が進み、分子生物学や細胞生物学の発展に伴って、成人のがん患者の予後改善と同様、小児がん患者の予後も改善されつつある。小児白血病の中で最も多い疾患はALLであるが、治療に用いられる薬剤のほとんどが成人の造血器腫瘍と重複する。しかし、乳児や小児に多いとされるMLL遺伝子に転座を生じたMLL-r ALLは今もなお予後が悪く、強力な多剤併用化学療法やSCTを除き、有効な治療薬および治療法は存在しない。またこれらの治療は、抗腫瘍用薬でしばしば問題となる骨髄抑制はもちろん、発育過程にある患児におよぼす影響も多く、発達障害や妊孕性など晩期合併症と呼ばれる問題を抱えている。すなわち、小児MLL-r ALLに対する有効で安全な治療薬および治療法の開発は、小児医療において極めて重要な課題である。

本研究では、BRD4およびCBP/p300を標的としたマルチプロモドメイン阻害に注目し、小児MLL-r ALL細胞株および患者検体を用いて*in vitro*系および*in vivo*系において抗腫瘍効果を検討した。第1章では、quinazoline骨格を有する既存のBET阻害剤の中から、BRD4およびCBP/p300マルチプロモドメイン阻害剤であるCN470を見出し、小児MLL-r ALL細胞株を用いた*in vitro*系における抗腫瘍効果を検討した。CN470は既存のBET阻害剤であるOTX015と同様に濃度依存的に増殖抑制効果を示し、BRD4阻害に伴うmRNAやタンパク質発現を抑制し、G1期の停止を引き起こした結果、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、CN470は、OTX015よりも顕著にH3K27acとの結合やRNA polymerase IIの動員を抑制することが明らかとなり、CN470の小児MLL-r ALLにおける*in vitro*系での有効性が認められた。第2章では、CDXモデルおよびPDXモデルを用いることで*in vivo*系における抗腫瘍効果を検討した。いずれのモデルマウスも、CN470経口投与によりALL細胞の増殖は抑制され、生存期間は延長した。臨床的に生命予後が極めて不良であった患者検体を用いたPDXモデルでも抗腫瘍効果が確認されたことから、本検討にてCN470の有効性を確固たるものとしたと考えられる。第3章では、抗腫瘍用薬として問題視される骨髄抑制に注目し、OTX015の臨床試験でも問題とされたPLT減少を中心に造血系への影響を評価した。その結果、CN470はPLT減少を引き起こさず、OTX015と比較して造血前駆細胞のコロニー形成能を抑制しないことが明らかとなった。

以上より、本検討で見出した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CN470は、小児MLL-r ALLに対し、有効な治療薬となりうる可能性を秘めた化合物であることを示した (Figure 18)。また、CN470が非侵襲的な経口投与による治療を可能としたこと、PLTや造血前駆細胞への影響が少なかったことから、患児およびそのご家族にとって身体的・精神的負担が軽減される可能性が示唆された。このように、BRD4およびCBP/p300のプロモドメイン阻害を

標的とすることは、有効性および安全性の高い治療法となり得る可能性が示唆され、再発例においても患児のクオリティ・オブ・ライフ (quality of life; QOL) を維持しつつも治療を遂行できる可能性を見出した。小児科領域における創薬は、小児独自の体内動態の難しさに加え、晩期合併症など多くの課題が挙げられるが、予後不良である小児 MLL-r ALL において有効性および造血系に対する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り、患児とそご家族にとって大きな福音をもたらすことが期待される。

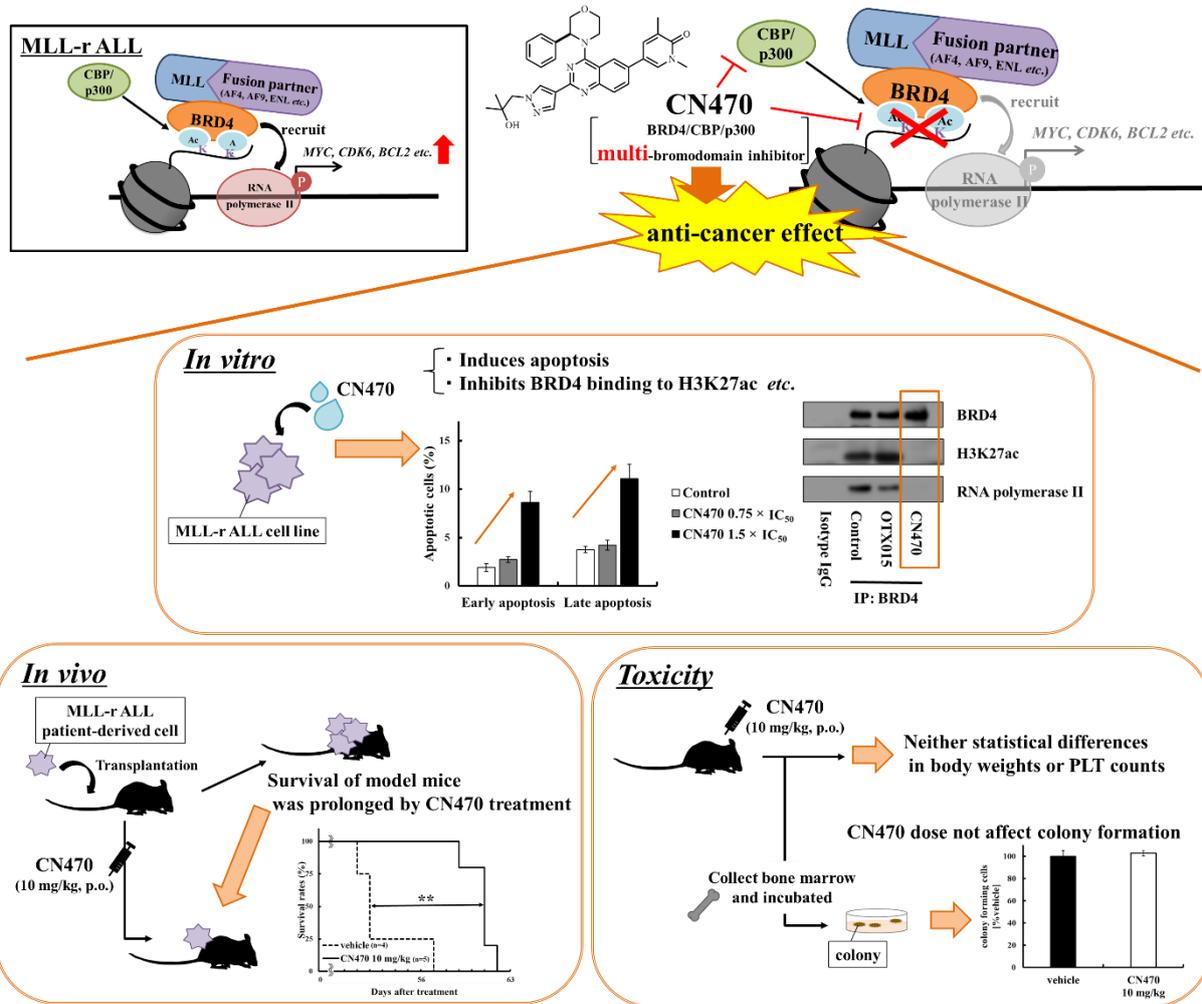


Figure 18. Graphical summary

本研究における graphical summary を示す。本研究では、新規マルチブロモドメイン阻害剤として CN470 を見出し、CN470 が小児 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すことを明らかにした。また、CN470 は造血系への影響が低く、有効性・安全性の高い治療法となる可能性を示した。

結語

本研究では、マルチプロモドメイン阻害に基づき BRD4 および CBP/p300 を標的とした小児 MLL-r ALL 治療に関する基礎検討を行い、以下の知見を得た。

1. 既存の quinazoline 骨格を有する BET 阻害剤の中から、BRD4 および CBP/p300 のプロモドメインを阻害するマルチプロモドメイン阻害剤として、CN470 を見出した。
2. 小児 MLL-r ALL 細胞株および患者由来細胞に対して、CN470 は既存の BET 阻害剤 OTX015 と同様に増殖抑制効果を示した。
3. CN470 は、小児 MLL-r ALL 細胞株に対して、BRD4 阻害に伴う mRNA およびタンパク質発現を抑制し、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導し、OTX015 よりも顕著に H3K27ac との結合や RNA polymerase II の動員を抑制した。
4. SEM^{Luc/GFP} 細胞を用いた CDX モデルや、K110 患者由来細胞を用いた PDX モデルにおいて、CN470 投与によって ALL 細胞の減少および生存期間の延長が認められた。
5. CN470 投与中のマウスにおける CBC 解析や CFC assay の結果より、BRD4 および CBP/p300 マルチプロモドメイン阻害は、BRD4 を中心とした既存の BET 阻害よりも造血系への影響が低く、安全性の高い治療法となりうる可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる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、細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教に深甚なる謝意を表します。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田徹男 教授、同細胞生物学分野 藤室雅弘 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を推進するにあたり、国内および大学の垣根を越えて多大なるご指導ご鞭撻を賜りました ConverGene LLC Makoto Yoshioka 博士、京都大学大学院 医学研究科 発達小児科学 加藤格 助教に深謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご指導およびご助言いただき、甚大なるご協力をいただきました次の方々に、心より感謝申し上げます。

National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS)

David J. Maloney, PhD, Shyh-Ming Yang, PhD

京都大学大学院 医学研究科 発達小児科学

滝田順子 教授、八角貴裕 准教授、田中邦昭 博士、三上貴司 博士、神鳥達也 研究員、
児玉紅美 技術補佐員ならびに本教室の先生・大学院生のみなさま

京都大学 iPS 細胞研究所

中畑龍俊 副研究所長

山梨大学 医学部 小児科学講座

大飼岳史 教授

赤羽弘資 助教

熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 造血・腫瘍制御学分野

岡田誠治 教授

本分野で過ごした大学院生活において、楽しい時も苦しい時も励まし、支えてくださった宮下雅亜 博士、黒田絵莉子 博士、角陽子 博士、若林亮介 博士、甘利圭悟 博士、友金眞光 博士 および本分野に所属する大学院生・学部生諸氏に加え、共同研究にあたる手続きを進めてくださった本学 研究・産学連携推進室 武野薫 様および太田亮史 様をはじめとした、多くの事務の方々に厚く御礼申し上げます。また、大学院進学を快く受け入れ、温かく見守っていただきました京都大学医学部附属病院 薬剤部の皆様にも心より御礼申し上げます。

最後に、この4年間の大学院生活を支えてくれた両親に深く感謝いたします。

参考文献

1. 国立がん研究センター. 最新がん統計. **2019**.
2. 国立がん研究センター. 小児・AYA世代のがん罹患データ (2009～2011年). **2018**.
3. 日本小児血液・がん学会. 小児白血病・リンパ腫の診療ガイドライン. **2016**.
4. Clarke, M.; Gaynon, P.; Hann, I.; Harrison, G.; Masera, G.; Peto, R.; Richards, S. CNS-Directed Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Childhood ALL Collaborative Group Overview of 43 Randomized Trials. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1798–1809.
5. Richards, S.; Pui, C. H.; Gayon, P. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials of Central Nervous System Directed Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*. 2013, pp 185–195.
6. 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.
7. Meyer, C.; Burmeister, T.; Gröger, D.; Tsaur, G.; Fehina, L.; Renneville, A.; Sutton, R.; Venn, N.; Emerenciano, M.; Pombo-de-Oliveira, M.; Barbieri Blunck, C.; Almeida Lopes, B.; Zuna, J.; Trka, J.; Ballerini, P.; Lapillonne, H.; De Braekeleer, M.; Suarez, L.; Cavé, H.; Marschalek, R. The MLL Recombinome of Acute Leukemias in 2017. *R Panzer-Grimayer* **2018**, *22*, 273–284.
8. Koh, K.; Tomizawa, D.; Saito, A. M.; Watanabe, T.; Miyamura, T.; Hirayama, M.; Takahashi, Y.; Ogawa, A.; Kato, K.; Sugita, K.; Sato, T.; Deguchi, T.; Hayashi, Y.; Takita, J.; Takeshita, Y.; Tsurusawa, M.; Horibe, K.; Mizutani, S.; Ishii, E. Early Use of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Infants with MLL Gene-Rearrangement-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* **2015**, *29*, 290–296.
9. Armstrong, G. T.; Kawashima, T.; Leisenring, W.; Stratton, K.; Stovall, M.; Hudson, M. M.; Sklar, C. A.; Robison, L. L.; Oeffinger, K. C. Aging and Risk of Severe, Disabling, Life-Threatening, and Fatal Events in the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1218–1227.
10. JCCG長期フォローアップ委員会 長期フォローアップガイドライン作成ワーキンググループ. 小児がん治療後の長期フォローアップガイド. **2021**.
11. Deshaies, R. J. Multispecific Drugs Herald a New Era of Biopharmaceutical Innovation. *Nature* **2020**, *580*, 329–338.
12. Stein, E. M.; Garcia-Manero, G.; Rizzieri, D. A.; Tibes, R.; Berdeja, J. G.; Savona, M. R.; Jongen-Lavrenic, M.; Altman, J. K.; Thomson, B.; Blakemore, S. J.; Daigle, S. R.; Waters, N. J.; Benjamin Suttle, A.; Clawson, A.; Pollock, R.; Krivtsov, A.; Armstrong, S. A.; DiMartino, J.; Hedrick, E.; Tallman, M. S. *The DOTIL Inhibitor Pinometostat Reduces H3K79 Methylation and Has Modest Clinical Activity in Adult Acute Leukemia*; 2018; Vol. 131.

13. Hopkins, A. L. Network Pharmacology: The next Paradigm in Drug Discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682–690.
14. Kantarjian, H.; Stein, A.; Gökbuget, N.; Fielding, A. K.; Schuh, A. C.; Ribera, J. M.; Wei, A.; Dombret, H.; Foà, R.; Bassan, R.; Arslan, Ö.; Sanz, M. A.; Bergeron, J.; Demirkan, F.; Lech-Maranda, E.; Rambaldi, A.; Thomas, X.; Horst, H. A.; Brüggemann, M.; Klapper, W.; Wood, B. L.; Fleishman, A.; Nagorsen, D.; Holland, C.; Zimmerman, Z.; Topp, M. S. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 836–847.
15. Filippakopoulos, P.; Knapp, S. Targeting Bromodomains: Epigenetic Readers of Lysine Acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 337–356.
16. Hnisz, D.; Abraham, B. J.; Lee, T. I.; Lau, A.; Saint-André, V.; Sigova, A. A.; Hoke, H. A.; Young, R. A. XSuper-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. *Cell* **2013**, *155*, 934.
17. Lovén, J.; Hoke, H. A.; Lin, C. Y.; Lau, A.; Orlando, D. A.; Vakoc, C. R.; Bradner, J. E.; Lee, T. I.; Young, R. A. Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers. *Cell* **2013**, *153*, 320–334.
18. Bechter, O.; Schöffski, P. Make Your Best BET: The Emerging Role of BET Inhibitor Treatment in Malignant Tumors. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *208*, 107479.
19. 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.
20. 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.
21. Piha-Paul, S. A.; Hann, C. L.; French, C. A.; Cousin, S.; Braña, I.; Cassier, P. A.; Moreno, V.; de Bono, J. S.; Harward, S. D.; Ferron-Brady, G.; Barbash, O.; Wyce, A.; Wu, Y.; Horner, T.; Annan, M.; Parr, N. J.; Prinjha, R. K.; Carpenter, C. L.; Hilton, J.; Hong, D. S.; Haas, N. B.; Markowski, M. C.; Dhar, A.; O'Dwyer, P. J.; Shapiro, G. I. Phase 1 Study of Molibresib (GSK525762), a Bromodomain and Extra-Terminal Domain Protein Inhibitor, in NUT Carcinoma and Other Solid Tumors. *JNCI Cancer Spectr.* **2020**, *4*, 1–9.
22. Piha-Paul, S. A.; Sachdev, J. C.; Barve, M.; LoRusso, P.; Szmulewitz, R.; Patel, S. P.; Lara, P. N.; Chen, X.; Hu, B.; Freise, K. J.; Modi, D.; Sood, A.; Hutti, J. E.; Wolff, J.; O'Neil, B. H. First-in-Human Study of Mivebresib (ABBV-075), an Oral Pan-Inhibitor of Bromodomain and Extra Terminal Proteins, in Patients with Relapsed/ Refractory Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 6309–6319.
23. Filippakopoulos, P.; Picaud, S.; Mangos, M.; Keates, T.; Lambert, J. P.; Barsyte-Lovejoy, D.; Felletar, I.; Volkmer, R.; Müller, S.; Pawson, T.; Gingras, A. C.; Arrowsmith, C. H.; Knapp, S. Histone Recognition

- and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell* **2012**, *149*, 214–231.
24. Zhang, Y.; Chen, A.; Yan, X. M.; Huang, G. Disordered Epigenetic Regulation in MLL-Related Leukemia. *Int. J. Hematol.* **2012**, *96*, 428–437.
 25. Filippakopoulos, P.; Qi, J.; Picaud, S.; Shen, Y.; Smith, W. B.; Fedorov, O.; Morse, E. M.; Keates, T.; Hickman, T. T.; Felletar, I.; Philpott, M.; Munro, S.; McKeown, M. R.; Wang, Y.; Christie, A. L.; West, N.; Cameron, M. J.; Schwartz, B.; Heightman, T. D.; La Thangue, N.; French, C. A.; Wiest, O.; Kung, A. L.; Knapp, S.; Bradner, J. E. Selective Inhibition of BET Bromodomains. *Nature* **2010**, *468*, 1067–1073.
 26. Ferri, E.; Petosa, C.; McKenna, C. E. Bromodomains: Structure, Function and Pharmacology of Inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *106*, 1–18.
 27. Gulcin Ozer, H.; El-Gamal, D.; Powell, B.; Hing, Z. A.; Blachly, J. S.; Harrington, B.; Mitchell, S.; Grieselhuber, N. R.; Williams, K.; Lai, T.-H.; Alinari, L.; Baiocchi, R. A.; Brinton, L.; Baskin, E.; Cannon, M.; Beaver, L.; Goettl, V. M.; Lucas, D. M.; Woyach, J. A.; Sampath, D.; Lehman, A. M.; Yu, L.; Zhang, J.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Spevak, W.; Shi, S.; Severson, P.; Shellooe, R.; Carias, H.; Tsang, G.; Dong, K.; Ewing, T.; Marimuthu, A.; Tantoy, C.; Walters, J.; Sanftner, L.; Rezaei, H.; Nespi, M.; Matusow, B.; Habets, G.; Zhang, C.; Mathé, E. A.; Bollag, G.; Byrd, J. C.; Lapalombella, R.; Ozer, H. G.; El-Gamal, D.; Powell, B. BRD4 Profiling Identifies Critical Chronic Lymphocytic Leukemia Oncogenic Circuits and Reveals Sensitivity to PLX51107, a Novel Structurally Distinct BET Inhibitor. **2018**.
 28. 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.
 29. He, S.; Dong, G.; Li, Y.; Wu, S.; Wang, W.; Sheng, C. Potent Dual BET/HDAC Inhibitors for Efficient Treatment of Pancreatic Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59*, 3028–3032.
 30. Laszig, S.; Boedicker, C.; Weiser, T.; Knapp, S.; Fulda, S. The Novel Dual BET/HDAC Inhibitor TW09 Mediates Cell Death by Mitochondrial Apoptosis in Rhabdomyosarcoma Cells. *Cancer Lett.* **2020**, *486*, 46–57.
 31. Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Dong, H.; Wang, J.; Raina, K.; Hines, J.; Winkler, J. D.; Crew, A. P.; Coleman, K.; Crews, C. M. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 755–763.
 32. Winter, G. E.; Buckley, D. L.; Paulk, J.; Roberts, J. M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J. E. Phthalimide Conjugation as a Strategy for in Vivo Target Protein Degradation. *Science (80-.)*. **2015**, *348*, 1376–1381.
 33. Martin, M. P.; Olesen, S. H.; Georg, G. I.; Schönbrunn, E. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib Interacts with the Acetyl-Lysine Recognition Site of Bromodomains.
 34. Ember, S. W. J.; Zhu, J.-Y.; Olesen, S. H.; Martin, M. P.; Becker, A.; Berndt, N.; Georg, G. I.; Schö, E. Acetyl-Lysine Binding Site of Bromodomain-Containing Protein 4 (BRD4) Interacts with Diverse Kinase Inhibitors Terms of Use. *ACS Chem. Biol* **2014**, *9*, 33.
 35. Yang, S. M.; Urban, D. J.; Yoshioka, M.; Strovel, J. W.; Fletcher, S.; Wang, A. Q.; Xu, X.; Shah, P.; Hu,

- X.; Hall, M. D.; Jadhav, A.; Maloney, D. J. Discovery and Lead Identification of Quinazoline-Based BRD4 Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3483–3488.
36. Fabian, M. A.; Biggs, W. H.; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Galvin, M.; Gerlach, J. L.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Insko, M. A.; Lai, A. G.; Lélías, J. M.; Mehta, S. A.; Milanov, Z. V.; Velasco, A. M.; Wodicka, L. M.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. A Small Molecule-Kinase Interaction Map for Clinical Kinase Inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 329–336.
37. 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.
38. Yao, W.; Yue, P.; Khuri, F. R.; Sun, S. Y. The BET Bromodomain Inhibitor, JQ1, Facilitates c-FLIP Degradation and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis Independent of BRD4 and c-Myc Inhibition. *Oncotarget* **2015**, *6*, 34669–34679.
39. Shi, L.; Xiong, Y.; Hu, X.; Wang, Z.; Xie, C. Brd4 Inhibition Promotes Trail-Induced Apoptosis by Suppressing the Transcriptional Activity of Nf-Kb in Nscl. *Int. J. Med. Sci.* **2021**, *18*, 3090–3096.
40. Sui, S.; Zhang, J.; Xu, S.; Wang, Q.; Wang, P.; Pang, D. Ferritinophagy Is Required for the Induction of Ferroptosis by the Bromodomain Protein BRD4 Inhibitor (+)-JQ1 in Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*.
41. Wu, T.; Kamikawa, Y. F.; Donohoe, M. E. Brd4's Bromodomains Mediate Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Pluripotent Cells through P300 and Brg1. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1756–1771.
42. Roe, J. S.; Mercan, F.; Rivera, K.; Pappin, D. J.; Vakoc, C. R. BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 1028–1039.
43. Brand, M.; Clayton, J.; Moroglu, M.; Schiedel, M.; Picaud, S.; Bluck, J. P.; Skwarska, A.; Bolland, H.; Chan, A. K. N.; Laurin, C. M. C.; Scorah, A. R.; See, L.; Rooney, T. P. C.; Andrews, K. H.; Fedorov, O.; Perell, G.; Kalra, P.; Vinh, K. B.; Cortopassi, W. A.; Heitel, P.; Christensen, K. E.; Cooper, R. I.; Paton, R. S.; Pomerantz, W. C. K.; Biggin, P. C.; Hammond, E. M.; Filippakopoulos, P.; Conway, S. J. Controlling Intramolecular Interactions in the Design of Selective, High-Affinity Ligands for the CREBBP Bromodomain. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 10102–10123.
44. Lasko, L. M.; Jakob, C. G.; Edalji, R. P.; Qiu, W.; Montgomery, D.; Digiammarino, E. L.; Hansen, T. M.; Risi, R. M.; Frey, R.; Manaves, V.; Shaw, B.; Algire, M.; Hessler, P.; Lam, L. T.; Uziel, T.; Faivre, E.; Ferguson, D.; Buchanan, F. G.; Martin, R. L.; Torrent, M.; Chiang, G. G.; Karukurichi, K.; Langston, J. W.; Weinert, B. T.; Choudhary, C.; De Vries, P.; Van Drie, J. H.; McElligott, D.; Kesicki, E.; Marmorstein, R.; Sun, C.; Cole, P. A.; Rosenberg, S. H.; Michaelides, M. R.; Lai, A.; Bromberg, K. D. Discovery of a Selective Catalytic P300/CBP Inhibitor That Targets Lineage-Specific Tumours. *Nature* **2017**, *550*, 128–132.
45. Mastracchio, A.; Lai, C.; Digiammarino, E.; Ready, D. B.; Lasko, L. M.; Bromberg, K. D.; McClellan, W.

- J.; Montgomery, D.; Manaves, V.; Shaw, B.; Algire, M.; Patterson, M. J.; Sun, C. C.; Rosenberg, S.; Lai, A.; Michaelides, M. R. Discovery of a Potent and Selective Covalent P300/CBP Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 726–731.
46. Welti, J.; Sharp, A.; Brooks, N.; Yuan, W.; McNair, C.; Chand, S. N.; Pal, A.; Figueiredo, I.; Riisnaes, R.; Gurel, B.; Rekowski, J.; Bogdan, D.; West, W.; Young, B.; Raja, M.; Prosser, A.; Lane, J.; Thomson, S.; Worthington, J.; Onions, S.; Shannon, J.; Paoletta, S.; Brown, R.; Smyth, D.; Harbottle, G. W.; Gil, V. S.; Miranda, S.; Crespo, M.; Ferreira, A.; Pereira, R.; Tunariu, N.; Carreira, S.; Neeb, A. J.; Ning, J.; Swain, A.; Taddei, D.; Schiewer, M. J.; Knudsen, K. E.; Pegg, N.; de Bono, J. S. Targeting the P300/Cbp Axis in Lethal Prostate Cancer. *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 1118–1137.
47. Ogiwara, H.; Sasaki, M.; Mitachi, T.; Oike, T.; Higuchi, S.; Tominaga, Y.; Kohno, T. Targeting P300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death Due to Abrogation of MYC Expression. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 430–445.
48. Kruse, J. P.; Gu, W. Modes of P53 Regulation. *Cell* **2009**, *137*, 609–622.
49. Brooks, C. L.; Gu, W. The Impact of Acetylation and Deacetylation on the P53 Pathway. *Protein Cell* **2011**, *2*, 456–462.
50. Huang, B.; Yang, X.-D.; Zhou, M.-M.; Ozato, K.; Chen, L.-F. Brd4 Coactivates Transcriptional Activation of NF-KB via Specific Binding to Acetylated RelA. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 1375–1387.
51. Kaneshita, S.; Kida, T.; Yoshioka, M.; Nishioka, K.; Raje, M.; Sakashita, A.; Hirano, A.; Sagawa, T.; Kasahara, A.; Inoue, T.; Fujioka, K.; Nagahara, H.; Wada, M.; Kohno, M.; Strovel, J. W.; Fletcher, S.; Ashihara, E.; Kawahito, Y. CG223, a Novel BET Inhibitor, Exerts TGF-B1-Mediated Antifibrotic Effects in a Murine Model of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2021**, *70*, 102057.
52. Bowers, E. M.; Yan, G.; Mukherjee, C.; Orry, A.; Wang, L.; Holbert, M. A.; Crump, N. T.; Hazzalin, C. A.; Liszczak, G.; Yuan, H.; Larocca, C.; Saldanha, S. A.; Abagyan, R.; Sun, Y.; Meyers, D. J.; Marmorstein, R.; Mahadevan, L. C.; Alani, R. M.; Cole, P. A. Virtual Ligand Screening of the P300/CBP Histone Acetyltransferase: Identification of a Selective Small Molecule Inhibitor. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 471–482.
53. Raisner, R.; Kharbanda, S.; Jin, L.; Jeng, E.; Chan, E.; Merchant, M.; Haverty, P. M.; Bainer, R.; Cheung, T.; Arnott, D.; Flynn, E. M.; Romero, F. A.; Magnuson, S.; Gascoigne, K. E. Enhancer Activity Requires CBP/P300 Bromodomain-Dependent Histone H3K27 Acetylation. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 1722–1729.
54. Yan, Y.; Ma, J.; Wang, D.; Lin, D.; Pang, X.; Wang, S.; Zhao, Y.; Shi, L.; Xue, H.; Pan, Y.; Zhang, J.; Wahlestedt, C.; Giles, F. J.; Chen, Y.; Gleave, M. E.; Collins, C. C.; Ye, D.; Wang, Y.; Huang, H. The Novel BET-CBP/P300 Dual Inhibitor NEO2734 Is Active in SPOP Mutant and Wild-type Prostate Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*, 1–19.
55. Spriano, F.; Gaudio, E.; Cascione, L.; Tarantelli, C.; Melle, F.; Motta, G.; Priebe, V.; Rinaldi, A.; Golino, G.; Mensah, A. A.; Aresu, L.; Zucca, E.; Pileri, S.; Witcher, M.; Brown, B.; Wahlestedt, C.; Giles, F.; Stathis, A.; Bertoni, F. Antitumor Activity of the Dual BET and CBP/EP300 Inhibitor NEO2734. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 4124–4135.
56. Ryan, K. R.; Giles, F.; Morgan, G. J. Targeting Both BET and CBP/EP300 Proteins with the Novel Dual

- Inhibitors NEO2734 and NEO1132 Leads to Anti-Tumor Activity in Multiple Myeloma. *Eur. J. Haematol.* **2021**, *106*, 90–99.
57. Hutchinson, L.; Kirk, R. High Drug Attrition Rates—Where Are We Going Wrong? **2011**.
 58. 日本医療研究開発機構 (AMED). Patient-Derived Xenograft (PDX) モデルの利活用に向けた 課題整理に関する調査研究 調査報告書. **2020**.
 59. Rosfjord, E.; Lucas, J.; Li, G.; Gerber, H. P. Advances in Patient-Derived Tumor Xenografts: From Target Identification to Predicting Clinical Response Rates in Oncology. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *91*, 135–143.
 60. Gao, H.; Korn, J. M.; Ferretti, S.; Monahan, J. E.; Wang, Y.; Singh, M.; Zhang, C.; Schnell, C.; Yang, G.; Zhang, Y.; Balbin, O. A.; Barbe, S.; Cai, H.; Casey, F.; Chatterjee, S.; Chiang, D. Y.; Chuai, S.; Cogan, S. M.; Collins, S. D.; Dammasa, E.; Ebel, N.; Embry, M.; Green, J.; Kauffmann, A.; Kowal, C.; Leary, R. J.; Lehar, J.; Liang, Y.; Loo, A.; Lorenzana, E.; Robert McDonald, E.; McLaughlin, M. E.; Merkin, J.; Meyer, R.; Naylor, T. L.; Patawaran, M.; Reddy, A.; Röelli, C.; Ruddy, D. A.; Salangsang, F.; Santacrose, F.; Singh, A. P.; Tang, Y.; Tinetto, W.; Tobler, S.; Velazquez, R.; Venkatesan, K.; Von Arx, F.; Wang, H. Q.; Wang, Z.; Wiesmann, M.; Wyss, D.; Xu, F.; Bitter, H.; Atadja, P.; Lees, E.; Hofmann, F.; Li, E.; Keen, N.; Cozens, R.; Jensen, M. R.; Pryer, N. K.; Williams, J. A.; Sellers, W. R. High-Throughput Screening Using Patient-Derived Tumor Xenografts to Predict Clinical Trial Drug Response. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1318–1325.
 61. Ono, A.; Hattori, S.; Kariya, R.; Iwanaga, S.; Taura, M.; Harada, H.; Suzu, S.; Okada, S. Comparative Study of Human Hematopoietic Cell Engraftment into Balb/c and C57BL/6 Strain of Rag-2/Jak3 Double-Deficient Mice. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*.
 62. Workman, P.; Aboagye, E. O.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Bruder, G.; Chaplin, D. J.; Double, J. A.; Everitt, J.; Farningham, D. A. H.; Glennie, M. J.; Kelland, L. R.; Robinson, V.; Stratford, I. J.; Tozer, G. M.; Watson, S.; Wedge, S. R.; Eccles, S. A.; Navaratnam, V.; Ryder, S. Guidelines for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research. *British Journal of Cancer.* 2010, pp 1555–1577.
 63. Yang, S. M.; Yoshioka, M.; Strovel, J. W.; Urban, D. J.; Hu, X.; Hall, M. D.; Jadhav, A.; Maloney, D. J. Lead Optimization and Efficacy Evaluation of Quinazoline-Based BET Family Inhibitors for Potential Treatment of Cancer and Inflammatory Diseases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1220–1226.
 64. Jermakowicz, A. M.; Rybin, M. J.; Suter, R. K.; Sarkaria, J. N.; Zeier, Z.; Feng, Y.; Ayad, N. G. The Novel BET Inhibitor UM-002 Reduces Glioblastoma Cell Proliferation and Invasion. *Sci. Reports /* **123AD**, *11*, 23370.
 65. Sitaresmi, M. N.; Mostert, S.; Purwanto, I.; Gundy, C. M.; Sutaryo; Veerman, A. J. P. Chemotherapy-Related Side Effects in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Indonesia: Parental Perceptions. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* **2009**, *26*, 198–207.
 66. Masubuchi, N.; May, R. D.; Atsumi, R. A Predictive Model of Human Myelotoxicity Using Five Camptothecin Derivatives and the In Vitro Colony-Forming Unit Granulocyte/Macrophage Assay. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6722–6731.

67. Fu, L. L.; Tian, M.; Li, X.; Li, J. J.; Huang, J.; Ouyang, L.; Zhang, Y.; Liu, B. Inhibition of BET Bromodomains as a Therapeutic Strategy for Cancer Drug Discovery. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5501–5516.

Supplementary information

マルチブ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

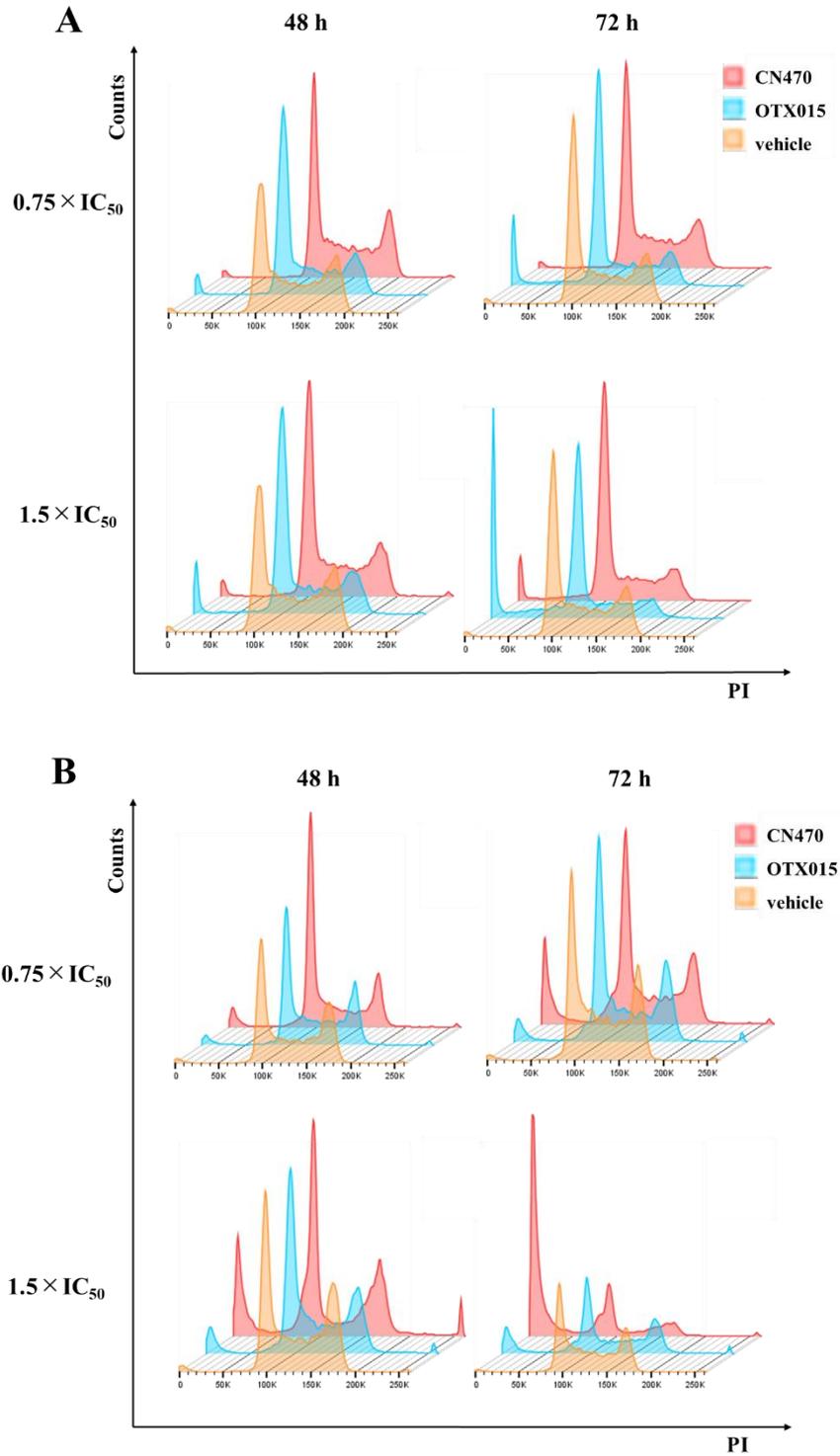
小児急性リンパ芽球性白血病治療に関する基礎検討

2022 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

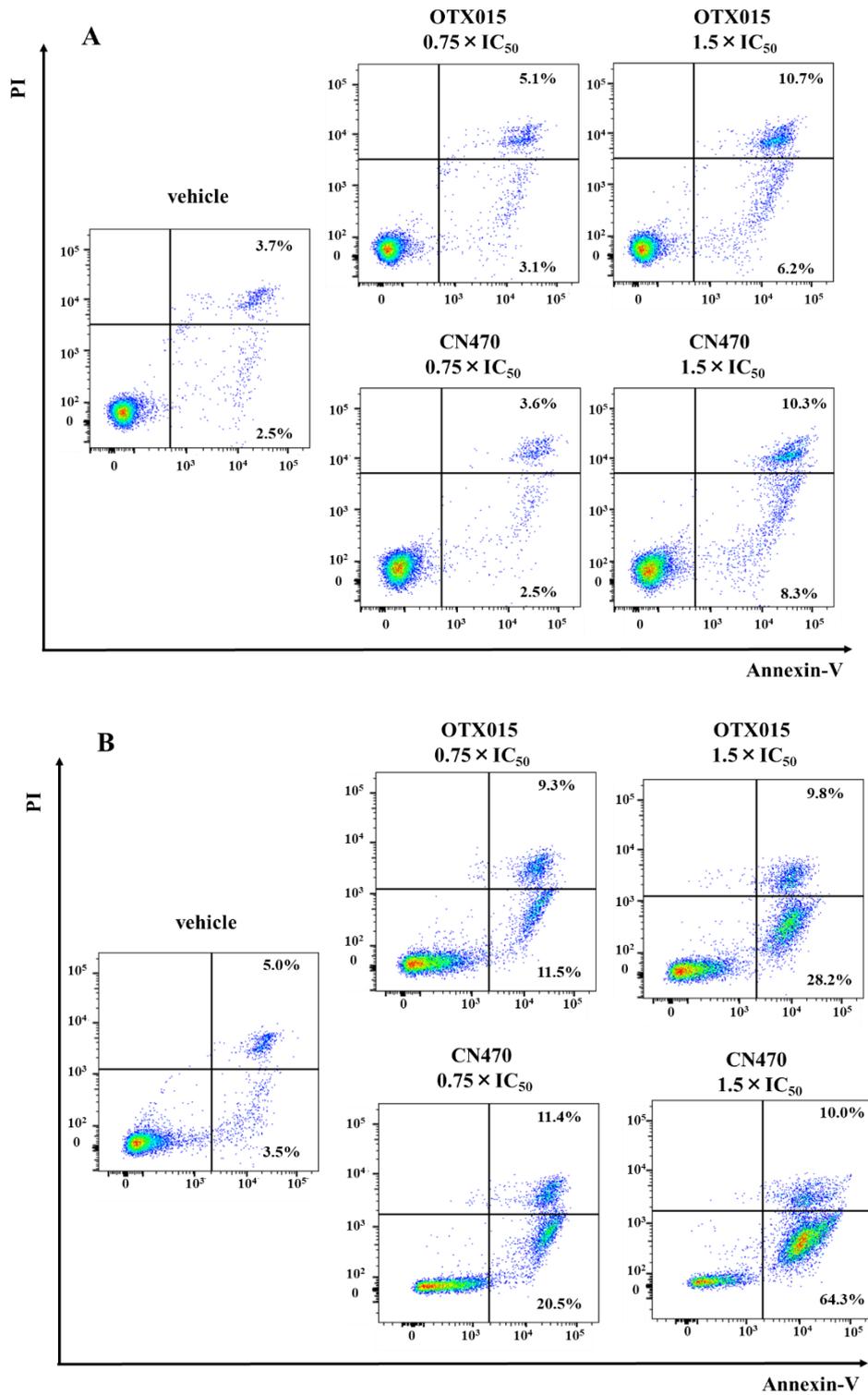
今吉 菜月



Supplementary Figure 1. 細胞周期解析

SEM 細胞 (A) および KOPN-1 細胞 (B) における細胞周期解析のヒストグラムを示す。いずれのヒストグラムも、3 回の検討の代表的な結果を示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. S1D) 一部改変



Supplementary Figure 2. アポトーシス解析

SEM 細胞 (A) および KOPN-1 細胞 (B) におけるアポトーシス解析の dot plot を示す。いずれの dot plot も、3 回の検討の代表的な結果を示した。

Imayoshi, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2022**, 590, 49-54. (Fig. S1E) 一部改変