

表題：T 細胞性急性リンパ性白血病に対する bortezomib の有効性に関する前臨床研究

論文区分：論文博士

著者名：小山 大輔

所属：福島県立宮下病院 内科 医長  
自治医科大学 分子病態治療研究センター  
幹細胞制御研究部 客員研究員  
2014 年 4 月 18 日申請の学位論文

紹介教員：地域医療学専攻 造血発生学  
古川 雄祐教授

## 目 次

1. はじめに .....	3
2. 研究方法 .....	7
3. 結果 .....	15
4. 考察 .....	30
5. 参考文献 .....	35

## はじめに

T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia; T-ALL) は T リンパ球由来の高悪性度な造血器悪性腫瘍の一つで、ALL 全体に占める割合は、小児例では 15%、成人例では 25%である。近年、集学的化学療法の進歩により、治療成績は改善しつつあるが、特に初回完解導入療法不応例や再発例では未だに予後不良である<sup>1)</sup>。現在、T-ALL に対して有効な新規分子標的治療薬に乏しいことから、T-ALL の新しい治療戦略を開発していくことは急務であると考えられる。

Notch1 は T-ALL 症例の 50%以上で活性型変異が報告されること<sup>2-4)</sup>やマウスにおいて正常な造血幹細胞に Notch1 を強発現させると T-ALL を発症すること<sup>5)</sup>から、T-ALL の病態生理において最も重要な分子の一つであると考えられている。また Notch1 はステロイド剤を初めとする多くの抗がん剤の薬剤感受性にも影響することが示されている<sup>6), 7)</sup>。特に T-ALL においてはステロイド感受性と Notch1 の発現量は逆相関することが報告されている<sup>8)</sup>。小児 ALL においてステロイド感受性が良好な患者群は反応性が不良な群に比し、完解導入率 (87% vs 70%)、8 年全生存率 (33% vs 17%)、8 年無再発生存率 (32% vs 22%) が良好であることが報告されている<sup>9)</sup>。

Notch1 受容体は Notch 受容体ファミリーの一員である。Notch 受容体ファミリーには 4 種類の受容体 (Notch1-4)、5 種類のリガンド (Delta1,3,4, Jagged 1,2) が存在する<sup>10), 11)</sup>。Notch1 受容体は細胞外ドメイン (Extracellular domain; ECD) と細胞内ドメイン (Intracellular domain of Notch1; NICD) から構成され、HD ドメイン (Heterodimerization domain; HD) により連結されている。Notch1 受容体にリガンドが結合すると、最終的には  $\gamma$ -secretase で切断され、Notch1 の活性型である NICD が遊離し、それが核内に移行していくことで下流の細胞周期、細胞分化、そしてアポトーシス関連遺伝子の転写を制御している<sup>11), 12)</sup> (図 1)。T-ALL において Notch1 の変異は、NICD の分解に関わる C 末端の proline/glutamic acid/serine/threonine-rich (PEST) ドメインあるいは HD のいずれか、あるいは両方で生じ、NICD の安定化あるいはリガンド

非依存性に NICD の遊離を促進することによって恒常的な Notch シグナルの活性化を引き起こす<sup>2), 11), 12)</sup> (図 2)。

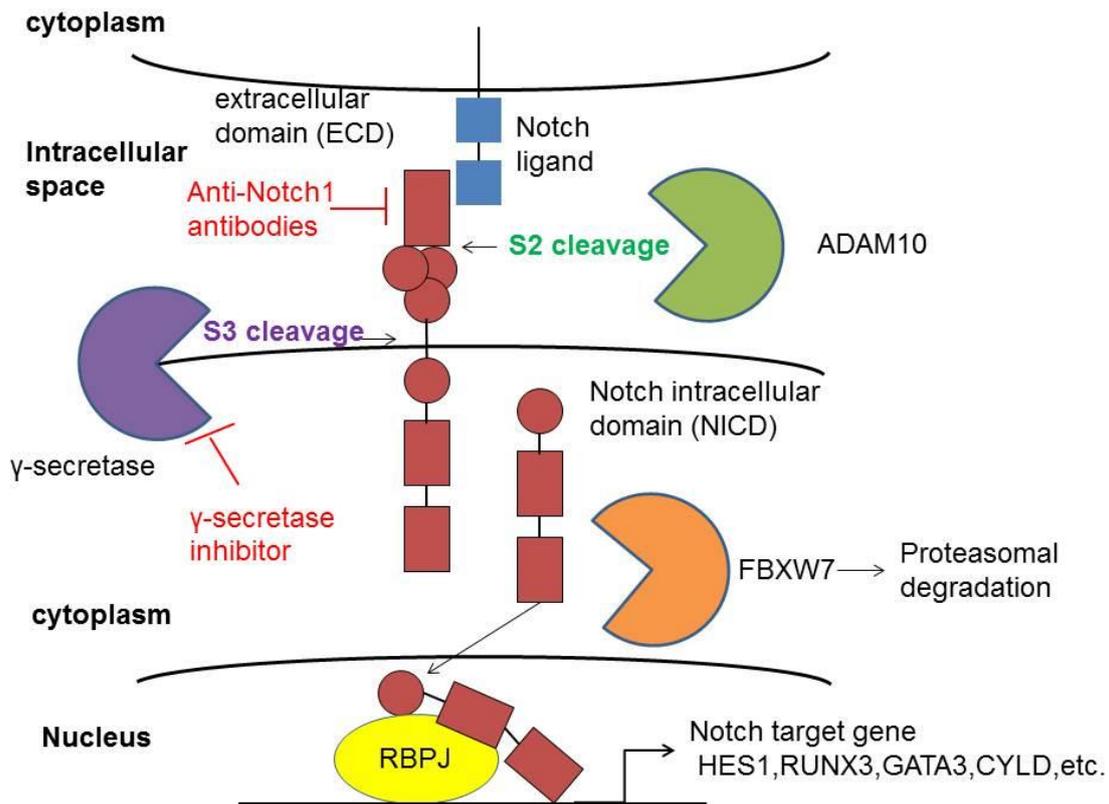


図 1. Notch シグナル

(Van Vlierberghe P1, Ferrando A. *J Clin Invest.* 122 : 3398-3406. 2012 を参考に作成)

Notch1 の細胞外ドメインにリガンドが結合し、複数のプロテアーゼにより切断されると、Notch1 の活性型である NICD が遊離し、核内に移行する。NICD は核内で RBPJ などのエフェクター分子と結合し、HES1 を始めとする標的遺伝子のプロモーター領域に結合、転写を活性化する。NICD は PEST ドメインを有し、その Serine/Threonine がリン酸化されると FBXW7 によりユビキチンが付加され、プロテアソーム依存性に分解される。

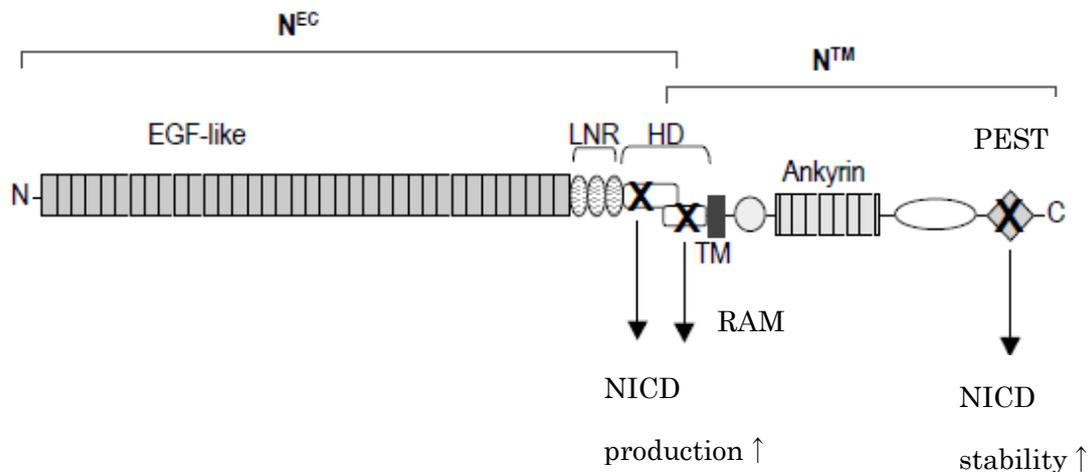


図 2. Notch1 受容体の構造と HD、PEST ドメインの変異 (文献 2 より引用改変)

Notch 受容体の細胞外領域は epidermal growth factor-like repeat (EGFR)、LIN12/Notch repeat (LNR)、HD ドメインにより構成されている。EGFR はリガンドの結合、LNR と HD はリガンド非依存性の Notch 受容体活性化を抑制する機能を担っている。細胞内領域にはタンパクの相互作用に参与する RAM ドメインと ankyrin repeat (ANK)、PEST ドメインが存在する。HD ドメインに変異 (×で示す) が生じると NICD 産生が亢進し、PEST ドメインに変異が生じると NICD の安定性が増す。

これらの知見に基づき、 $\gamma$ -secretase 阻害剤が NICD の遊離を阻害し、Notch シグナルを抑制することで T-ALL に対し治療効果を発揮すると期待された<sup>13)-15)</sup>。しかしながらほとんどの T-ALL 細胞株、特に HD に変異を有する細胞株では、 $\gamma$ -secretase 阻害剤に抵抗を示した<sup>16)</sup>。また、様々な悪性腫瘍を対象とした  $\gamma$ -secretase の第 I 相試験では、有効性は低く、かつ消化管毒性が容量制限毒性として報告された<sup>17), 18)</sup>。また、Notch1 受容体の特異的阻害抗体も開発されているが、特に Notch1 受容体に変異がある症例に対しての治療効果は限定的である<sup>19), 20), 21)</sup>。以上より、現時点では Notch シグナルを制御できる有効かつ安全な治療薬は存在せず、新たな分子標的治療薬の開発が必要であると考えられている。

プロテアソーム阻害剤、特に世界で初めて臨床応用された bortezomib は、現

在、多発性骨髄腫 (multiple myeloma ; MM) の治療に広く使用されており、その有効性、安全性、また多剤併用化学療法における耐用性は実臨床で十分に検証されてきている<sup>22)</sup>。最近では MM に対する bortezomib の皮下注射が適応となった。静脈注射と比較して、奏効率は非劣性でかつ末梢神経障害などの有害事象は有意に減少し、より安全に使用できるようになった<sup>23)</sup>。このため適応範囲は拡大の方向にあり、例えば、難治性の小児 B-ALL 症例に対し、bortezomib を従来の化学療法と組み合わせたプロトコールによる臨床試験が行われている。結果は 70%を超える高い寛解率で、有害事象に関しても最も懸念される末梢神経障害も grade 3 以上は 9%にとどまり、小児例に対しても、有効性、安全性の両面から期待の持てる結果となっている<sup>24)</sup>。

MM において bortezomib は nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) や histone deacetylases (HDACs) を標的分子とすることが知られている<sup>25), 26)</sup>。いずれの分子も T-ALL においても治療標的となりうることが知られている<sup>27)-30)</sup>。T-ALL 細胞株に対する bortezomib の有効性を検討した報告はあるが<sup>31)</sup>、作用機序に関する詳細な研究は行われていない。そこで我々は T-ALL に対する新規分子標的治療薬の候補として bortezomib に着目し、その作用機序の解明を試みた。

## 研究方法

### 細胞株

T-ALL 細胞株として、Jurkat, MOLT4, CEM, KOPT-K1 (山梨大学小児科・犬飼岳史博士より分与) の 4 つを主に使用した。その他の造血器悪性腫瘍の細胞株として以下を使用した (由来を括弧内に示す): KMS12-BM、U266、RPMI8226 (MM)、KOPM30 (B-ALL)、HBL-2 (mantle cell lymphoma; MCL)、Namalwa (Burkitt lymphoma; BL)、HL-60、K562 (acute myeloid leukemia; AML) (Health Science Research Resources Bank より購入)。すべての細胞株はウシ胎仔血清 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を 10% 添加した RPMI1640 (Sigma-Aldrich) 培地を用い、CO<sub>2</sub> 5%、37°C の条件下で培養した。RPMI1640 培地は、D-glucose 濃度が 2,000 mg/L, L-asparagine 濃度が 50 mg/L, L-glutamine 濃度が 300 mg/L であり、血液細胞の培養に最適な組成となっている。細胞培養は、1 x 10<sup>5</sup> cells/ml で開始し、1 x 10<sup>6</sup> cells/ml まで増殖した時点で再度 1 x 10<sup>5</sup> cells/ml に希釈し継代した。

### 薬剤

本研究で使用した薬剤と入手先 (括弧内) は次のとおりである。Bortezomib、MLN120B (Millennium Pharmaceuticals)、K-7174 (Kowa)、doxorubicin (ADM)(Meiji)、vincristine (VCR)(Shionogi)、mithramycin、dexamethasone (DEX) (Sigma-Aldrich)、cytosine arabinoside (Ara-C)、and 4-hydroxycyclophosphamide (4-OHCY) (Wako Biochemicals)。いずれの薬剤も dimethyl sulfoxide で溶解し、1/1000 以下に希釈して使用した。

### 細胞増殖分析

細胞を 1 x 10<sup>5</sup> cells/ml の濃度になるように RPMI1640 培地で希釈し、96 ウェルプレートに 100µl ずつ播種した。そこに目的の薬剤を、適切な濃度になるように加えた。CO<sub>2</sub> 5%、37°C の条件下で 72 時間培養後、各ウェルに 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetra

zolium, monosodium salt (WST-8) を 10 $\mu$ l ずつ加え、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) により、450 nm の吸光度を測定した。WST-8 は生細胞によって還元され、水溶性のホルマザン (吸光度 450 nm) を生成するため OD<sub>450</sub> は生細胞数に比例する。薬剤を加えていないウェルの吸光度を対照として相対値を計算して細胞の生存率とした。補正吸光度が細胞密度を反映することは、それぞれの細胞株において予備実験を施行し、直線性を確認している。

#### アポトーシス解析

細胞を phycoerythrin-conjugated annexin-V (annexin-V/PE) (Biovision, Mountain View, CA, USA) で染色し、BD LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) を使用して、annexin-V/PE 陽性細胞の割合を定量してアポトーシス陽性率とした。

#### 薬剤の併用効果

bortezomib と他の抗がん剤との併用効果を解析するために combination index (CI) を使用した<sup>32)</sup>。各薬剤の単剤での効果 X が得られる濃度、併用時に効果 X が得られる濃度を上述の細胞増殖分析により求め、図 3 に示す計算式に代入して CI を算出した。CI<1 は相乗作用 (synergism)、CI=1 は相加作用 (additive)、CI>1 は拮抗作用 (antagonism) と判定される。

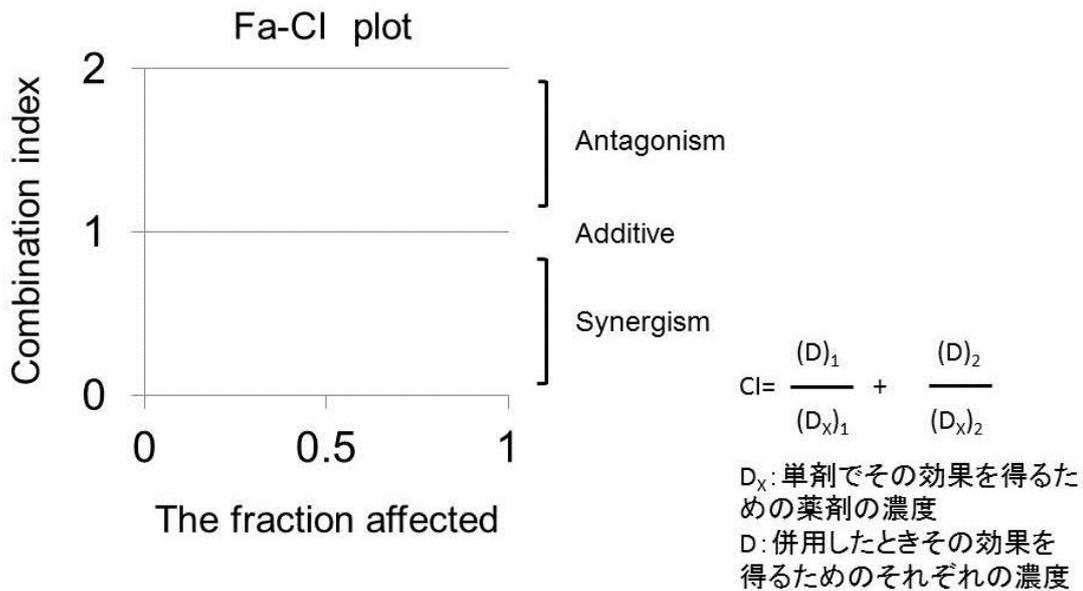


図 3. Combination index の算出、Fa-CI プロットの説明。

### リアルタイム RT-PCR

RNeasy Kit (QIAGEN) を使用して、 $1 \sim 5 \times 10^5$  個の細胞から total RNA を分離した。RNA 500 ng を oligo (dT) primers の存在下に ReverTra Ace (TOYOBO) で逆転写し (42°C 20 分、99°C 5 分、4°C 5 分)、目的の complementary DNA (cDNA) を得た。TaqMan Expression Assays (Notch1, HES1, CYLD, GATA3, RUNX3, RELA, NFkB1, and GAPDH) と TaqMan Fast Universal PCR Master Mix を用い、StepOne Plus (Applied Biosystems) でリアルタイム RT-PCR を行った。得られたデータは  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で評価した<sup>33)</sup>。

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  法: 目的遺伝子およびリファレンス遺伝子の増幅効率が限りなく 1 に近い場合、1 サイクルで 2 倍に増幅されると考えられる。本研究においては、GAPDH をリファレンス遺伝子 (内在性コントロール遺伝子) とした。例えば Notch1 遺伝子を N とすると、 $\Delta Ct_N = \text{GAPDH 遺伝子の Ct 値} - \text{Notch1 遺伝子の Ct 値}$  であり、 $n = 2^{\Delta Ct_N}$  で GAPDH 遺伝子に対する Notch1 遺伝子の相対的発現量が定量的に示される。

さらにサンプル間での遺伝子発現を比較するために、次の方法を用いた。例え

ば bortezomib 非投与サンプル a に対する bortezomib 投与サンプル b の Notch1 遺伝子発現量を示す場合には、 $\Delta \Delta Ct(b-a) = \Delta CtNb - \Delta CtNa$  として、 $Y = 2^{-\Delta \Delta Ct(a-b)}$  でその発現量の差をあらわす。すなわち、Notch1 遺伝子は bortezomib 非投与サンプルに比較して投与サンプルでは Y 倍発現しているということが出来る。この手法を用いて mRNA 発現量を比較した。

### ウエスタンブロット

5~10 x 10<sup>5</sup> 個の細胞からプロテアーゼ阻害剤を含んだ RIPA lysis buffer を用い、細胞タンパク質を単離した。タンパク質の量を、Bradford 変法を用いて定量し、サンプルあたり 30  $\mu$ g を、目的とするタンパク質の分子量に応じた濃度の SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、Immobilon-P (Millipore) に転写した。膜は 10% non-fat dry milk と 1% bovine albumin を含む Tris-buffered saline + 0.05% Tween-20 (TBS-T) でブロッキングした。1次抗体は添付文書を参考として室温で 1 時間、あるいは 4°C で 16 時間反応させた。Wash buffer には TBS-T を使用した。3 回洗浄後、horseradish peroxidase でラベルされた 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、ルミノール反応を利用した ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) にてシグナルを検出した。使用した抗体を以下に示す。

1 次抗体 : anti-Notch1、anti-cleaved Notch1、anti-KLF4、anti-p105/p50、anti-p100/p52、anti-p65、anti-c-Rel、anti-RelB、anti-IKK $\beta$ 、anti-phosphorylated IKK $\alpha/\beta$ 、anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (Cell Signaling Technology)、anti-HDAC1 (Sigma-Aldrich)、anti-Sp1、anti-histone H1 (mouse)、anti-MZF-1 (goat)、anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) (種を示していない抗体はすべて rabbit 由来)。

2 次抗体 : anti-rabbit donkey IgG (H+L)、HRP Conjugate、anti-mouse sheep IgG (H+L)、HRP Conjugate (GE Healthcare)、anti-goat donkey IgG (H+L)、HRP Conjugate (Santa Cruz Biotechnology)。

また、核タンパク質成分と細胞質タンパク質成分の分離は、1~3 x 10<sup>6</sup> 個の細

胞から nuclear extraction kit (Cayman Chemical) を使用して行った。

#### NF- $\kappa$ B 活性の測定

NF- $\kappa$ B の canonical pathway 構成成分である p65 と p50 の DNA 結合活性を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法に基づく NF- $\kappa$ B Transcription Factor Assay Kit (Cayman Chemical) にて測定した<sup>34)</sup>。NF- $\kappa$ B の結合コンセンサス配列 (下線) を含むオリゴヌクレオチド (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') を固相化したプレートにサンプルを加え、洗浄後、1次抗体として anti-p65 抗体ないしは anti-p50 抗体を添加した。結合した p65 および p50 を horseradish peroxidase でラベルされた 2次抗体にて検出した。本法で得られるデータとゲル・シフト法など従来の測定法との相関は開発者によって示されている<sup>34)</sup>。このキットでは p65/p65 のホモダイマーと p65/p50 のヘテロダイマーの区別、あるいは p50/p50 のホモダイマーと p65/p50 のヘテロダイマーの区別はできない。これらの活性は NF- $\kappa$ B 結合配列を含むオリゴヌクレオチドに結合した、p65、p50 のタンパク質量に対応する。

#### プロモーター解析

Notch1 遺伝子のプロモーター領域の配列 (-392~-1, -342~-1, -315~-1, -300~-1) は、正常 T リンパ球の genome DNA を鋳型とし、5'側に Kpn I、3'側に Nhe I の認識配列を付加して PCR で増幅 (熱変性 98°C 2分、98°C 10秒、68°C 30秒 30サイクル、72°C 7分、4°C  $\infty$ ) した。増幅産物を pGL4.17 firefly luciferase vector (Promega) の Kpn I、Nhe I サイト間に挿入した。プライマーの配列は表 1 に示す。完成したベクターを T-ALL 細胞株 CEM に、ポジティブ・コントロールである pGL4.73 Renilla luciferase vector (Promega) と共に Microporator MP-100 (Digital Bio) を使用してエレクトロポレーション法により導入した (Voltage 1230 V、Width 40 ms、Pulse Number 1)。48 時間後、firefly・Renilla luciferase 活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。まず、Luciferase Assay Reagent II (LAR II) を添加して firefly luciferase レポーター活性を測定し、同じチューブに Stop &

Glo® Reagent を添加してこの反応を消光させると同時に、*Renilla luciferase* レポーター活性を測定した。プロモーター配列の挿入されていない pGL4.17 firefly luciferase ベクターをネガティブ・コントロールとした。

#### クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降法は ChIP-IT Express Enzymatic (Active Motif) を使用して行った。まず細胞を1%ホルムアルデヒドで固定(室温、10分)し、Enzymatic Shearing Cocktail で37°C、10分間反応させ、断片化したクロマチンを得た。15000 rpm、4°Cで10分間遠心した後、得られた上清に protein G magnetic beads と anti-Sp1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 3µg ないし非特異的 IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) 3µg を混合し、4°Cで16時間反応させた。結合した DNA フラグメントを、磁石を用いて精製し、Notch1 プロモーター領域の Sp1 結合領域を含む-480~-342 を amplicon として、GC rich 領域でも増幅効率のよい Mighty Amp (Takara) を使用し、PCR (熱変性 98°C 2分、98°C 10秒、68°C 30秒 40 サイクル、72°C 7分、4°C ∞) を行い、増幅領域に結合した Sp1 量を半定量的に示した。使用したプライマーの配列を表 1 に示す。

表 1.プロモーター解析、クロマチン免疫沈降法に使用したプライマーの配列

#### プロモーター解析

---

Sense	-392	5'-GAGGTACCCTCGGGGAGGCGCAAAGGCGG-3'
	-342	5'-GAGGTACCAGGGGGCGGGGGACCGGCG-3'
	-315	5'-GAGGTACCGGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCG-3'
	-300	5'-GAGGTACCGGCCGGCGGGGGCGGAGCGCACC-3'
Antisense	-1	5'-GAGCTAGCGCCTCCCCACCGGCTGCCCTC-3'

---

## クロマチン免疫沈降法

-----  
Sense            -480 5'-AAGTAGTCCCAGGCGCCCGCTCCCG-3'  
Antisense        -342 5'-CCGCGGCCACCTCCTCCCGCAC-3'  
-----

## レンチウイルスによる T-ALL に対する NICD 強発現

Notch1 cDNA の NICD フラグメント(Val1754~)をコードする領域を、正常 T リンパ球の cDNA を鋳型として以下のプライマーを使用して PCR で増幅した。

Sense : 5'-TTCTCGAGCACCATGGTGCTGCTGTCCCGCAAGCG-3'

Anti-sense : 5'-AAGGATCCTTACTTGAAGGCTCCGGAATG-3'

PCR 産物をレンチウイルス発現ベクター CS II -CMV-MCS-IRES2-VENUS に挿入した。このベクター 10 $\mu$ g を packaging plasmid (Invitrogen) と共に 293FT 細胞 (Invitrogen) にトランスフェクションした。48 時間後に上清を回収、超遠心 (28,000 rpm、15 $^{\circ}$ C、2 時間) にてウイルス粒子を濃縮した後に目的の細胞に感染させた。感染から 24 時間後に、VENUS 陽性をフローサイトメトリーで確認し、stable transformant を得るために限界希釈して 96 ウェルプレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。増殖細胞を 48 ウェルプレート→24 ウェルプレート→12 ウェルプレート→6 ウェルプレートと段階的に播種した。このようにして得られたクローンの VENUS 発現をフローサイトメトリー、NICD 発現をウエスタンブロットで確認し、NICD が強発現されている stable transformant を得た。

## マウス異種移植実験

CS II -CMV-MCS-IRES2-VENUS ベクターに firefly luciferase cDNA (高崎健康福祉大学 村上孝博士より分与) を挿入し、上記のとおりレンチウイルス

を作成し、MOLT4細胞に感染させて stable transformant を得た (MOLT4-Luc)。

1 x 10<sup>7</sup> cells の MOLT4 あるいは MOLT4-Luc 細胞を、100μl の Iscove's modified Dulbecco's medium に懸濁し、100μl の Matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson) と混合、6週齢の nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウス (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) の皮下に移植した。3~5日間経過観察した後、vehicle 群、bortezomib 単剤群、DEX 単剤群、bortezomib + DEX 併用群の4群にマウスを振り分け、図4に示すスケジュールで治療を開始した。Day0、day7、day14、day21に腫瘍径を測定し、 $4/3 \pi \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$  の計算式により腫瘍量を算出した。また MOLT4-Luc を投与したマウスでは day14 に D-Luciferin (1.5 mg/body) を腹腔内投与し、IVIS Imaging System と Living Image software (Xenogen) を使用し、腫瘍の広がり进行评估した。

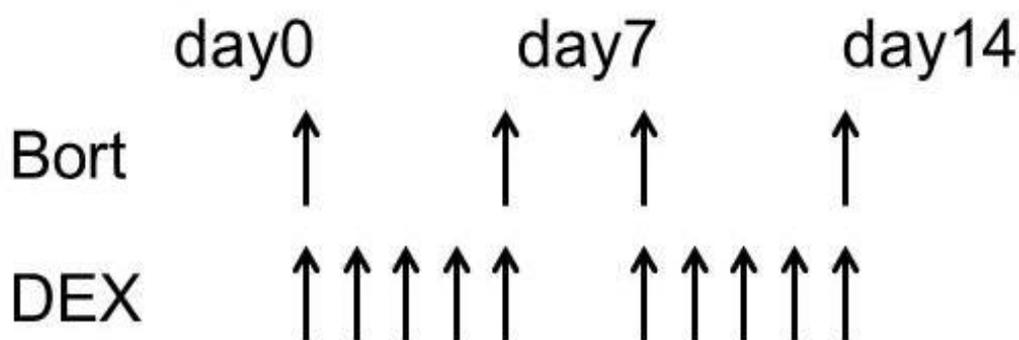
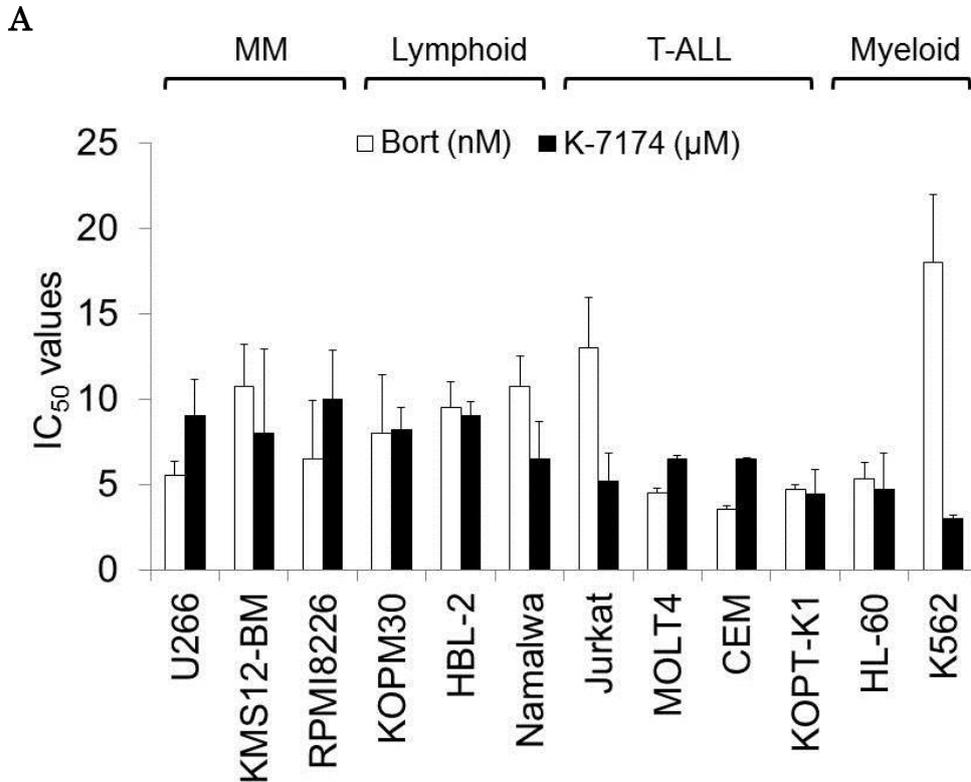


図4. NOD/SCID マウスに対する治療スケジュール

## 結果

プロテアソーム阻害剤は T-ALL 細胞株に対し、高い殺細胞効果を発揮する

まず、プロテアソーム阻害剤による種々の造血器悪性腫瘍細胞株に対する殺細胞効果を調べた。Cell Counting Kit を使用した細胞増殖分析により測定した  $IC_{50}$  と典型的な dose-response curve の例を示す (図 5A、B)。bortezomib の  $IC_{50}$  は Jurkat  $13.0 \pm 2.9$  nM、MOLT4  $4.5 \pm 0.24$  nM、CEM  $3.5 \pm 0.24$  nM、KOPT-K1  $4.7 \pm 0.29$  nM であり、Jurkat 以外の T-ALL 細胞株では、MM や MCL の細胞株と比較してもより高度な殺細胞効果を発揮することが明らかになった。さらに bortezomib と構造が異なるプロテアソーム阻害剤である K-7174<sup>35), 36)</sup> は、Jurkat を含めた T-ALL 細胞株に対して強い細胞傷害を引き起こすことが判明した。以上の結果より、プロテアソーム阻害剤が MM 同様、T-ALL の治療に有効である可能性が示された。



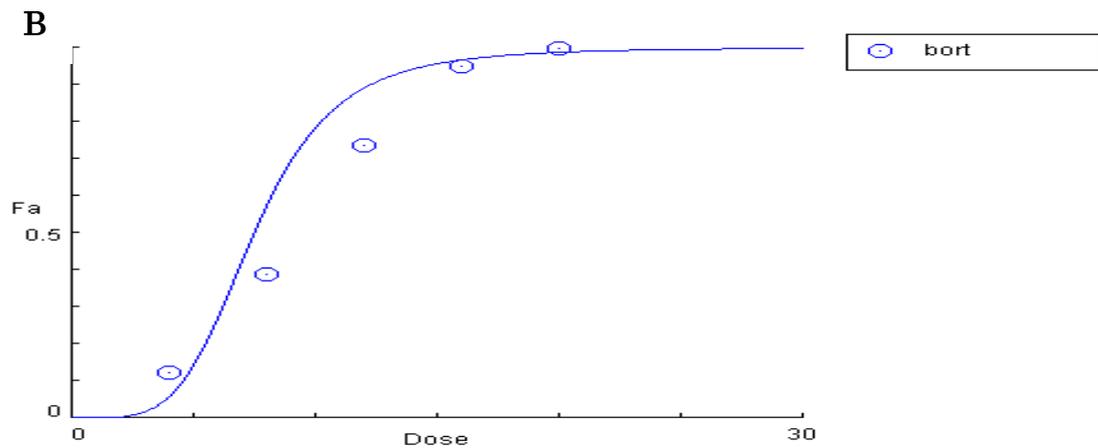


図 5. 種々の造血器悪性腫瘍細胞株に対するプロテアソーム阻害剤の IC<sub>50</sub> の比較

(A) U266、KMS12-BM、RPMI8226 (MM)、KOPM30 (ALL)、HBL-2 (MCL)、Namalwa (BL)、Jurkat、MOLT4、CEM、KOPT-K1(T-ALL)、HL-60、K562 (AML)の各細胞株に対し、独立した3回の実験を施行し、平均値+標準偏差(bar)を示した。(B) CompuSyn softwareで作成したU266に対するbortezomibのdose-response curveの例。IC<sub>50</sub>は自動的に算出される。

### Bortezomib は T-ALL 細胞の Notch1 タンパクの発現を低下させる

次に、プロテアソーム阻害剤の T-ALL 細胞に対する傷害作用の分子メカニズムの解明を試みた。bortezomib はすでに世界中で臨床使用され、有効性・安全性が十分検証されている薬剤である<sup>22)</sup>。このため、以降の実験は bortezomib を用いて行うことにした。T-ALL 細胞の bortezomib に対する高い感受性は、生存に重要な因子を抑制するためと考えられる。そこでまず Notch1 の発現の変化をウエスタンブロットで検証することにした。ALL の治療に一般的に用いられている抗がん剤である 4-OHCY、ADM、DEX、VCR、Ara-C と bortezomib を IC<sub>50</sub> で MOLT4 に作用させたところ、bortezomib によって full length Notch1 (FL)、transmembrane region (TM)、NICD 全ての発現が抑制されることが分かった。その他の抗がん剤では、DEX で同様の現象を認めたが、抑制の程度は bortezomib に比べて弱かった (図 6A)。4-OHCY では FL、TM の軽度の発現

低下がみられるが、NICD 発現には変化がなかった (図 6A)。bortezomib は Notch1 の発現を時間依存性かつ濃度依存性に抑制し、MOLT4 以外に Jurkat や CEM 細胞でも抑制が観察された(図 6B、C)。

bortezomib は MM において Sp1 の分解を介して HDAC1 の発現を抑制し、細胞死を誘導することが知られている<sup>26)</sup>。T-ALL において Sp1 は同様に発現が低下していたが、HDAC1 発現の抑制は見られなかった (図 6B、C)。

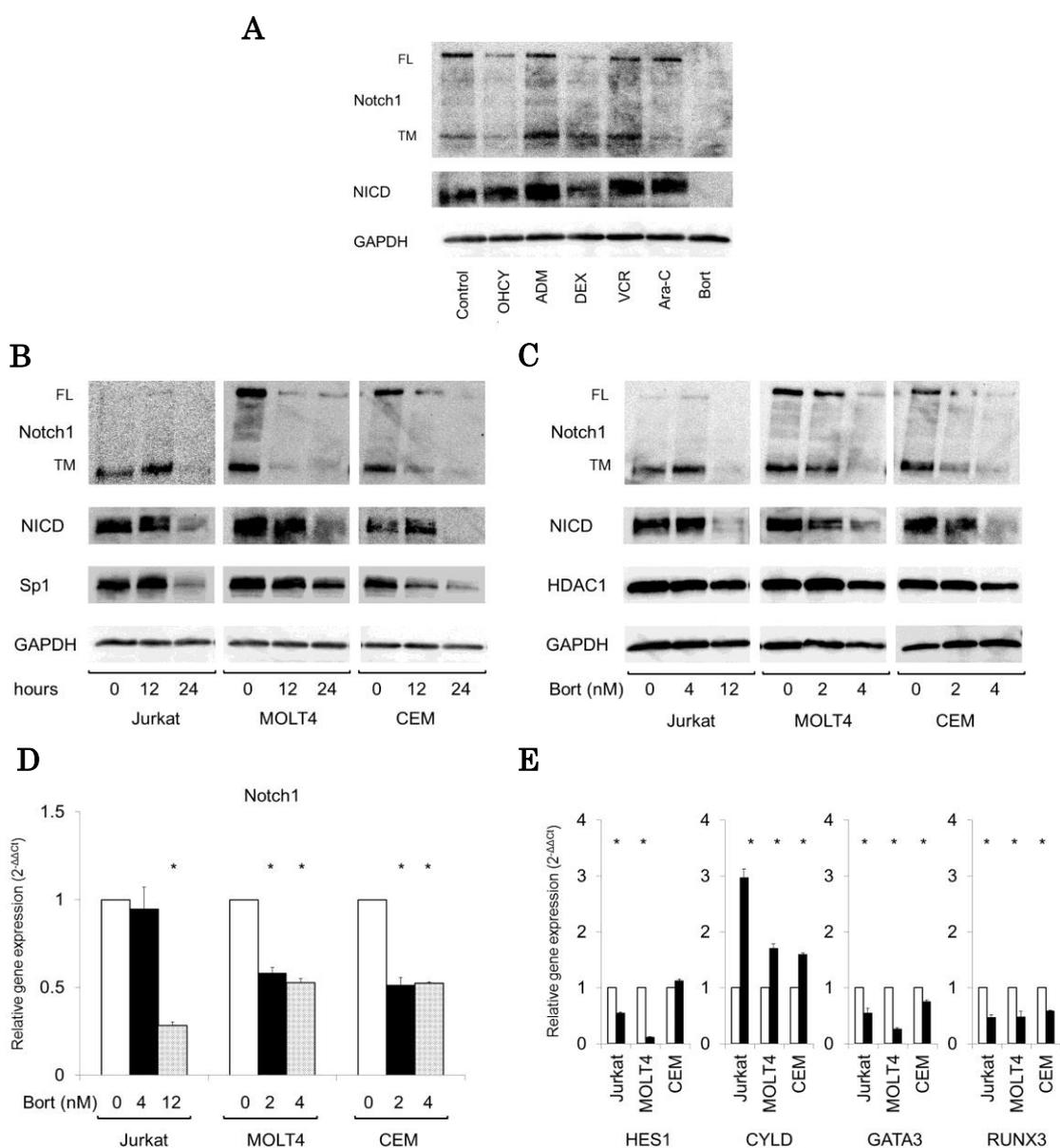


図 6. Bortezomib は Notch1 の発現を抑制し、下流のシグナルに影響を与える

(A) MOLT4 細胞に各種抗がん剤を IC<sub>50</sub> (1 μM 4-OHCY、15 nM ADM、150 nM DEX、1 nM VCR、5 nM Ara-C、4 nM bortezomib)で添加し、24 時間培養して細胞タンパク質を抽出した。サンプル当り 30 μg を電気泳動し、Notch1 と NICD に対する抗体でウエスタンブロットを行った。(B) 各 T-ALL 細胞株に IC<sub>50</sub> の bortezomib (Jurkat は 12nM、MOLT4 と CEM は 4nM) を加え、図中に示した時間に細胞タンパク質を抽出した。サンプル当り 30 μg を電気泳動し、Notch1, NICD, Sp1, GAPDH に対する抗体でウエスタンブロットを行った。(C) 各 T-ALL 細胞株を図中に示した濃度の bortezomib 投与下で培養し、24 時間後に細胞タンパク質を抽出した。サンプル当り 30 μg を電気泳動し、Notch1, NICD, HDAC1, GAPDH に対する抗体でウエスタンブロットを行った。(D)(E) (C)の実験の際に同時に RNA を抽出し cDNA を合成、リアルタイム RT-PCR で Notch 標的分子の発現を測定し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で定量的に評価した。\*p<0.05

#### Bortezomib は転写レベルで Notch1 の発現を低下させる

図 6A、B、C で FL の Notch1 自体の発現が低下していたため、T-ALL において、bortezomib による Notch1 mRNA の発現の変化を調べてみるために、リアルタイム RT-PCR を行った。すると予想通り、Notch1 mRNA の発現低下が認められた (図 6D)。さらに Notch1 標的分子である HES1<sup>27/37</sup>、GATA3<sup>38</sup>、また RUNX1 と PKC- $\theta$  の発現抑制を介して薬剤抵抗性に寄与している RUNX3<sup>39</sup> の発現の変化をリアルタイム RT-PCR で検証した。するとこれも予想通り、発現低下がみられた (図 6E)。CYLD は HES1 により発現が抑制されているが<sup>27</sup>、HES1 mRNA の発現低下に伴い、CYLD mRNA の発現が上昇していた (図 6E)。以上の結果より bortezomib は Notch1 の発現を転写レベルで低下させることが明らかになった。その下流の標的分子の mRNA 発現も Notch シグナルが抑制されていることに矛盾しない結果であったが、bortezomib の直接作用であることを否定するためには、NICD の強制発現によってキャンセルされるかどうかの検討が必要である。

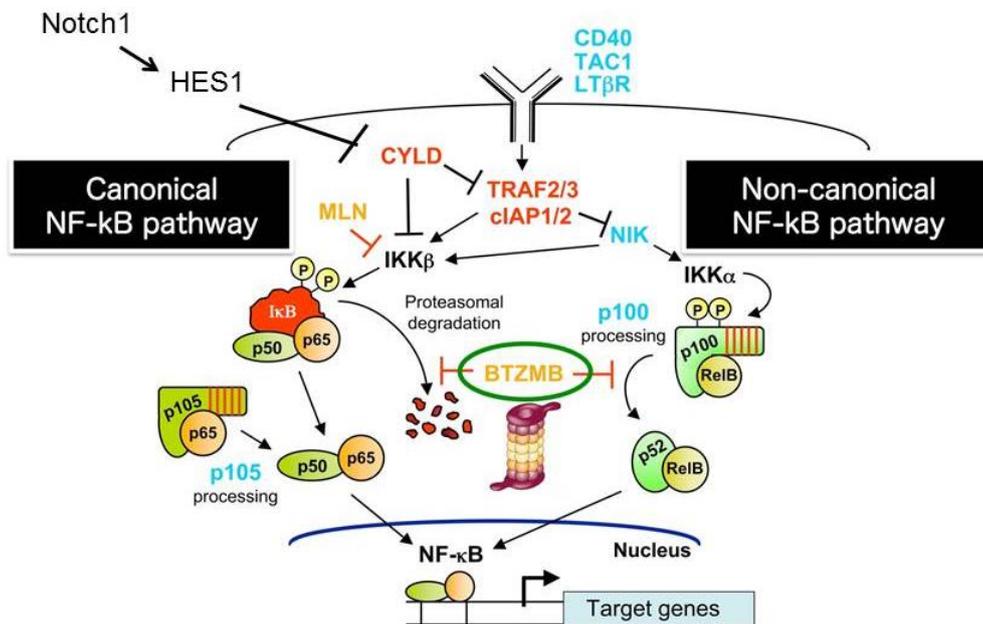


図 7. T-ALL における NF- $\kappa$ B シグナル

Canonical pathway と non-canonical pathway があり、T-ALL では主に canonical pathway を利用している。Notch1 の恒常的な活性化によって HES1 を介する CYLD の抑制が増強される。CYLD の抑制によって IKK $\beta$  複合体が活性化され、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化、プロテアソーム依存性分解を誘導する。その結果、p65/p50 複合体が核内に移行し、NF- $\kappa$ B エフェクター分子の転写が活性化される。

Bortezomib は p65 と p50 の発現を低下させることで canonical NF- $\kappa$ B 活性を抑制する

T-ALL においては、NICD によって誘導される HES1 が、NF- $\kappa$ B シグナルの抑制に働く脱ユビキチン化酵素 CYLD の発現を抑制、その結果、NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が誘導されると報告されている<sup>27), 28)</sup> (図 7)。そこで bortezomib による NICD 発現抑制が、この既存の pathway を介して NF- $\kappa$ B シグナルを抑制するかどうかを検証することにした。

NF- $\kappa$ B には canonical pathway と non-canonical pathway が存在する。それぞれ主として p105/p50、RelA (p65) と p100/p52、RelB で構成されており、

canonical pathway のエフェクターにはこれらに加えて c-Rel が存在する。まず T-ALL 細胞株から核タンパク質・細胞質タンパク質を分離し、ウエスタンブロットで NF- $\kappa$ B の canonical pathway・non-canonical pathway それぞれの構成因子の発現を確認した。すると p65・p50 は核・細胞質いずれにも発現が見られた。また c-Rel は細胞質のみに発現し、p52・RelB はいずれの分画にも発現が見られなかった。以上の結果から、T-ALL においては canonical pathway の活性化による p65/p50 複合体の核内移行が NF- $\kappa$ B 活性化の主体と考えられた (図 8A)。また MOLT4 においては p50 の発現が弱く、p65/p65 のホモダイマーが主体である可能性が考えられたが、これは以前の報告とも一致している<sup>40)</sup>。

次に bortezomib による NF- $\kappa$ B シグナルの各構成因子に対する影響を調べた。図 6E に示したように、bortezomib は NICD/HES1 の発現を抑制し、CYLD を脱抑制する。その結果、I $\kappa$ B $\alpha$  が安定化され、発現量が増加すると予想されたが、予想に反し I $\kappa$ B $\alpha$  の発現は低下した (図 8B、C)。この理由として、I $\kappa$ B $\alpha$  は NICD の直接の転写標的分子であるため<sup>41)</sup>、CYLD による安定化作用よりも NICD 低下による発現抑制が前面に出るためと考えられる。また MM においては、bortezomib が I $\kappa$ B キナーゼ  $\beta$  (IKK $\beta$ ) を活性化することが報告されているが、T-ALL においては活性化 (リン酸化) を誘導しないのみならず、その発現を低下させていた (図 8B、C)。この所見の裏付けとして、IKK $\beta$  阻害剤である MLN120B を使用した実験を行った。通常の T-ALL 細胞に対しては bortezomib 単剤でも IKK $\beta$  の発現を抑制してしまうため、bortezomib と MLN120B を併用した際の CI は 1 を超えてしまい、拮抗作用と判定されるが、NICD を強発現させ、bortezomib による IKK $\beta$  発現抑制をキャンセルさせると CI が 1 を下回り、MLN120B を上乗せした効果が見られるようになる (図 9)。一方、bortezomib を作用させると、p65・p50 いずれも時間依存性・濃度依存性に著明に発現が低下した (図 8B、C)。

リアルタイム PCR で mRNA の発現を確認すると、p50 mRNA は低下していたが、p65 mRNA は変化がなく、MOLT4 ではむしろ増加していた (図 10)。したがって p65 の抑制は、転写レベルではなく、NICD の発現低下を介する安定

性の低下が主因と考えられた<sup>31), 41)</sup>。ELISA法を用いて p65・p50 の DNA 結合活性を測定すると両者とも有意に低下していた (図 8D、E)。以上より、T-ALL において bortezomib は主に p65・p50 の発現を低下させることにより、NF- $\kappa$ B 活性を抑制することが明らかとなった。

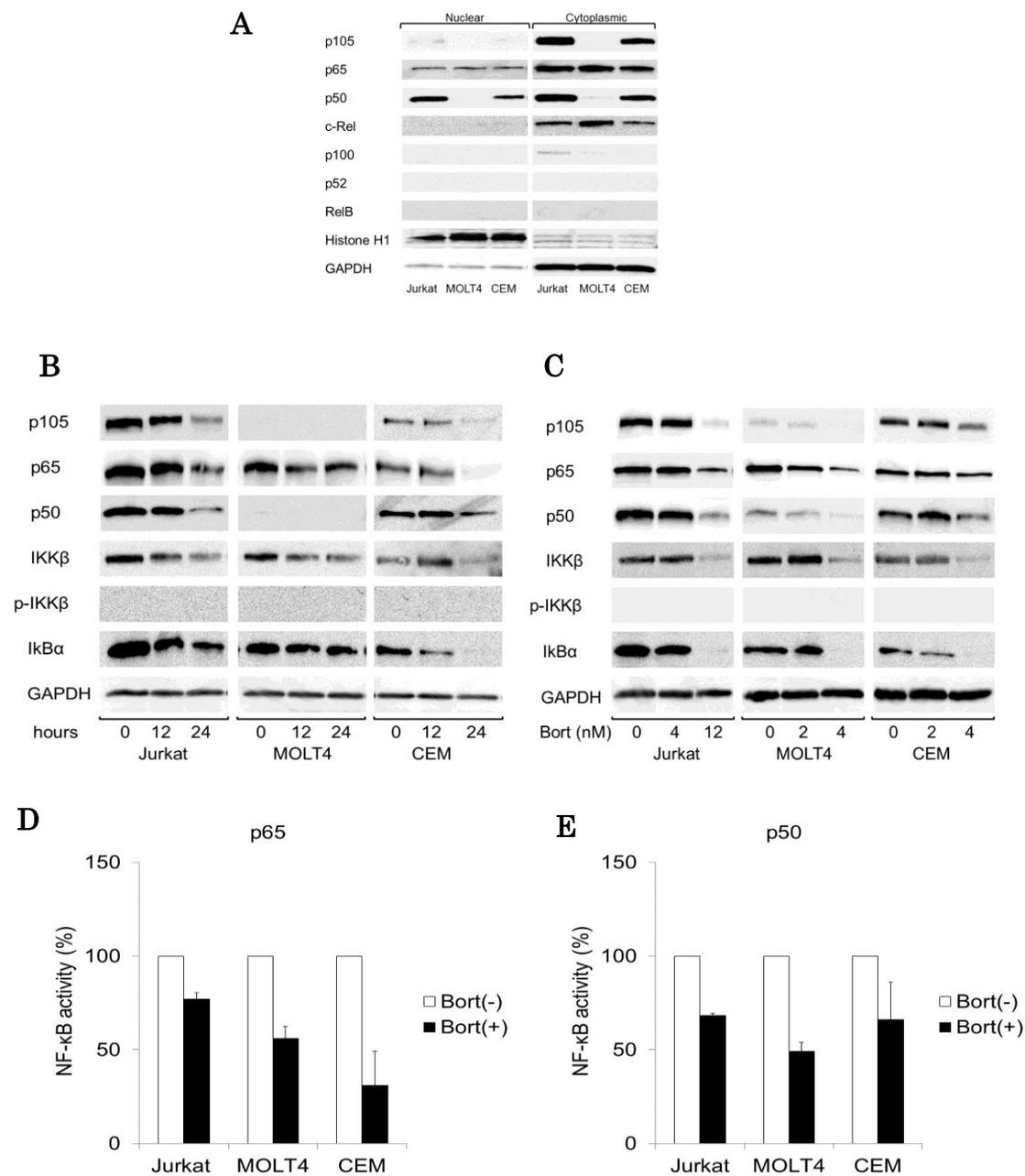


図 8. T-ALL における bortezomib による canonical NF- $\kappa$ B 活性の抑制

(A) T-ALL 細胞株を Nuclear extraction kit を用いて核タンパク質と細胞質タンパク質に分離し、NF- $\kappa$ B 経路に関わるタンパク質の発現を確認した。(B)(C) 図 5B、C と同様の条件下で NF- $\kappa$ B 構成因子の発現に対する bortezomib の影響を検証した。各レーンのタンパク質の量は 30  $\mu$ g である。(D)(E) 各 T-ALL 細胞株に IC<sub>50</sub> の bortezomib (Jurkat は 12nM、MOLT4 と CEM は 4nM) 投与し、核タンパクを抽出し、p65、p50 の活性を ELISA 法により測定した。

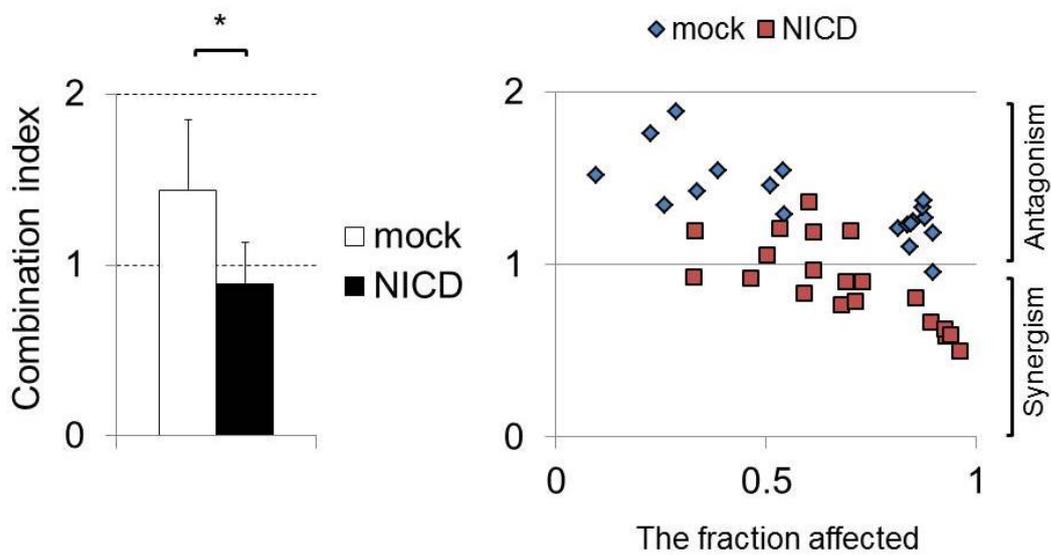


図 9. Bortezomib と IKK $\beta$  阻害剤 MLN120B の併用効果の combination index。

左図は右図の各プロットを平均したもの。\* $p$ <0.05

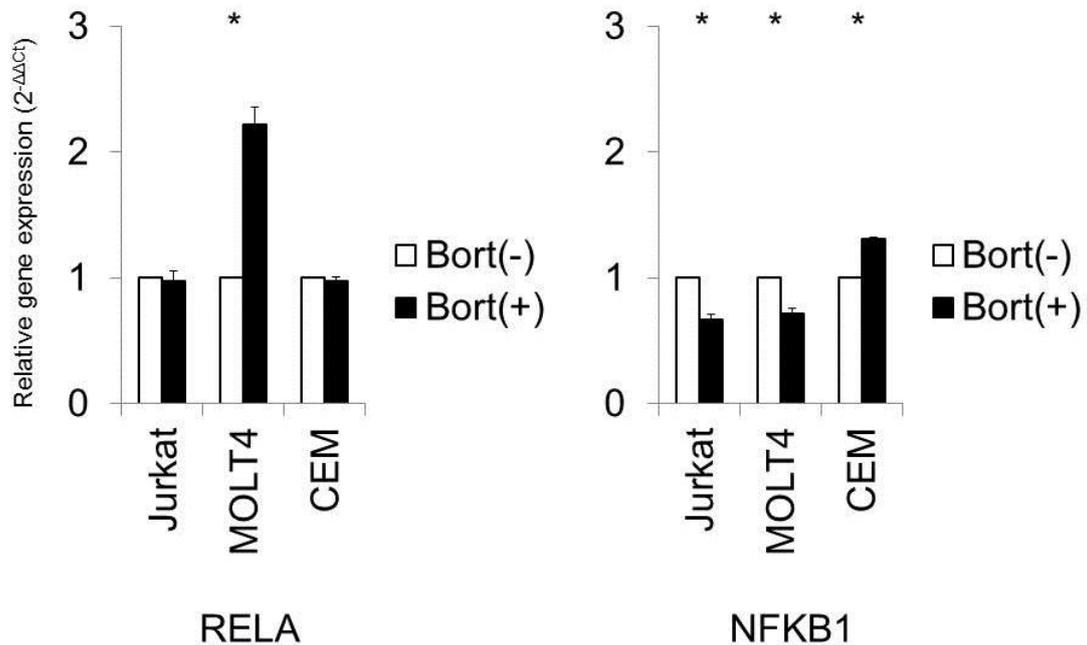


図 10. T-ALL 細胞株における bortezomib による RELA (p65)、NFKB1 (p50) の mRNA 発現の変化をリアルタイム RT-PCR で解析した。\*p<0.05

### Bortezomib による Notch1 の転写抑制は Sp1 の分解に起因する

次に bortezomib による Notch1 の転写抑制の機構を解析した。ケラチノサイトでは-392~-1 の領域が完全なプロモーター活性を有するという報告<sup>42)</sup>をもとに、図 11A に示す 4 種類のプロモーター配列を挿入したレポータープラスミドを作成し、T-ALL 細胞株 CEM に導入してレポーターアッセイを行った。bortezomib を作用させると-392~-1 のフラグメントを含むレポータープラスミドでは有意にプロモーター活性の低下を認めた。-342~-1 では抑制が認められなかったため、-392~-342 が bortezomib-responsive element と考えられた。そこで、この部位に結合する転写因子をデータベースでサーチしたところ、Sp1・KLF4・MZF1 が候補として挙げられた。そこでこれらの転写因子の T-ALL 細胞における発現をウエスタンブロットで確認すると、Sp1 のみが発現しており、なおかつ bortezomib により著明に発現が低下した (図 11B)。また Sp1 選択的阻害剤である mithramycin<sup>43)</sup>を作用させると、Notch1 の発現が著明に低下し、

かつその下流に位置づけられる p65 の発現も同時に低下した (図 11C)。また bortezomib によって Notch1 プロモーターへの Sp1 の結合が低下することをクロマチン免疫沈降法により確認した (図 11D)。以上の結果から主に Sp1 が Notch1 遺伝子の転写を制御しており、bortezomib による Sp1 の発現低下が転写レベルでの Notch1 発現抑制の一因であることが明らかとなった。ただし Sp1 タンパク質発現抑制の程度に比べ、レポーターアッセイによるプロモーター活性の低下は軽度であり、他の転写因子の関与は否定できない。

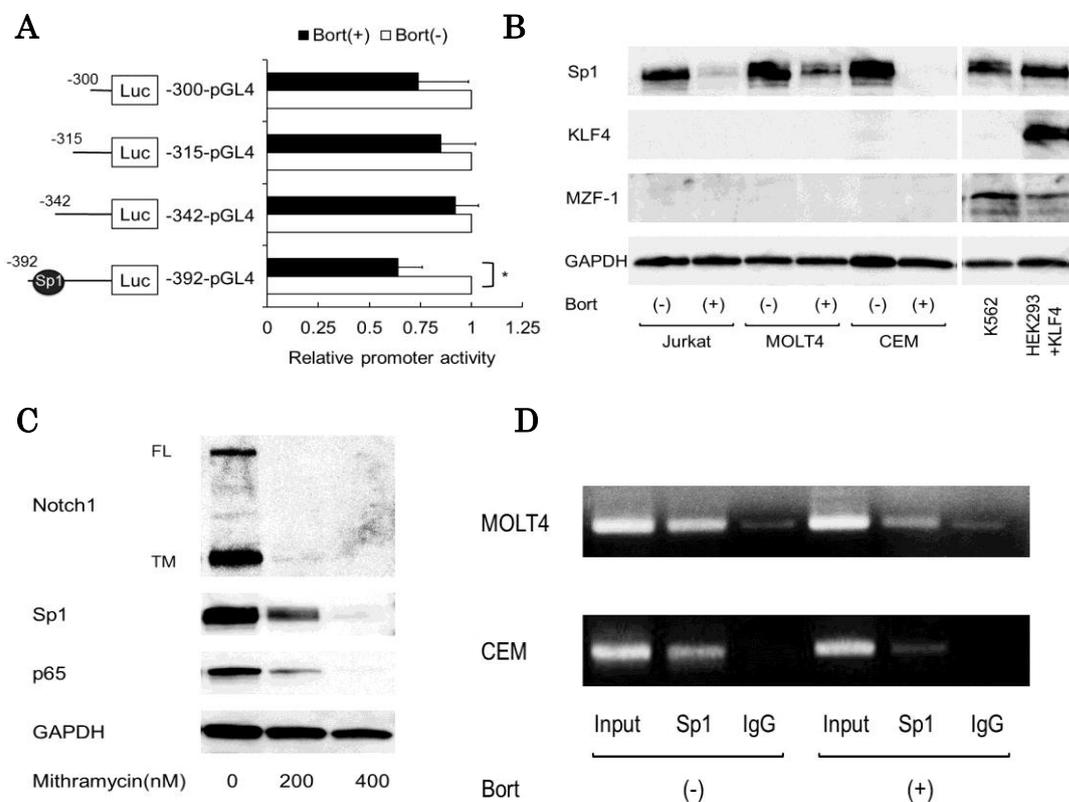


図 11. Bortezomib による Sp1 の分解が、Notch1 プロモーター活性を低下させる

(A) Notch1 プロモーターの各断片を pGL4.17 ベクターに挿入し、レポーターアッセイで bortezomib を作用させたときのプロモーター活性の変化を調べた。\* $p < 0.05$  (B) 各転写因子の発現、bortezomib を作用させたときの変化をウエスタンブロットで確認した。K562 は MZF-1 の、HEK293 に KLF4 発現ベクターをトランスフェクションさせたものを KLF4 の各々ポジティブ・コントロールとした。各レーンのタンパク質の量は 30  $\mu$ g である。(C)

Jurkat に mithramycin を作用させ、24 時間後にウエスタンブロットを行った。各レーンのタンパク量は 30  $\mu\text{g}$  である。(D) MOLT4、CEM に bortezomib を作用させ、48 時間後にクロマチン免疫沈降法を行い、Notch1 プロモーターの-480~-342 領域を amplicon として PCR を行った。

### T-ALL 細胞に NICD を強発現させると bortezomib によるアポトーシスが抑制される

T-ALL における bortezomib の標的分子が Notch1 であることを裏付けるには、NICD の強制発現によって bortezomib による効果がキャンセルされることを検証することが必要となる。そこで Jurkat・MOLT4 に NICD を強発現した系を用いることにした。まずはレンチウイルスベクターで一過性に NICD を強発現させた二つの細胞株 (図 12A) に bortezomib を作用させ、annexin-V でアポトーシス細胞の割合を調べた。Jurkat、MOLT4 いずれの細胞株でも mock を強制発現させた細胞株と比べて NICD 強発現群で有意にアポトーシスが抑制された (図 12B)。また MOLT4 に NICD を強発現させた stable transformant を作成した。NICD 強発現株においては bortezomib を作用させても NICD の発現はほとんど抑制されず、それと同時にその下流に位置すると考えられている p65 の発現の低下も見られなかった (図 12C)。bortezomib あるいは Sp1 選択的阻害剤である mithramycin を作用させても NICD 強発現株では p65 の活性の低下が抑制されていた (図 12D)。同様に両薬剤によるアポトーシスも著明に抑制された (図 12E)。また、NICD 強発現株に各種抗がん剤を作用させると、bortezomib・DEX・Ara-C では有意に抗がん剤の効果が抑制された (図 12F)。以上の結果から、T-ALL 細胞株に対する bortezomib の様々な効果が NICD の強制発現により抑制されることが明らかになった。

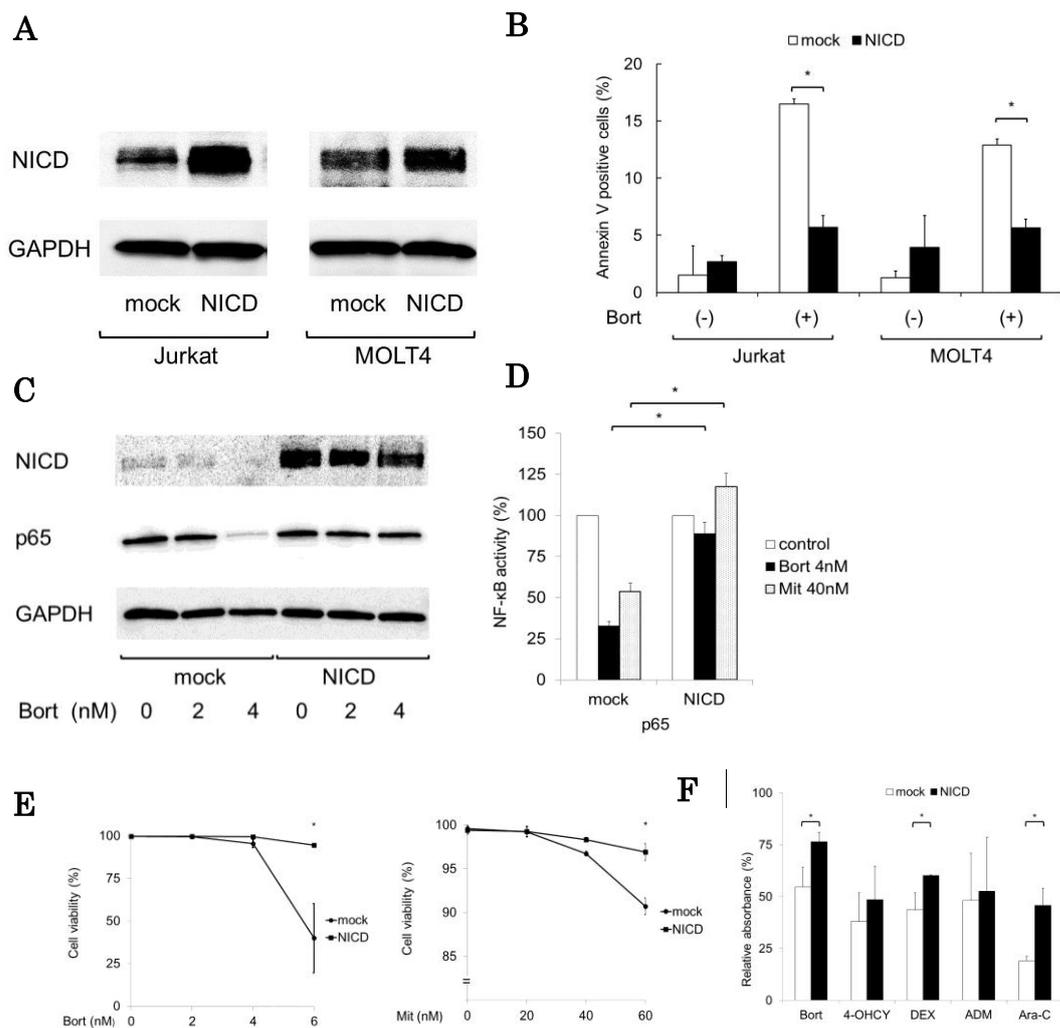
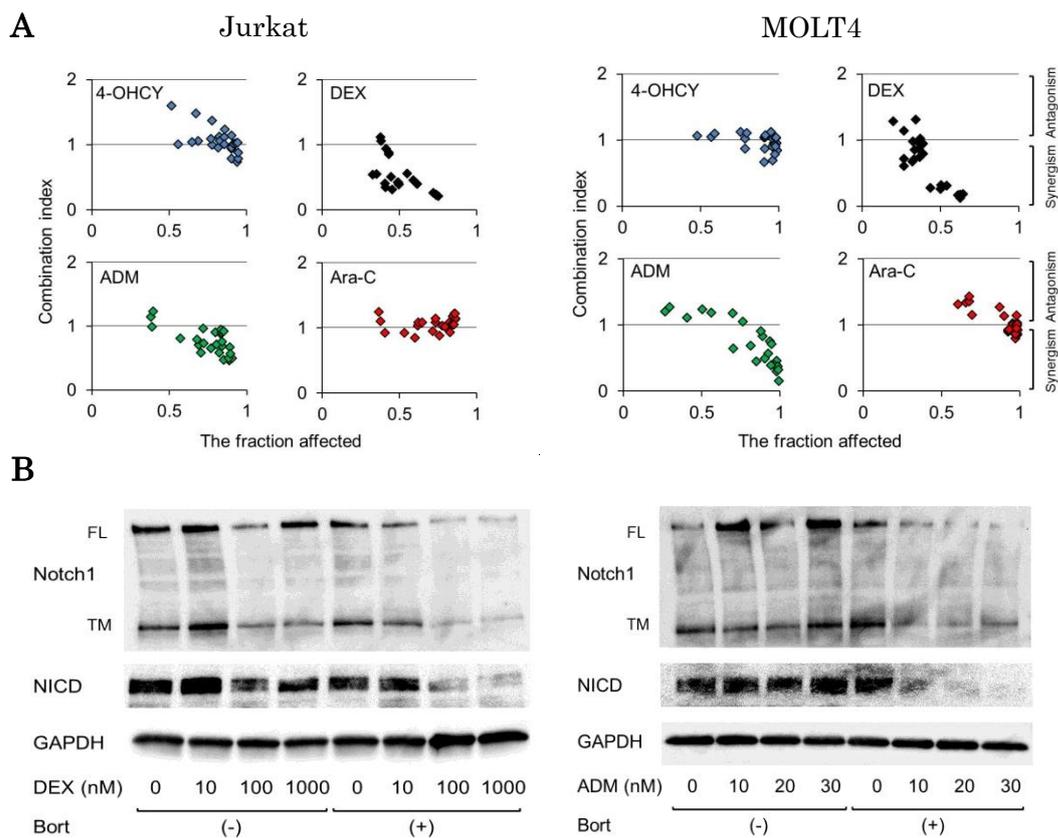


図 12. NICD 強発現による bortezomib の作用の抑制

(A) Jurkat、MOLT4 にレンチウイルスで一過性に NICD を強発現させ、ウエスタンブロットで確認し、(B) annexin-V 染色、フローサイトメトリーでアポトーシス細胞の割合を測定した。MOLT4 で NICD の stable transformant を作成し、(C) bortezomib を作用させたときの NICD、p65 の発現 (各レーンのタンパク質の量は 30  $\mu$ g である)、(D) bortezomib、mithramycin を作用させたときの p65 の活性、(E) アポトーシス細胞の割合、(F) 各種抗がん剤の殺細胞効果の変化を評価した。\* $p < 0.05$

Bortezomib と他の抗がん剤との併用療法は T-ALL 細胞株に高い有効性を示す

恒常的な Notch シグナルの活性化は薬剤抵抗性と密接に関連している<sup>67)</sup>。そこで bortezomib による Notch シグナルの抑制は薬剤感受性を増強させるという仮説を立て、bortezomib と他の抗がん剤との併用効果を CI で解析した。Jurkat、MOLT4 いずれの細胞株でも、特に DEX、ADM との併用が相乗的で、4-OHCY、Ara-C でも相加的な併用効果を示した (図 13A)。Bortezomib と DEX、ADM を併用すると Notch1 タンパク質の発現低下はより増強された (図 13B)。NICD を強発現させた stable transformant では特に DEX との併用効果がキャンセルされていた。以上より、bortezomib は既存の抗がん剤の感受性を増強させることが明らかで、bortezomib と他剤の併用化学療法は高い有効性を示す可能性が示された。



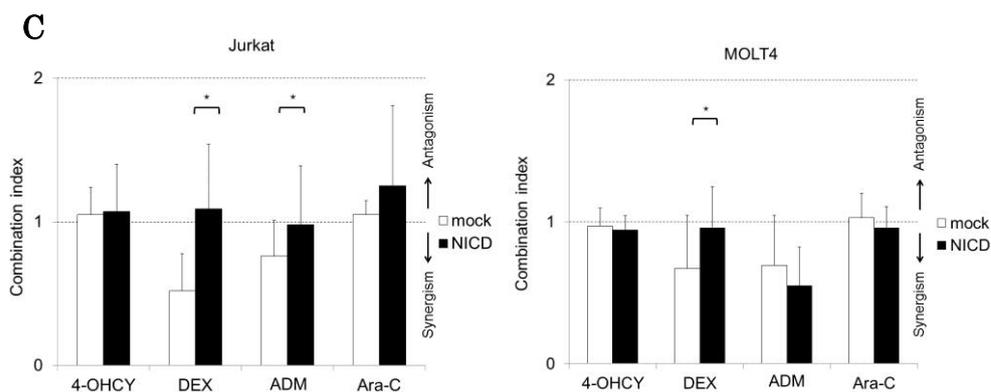


図 13. Bortezomib と他の抗がん剤との相乗効果

(A) 各々Jurkat (左図)、MOLT4 (右図) で bortezomib と 4-OHCY、DEX、ADM、Ara-C との併用療法に関する combination index を算出した。(B) 各々MOLT4 における bortezomib と DEX (左図)、ADM (右図) と併用した時の Notch1、NICD の発現の変化をウエスタンブロットで確認した。各レーンのタンパク質の量は 30  $\mu$ g である。(C) Jurkat、MOLT4 と各々作成した NICD の stable transformant で bortezomib と各種抗がん剤の combination index を比較した。各薬剤 n=20~25 の plot より平均値を算出した。\*p<0.05.

### In vivoにおける bortezomib と DEX の相乗効果

MOLT4 およびホタルルシフェラーゼを強発現させた MOLT4-Luc の stable transformant を、NOD/SCID マウスの皮下に移植し、*in vivo* における bortezomib と DEX の効果を定量的に解析した。腫瘍サイズを直接計測した場合 (図 14A、B)、IVIS を使用してルシフェラーゼ活性を測定した場合 (図 14C、D) のいずれにおいても、併用療法によって有意に腫瘍の増殖が抑制された。すなわち *in vivo* でも bortezomib と DEX の併用療法が有効であることが示された。

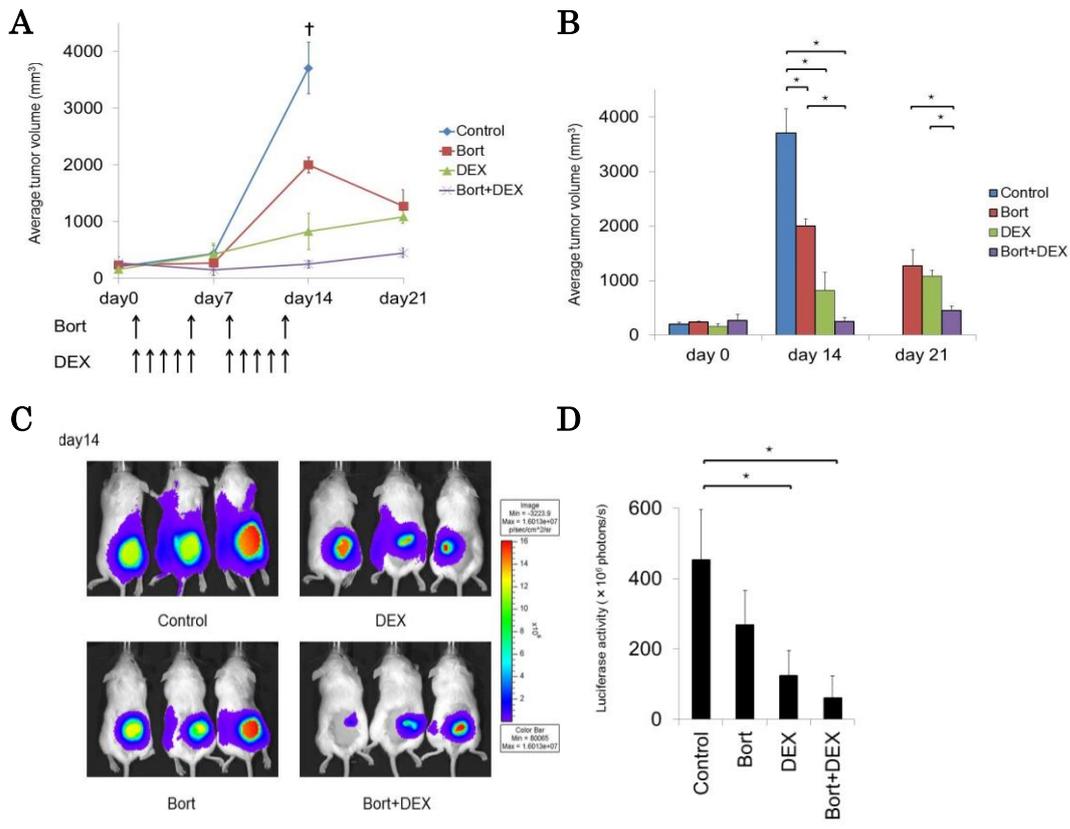


図 14. *In vivo*における bortezomib と DEX の相乗効果

NOD/SCID マウスの皮下に MOLT4 を移植し、Vehicle (対照) 群、bortezomib 単剤群、DEX 単剤群、bortezomib+DEX 併用群に分け (n=3~4)、上記の時間で腫瘍径を測定した。(A) 経時的変化と (B) day14, day21 における各群の腫瘍量の平均値を比較した。(C) MOLT4-Luc 細胞を移植したマウスに同様のスケジュールで治療し、IVIS で腫瘍をイメージングした。(D)ルシフェラーゼ活性の平均値+標準偏差 (bar) を示す (n=3)。\*p<0.05. IVIS により定量したルシフェラーゼ活性が体内の腫瘍サイズと相関することは過去の文献により示されている<sup>44)</sup>。

## 考察

本研究において申請者は、bortezomib が T-ALL において恒常的に活性化している Notch1 シグナルを抑制することで抗腫瘍効果を発揮し、かつ他の抗がん剤に対する感受性を増強させることを *in vitro* および *in vivo* で示した。γ-secretase 阻害剤とは対照的に、bortezomib は Notch1 の転写活性自体を抑制するので、HD 変異の有無に関わらず、高い有効性を発揮する。この点はγ-secretase 阻害剤や Notch 阻害抗体よりも優れている点である (図 15)。Bortezomib の臨床使用に関する安全性・有効性に関する評価は MM 等において十分になされており、T-ALL に対する bortezomib を含む多剤併用化学療法は臨床応用が十分に可能と考えられ、治療成績の向上に寄与することが期待される。特に bortezomib と DEX との併用は、Notch1<sup>8)</sup>のみならず、NF-κB<sup>45)</sup>をも互いに抑制することから、相乗作用が見られている可能性が高い。

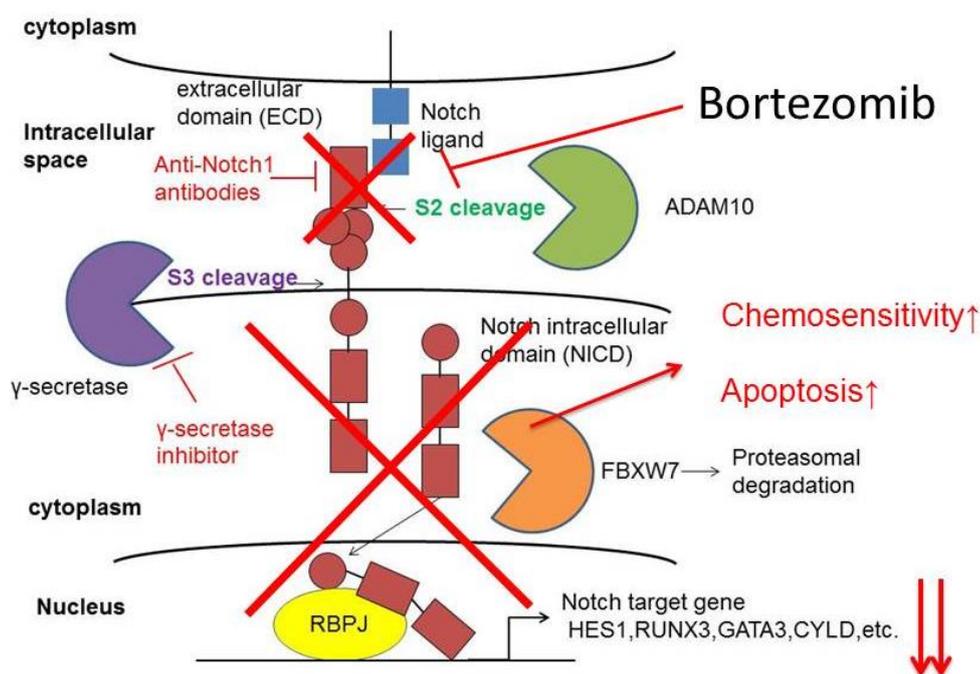


図 15. Bortezomib による Notch1 シグナルの抑制。Notch 阻害抗体やγ-secretase 阻害剤は HD 変異がある場合には無効だが、bortezomib は転写レベルで抑制できるので HD 変異の有無に関わらず、Notch シグナルを抑制することができる。

プロテアソーム阻害剤による Notch1 発現抑制は、遺伝子発現の抑制が主要な機序と考えられたが、転写後にも何らかのメカニズムが寄与している可能性は否定できない。Notch1 は caspase-6 で切断されることが知られており<sup>46)</sup>、またリガンド非依存性の Notch シグナルの活性化にリソソームが関与している<sup>47)</sup>。Caspase-6 阻害剤である Z-VEID-fmk やリソソーム阻害剤であるクロロキンを用いて bortezomib による Notch1 発現抑制への影響を調べたが、これらの経路の関与は証明できなかった。今回の検討範囲では、bortezomib による Notch1 発現低下は主に転写レベルで起きていると結論した。

また T-ALL における Notch1 の転写抑制には Sp1 が重要な働きを担っているが、Sp1 の発現が低下するメカニズムに関しては議論の余地がある。MM において、bortezomib は caspase-8 依存性に Sp1 分解し、caspase-8 阻害剤を作用させると bortezomib による Sp1 タンパク質の分解、アポトーシスが抑制される<sup>26)</sup>(図 16)。

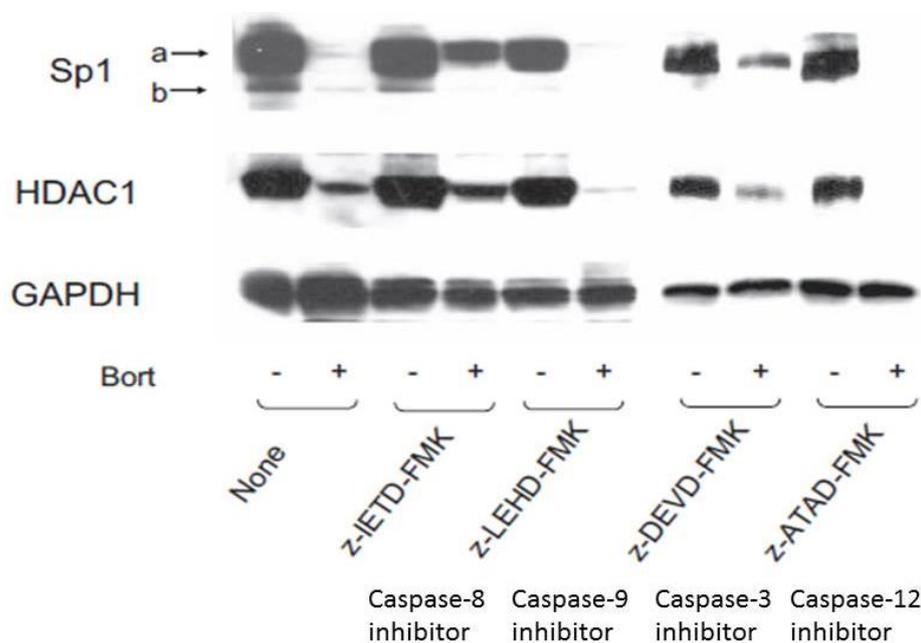


図 16. MM においては、bortezomib は caspase-8 依存性に Sp1 を分解する。  
(文献 26 より引用) Caspase-8 阻害剤を投与すると bortezomib による Sp1 タンパク質の分解が抑制される。

また、Sp1 はリン酸化、グリコシル化、アセチル化、SUMO 化、そしてユビキチン化など様々な翻訳後修飾が起こることが知られている<sup>48)</sup>。翻訳後修飾が起こると Sp1 本来の転写活性化能は見られなくなる。Sp1 が SUMO 化されると、E3 リガーゼである RNF4 によってユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して分解される。プロテアソーム阻害剤はこの過程を阻害することによりユビキチン化された Sp1 を蓄積させる可能性がある。Sp1 は auto-regulation している転写因子として知られており、自らの転写活性化に Sp1 自身の働きが重要である<sup>49)</sup>。すなわち修飾された Sp1 が増加するとたちまち Sp1 の活性が急速に低下してしまうことが予想される。

また Notch1 が多様なメカニズムにより NF- $\kappa$ B 経路を活性化していることが明らかになってきている。CD3/CD28 刺激性マウス T リンパ球では、NICD が直接 c-Rel や p50 に結合し、それらの因子の核への再移行を促進することが分かっている<sup>50)</sup>。また、NICD を強制発現させると造血前駆細胞において p65、p50、c-Rel や RelB の核局在を誘導することが報告されている<sup>41)</sup>。T-ALL や胆管癌において、NICD は CYLD の発現抑制を介する IKK 複合体活性化<sup>26)27)</sup>やプロテアソーム依存的 I $\kappa$ B $\alpha$  分解<sup>41)</sup>により canonical NF- $\kappa$ B 経路を活性化することが報告されている。過去の研究による成果を模式図にまとめると図 17 のようになる。当初は bortezomib による NICD の発現抑制に伴ってこれらのプロセスが解除されるため、NF- $\kappa$ B 活性が低下すると推察したが、実際の実験結果はこれらの所見を支持しなかった。T-ALL 細胞において bortezomib により NICD の発現が低下すると核内の p65 や p50 自体の発現が著明に低下していた。その機序として、mRNA は NF $\kappa$ B1 のみ一部の細胞株での発現低下を認めるにとどまり、今回の p65・p50 の発現低下は NICD 発現低下による安定性の低下が主であると推察された。また、T-ALL においては、bortezomib による NICD の発現低下が IKK $\beta$  の安定性を低下させることにより活性を阻害するが、I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積は認めなかった。I $\kappa$ B $\alpha$  は NICD が直接、転写活性化している標的分子であるため、NICD の発現が低下すると IKK $\beta$  複合体の発現に関わらず、発現量が低下すると考えられる。I $\kappa$ B $\alpha$  の発現が低下しても、最終的なエフェク

ターである p65・p50 自体の発現が抑制されているため全体として NF- $\kappa$ B シグナルは抑制されているのであろうと推察される (図 17)。

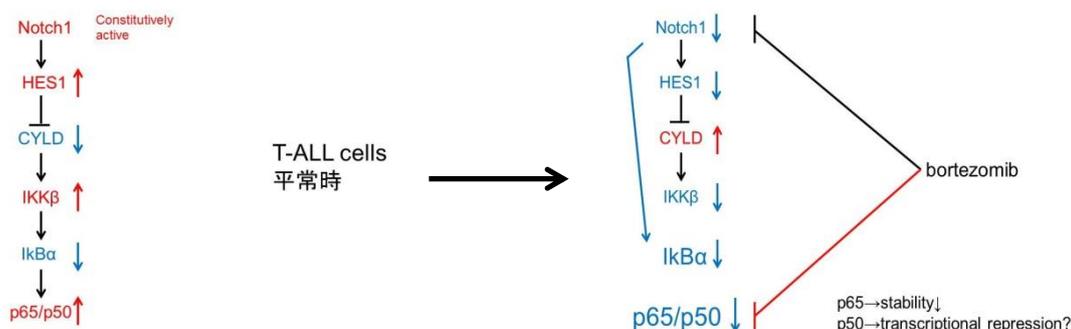


図 17. T-ALL における NF- $\kappa$ B シグナルと bortezomib 投与による影響

bortezomib により NICD の発現が低下すると下流の HES1 の発現が低下し、CYLD の蓄積がみられるようになる。IKK $\beta$  複合体の発現は低下し、リン酸化も誘導されない。I $\kappa$ B $\alpha$  は NICD が直接、転写活性化しているため、NICD の発現が低下すると IKK $\beta$  複合体の発現に関わらず、発現量が低下している。しかし、p65・p50 自体の発現も抑制されているため全体として NF- $\kappa$ B シグナルは抑制されている。

なぜ様々な細胞に普遍的に発現している転写因子 Sp1 の抑制が、T-ALL において HDAC1 や GAPDH など他の遺伝子発現に影響することなく、Notch1 の発現を選択的に抑制するのであろうか？ Loven らの論文<sup>51)</sup>から考察すると、T-ALL において Notch1 の発現は、プロモーター領域に Sp1 が集中的に結合し、いわゆる super-enhancer を形成することによって維持されている可能性がある。このため、プロテアソーム阻害剤による Sp1 の発現変化が、他の遺伝子に比べ Notch1 の発現に大きく影響すると考えられる。

また、臨床使用する際、正常細胞においても Sp1 を分解が起こってしまうと思わぬ有害事象が発生してしまう可能性も考えられる。しかし、がん細胞では正常な末梢血単核球に比べ Sp1 が強発現していることが多く、特に MM においてはその発現をノックダウンすることで腫瘍選択的な細胞死が誘導される<sup>52)</sup>。

T-ALL においても同様に Sp1 が強発現しており、bortezomib による Sp1 分解の影響が腫瘍選択的に起こる可能性が高いと考えられる。

## 参考文献

- 1) Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 354: 166-178. 2006.
- 2) Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 306: 269-271. 2004.
- 3) Callens C, Baleyrier F, Lengline E, Ben Abdelali R, Petit A, Villarese P, Cieslak A, Minard-Colin V, Rullier A, Moreau A, Baruchel A, Schmitt C, Asnafi V, Bertrand Y, Macintyre E. Clinical impact of NOTCH1 and/or FBXW7 mutations, FLASH deletion, and TCR status in pediatric T-cell lymphoblastic lymphoma. *J Clin Oncol.* 30: 1966-1973. 2012.
- 4) Jenkinson S, Koo K, Mansour MR, Goulden N, Vora A, Mitchell C, Wade R, Richards S, Hancock J, Moorman AV, Linch DC, Gale RE. Impact of NOTCH1/FBXW7 mutations on outcome in pediatric T-cell acute Lymphoblastic leukemia patients treated on the MRC UKALL 2003 trial. *Leukemia.* 27: 41-47. 2013
- 5) Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med.* 183: 2283-2291. 1996.
- 6) Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, de Stanchina E, Sulis ML, Barnes K, Sawai C, Homminga I, Meijerink J, Aifantis I, Basso G, Cordon-Cardo C, Ai W, Ferrando A. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* 15: 50-58. 2009.
- 7) Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D, Sarkar FH. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer

- therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1806: 258-267. 2010
- 8) Cialfi S, Palermo R, Manca S, Checquolo S, Bellavia D, Pelullo M, Quaranta R, Dominici C, Gulino A, Screpanti I, Talora C. Glucocorticoid sensitivity of T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma is associated with glucocorticoid receptor-mediated inhibition of Notch1 expression. *Leukemia* 27: 485-488. 2013.
  - 9) Annino L, Vegna ML, Camera A, Specchia G, Visani G, Fioritoni G, Ferrara F, Peta A, Ciolli S, Deplano W, Fabbiano F, Sica S, Di Raimondo F, Cascavilla N, Tabilio A, Leoni P, Invernizzi R, Baccarani M, Rotoli B, Amadori S, Mandelli F; GIMEMA Group. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood*. 99: 863-871. 2002.
  - 10) Koch U, Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. *Trends Immunol*. 32: 434-442. 2011.
  - 11) Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J. Exp. Med*. 208: 1931-1935. 2011
  - 12) Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol*. 24: 9265-9273. 2004.
  - 13) Osipo C, Patel P, Rizzo P, Clementz AG, Hao L, Golde TE, Miele L. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a  $\gamma$ -secretase inhibitor. *Oncogene*. 27: 5019-5032. 2008.
  - 14) Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, Nagai S, Wada J, Koga K, Nakashima H, Sato N, Tanaka M, Katano M.  $\gamma$ -Secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Gastroenterology*. 134: 131-144. 2008.

- 15) Meng RD, Shelton CC, Li YM, Qin LX, Notterman D, Paty PB, Schwartz GK.  $\gamma$ -Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res.* 69: 573-582. 2009.
- 16) Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. *Cancer Sci.* 100: 2444-2450. 2009.
- 17) Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, Butowski N, Groves MD, Kesari S, Freedman SJ, Blackman S, Watters J, Loboda A, Podtelezhnikov A, Lunceford J, Chen C, Giannotti M, Hing J, Beckman R, Lorusso P. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 30: 2307-2313. 2012.
- 18) Tolcher AW, Messersmith WA, Mikulski SM, Papadopoulos KP, Kwak EL, Gibbon DG, Patnaik A, Falchook GS, Dasari A, Shapiro GI, Boylan JF, Xu ZX, Wang K, Koehler A, Song J, Middleton SA, Deutsch J, Demario M, Kurzrock R, Wheler JJ. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 30: 2348-2353. 2012.
- 19) Li K, Li Y, Wu W, Gordon WR, Chang DW, Lu M, Scoggin S, Fu T, Vien L, Histen G, Zheng J, Martin-Hollister R, Duensing T, Singh S, Blacklow SC, Yao Z, Aster JC, Zhou BB. Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. *J Biol Chem.* 283: 8046-8054. 2008.
- 20) Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki

- S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan M, Zha J, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 464: 1052-1057. 2010.
- 21) Aste-Amézaga M, Zhang N, Lineberger JE, Arnold BA, Toner TJ, Gu M, Huang L, Vitelli S, Vo KT, Haytko P, Zhao JZ, Baleyrier F, L'Heureux S, Wang H, Gordon WR, Thoryk E, Andrawes MB, Tiyanont K, Stegmaier K, Roti G, Ross KN, Franlin LL, Wang H, Wang F, Chastain M, Bett AJ, Audoly LP, Aster JC, Blacklow SC, Huber HE. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoS One*. 5: e9094. 2010.
- 22) Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harousseau JL. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 120: 947-959. 2012.
- 23) Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, Karamanesht I, Leleu X, Grishunina M, Rekhtman G, Masliak Z, Robak T, Shubina A, Arnulf B, Kropff M, Cavet J, Esseltine DL, Feng H, Girgis S, van de Velde H, Deraedt W, Harousseau JL. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol*. 12:431-440. 2011.
- 24) Messinger YH, Gaynon PS, Sposto R, van der Giessen J, Eckroth E, Malvar J, Bostrom BC; Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Consortium. Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Blood*. 120:285-290. 2012.
- 25) Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib

- induces canonical nuclear factor- $\kappa$  B activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 114: 1046-1052. 2009.
- 26) Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 116: 406-417. 2010.
- 27) Espinosa L, Cathelin S, D'Altri T, Trimarchi T, Statnikov A, Guiu J, Rodilla V, Inglés-Esteve J, Nomdedeu J, Bellosillo B, Besses C, Abdel-Wahab O, Kucine N, Sun SC, Song G, Mullighan CC, Levine RL, Rajewsky K, Aifantis I, Bigas A. The Notch/Hes1 pathway sustains NF- $\kappa$  B activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell*. 18: 268-281. 2010.
- 28) D'Altri T, Gonzalez J, Aifantis I, Espinosa L, Bigas A. Hes1 expression and CYLD repression are essential events downstream of Notch1 in T-cell leukemia. *Cell Cycle*. 10: 1031-1036. 2011.
- 29) Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 150: 665-673. 2010.
- 30) Aldana-Masangkay GI, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Hsieh YT, Kim YM, Lomenick B, Okemoto K, Landaw EM, Wang D, Mazitschek R, Bradner JE, Sakamoto KM. Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 52: 1544-1555. 2011.
- 31) Huang C, Hu X, Wang L, Lü S, Cheng H, Song X, Wang J, Yang J.H Bortezomib suppresses the growth of leukemia cells with Notch1 overexpression in vivo and in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 70:

- 801-809. 2012.
- 32) Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70: 440-446. 2010.
- 33) Wada T, Kikuchi J, Furukawa Y. Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep.* 13: 142-149. 2012.
- 34) Renard P, Ernest I, Houbion A, Art M, Le Calvez H, Raes M, Remacle J. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF- $\kappa$  B. *Nucleic Acid Res.* 29: e21. 2001.
- 35) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. *PLoS One.* 8: e61649. 2013.
- 36) Kikuchi J, Yamada S, Koyama D, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Furukawa Y. The novel orally active proteasome inhibitor K-7174 exerts anti-myeloma activity in vitro and in vivo by down-regulating the expression of class I histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* 288: 25593-25602. 2013.
- 37) Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 115: 2872-2881. 2010.
- 38) van Hamburg JP, de Bruijn MJ, Dingjan GM, Beverloo HB, Diepstraten H, Ling KW, Hendriks RW. Cooperation of Gata3, c-Myc and Notch in malignant transformation of double positive thymocytes. *Mol. Immunol.* 45: 3085-3095. 2008.
- 39) Giambra V, Jenkins CR, Wang H, Lam SH, Shevchuk OO, Nemirovsky O,

- Wai C, Gusscott S, Chiang MY, Aster JC, Humphries RK, Eaves C, Weng AP. NOTCH1 promotes T cell leukemia-initiating activity by RUNX-mediated regulation of PKC- $\theta$  and reactive oxygen species. *Nat Med*. 18: 1693-1698. 2012.
- 40) Chang P-Y, Draheim K, Kelliher MA, Miyamoto S. NF $\kappa$ B1 is a direct target of the TAL1 oncoprotein in human T leukemia cells. *Cancer Res*. 66: 6009-6013. 2006.
- 41) Vilimas T, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, Meng F, Thompson B, Spaulding C, Macaroun S, Alegre ML, Kee BL, Ferrando A, Miele L, Aifantis I. Targeting the NF- $\kappa$ B signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med*. 13: 70-77. 2007.
- 42) Lambertini C, Pantano S, Dotto GP. Differential control of Notch1 gene transcription by Klf4 and Sp3 transcription factors in normal versus cancer-derived keratinocytes. *PLoS One*. 5: e10369. 2010.
- 43) Blume SW, Snyder RC, Ray R, Thomas S, Koller CA, Miller DM. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 88: 1613-1621. 1991.
- 44) Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 113: 1005-1014, 2006.
- 45) Hartmann BL, Geley S, Kofler R. Sequence-specific transcription factors during glucocorticoid-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *Wien Klin Wochenschr*. 111:360-367. 1999
- 46) Cohen LY, Bourbonnière M, Sabbagh L, Bouchard A, Chew T, Jeannequin P, Lazure C, Sékaly RP. Notch1 antiapoptotic activity is abrogated by caspase cleavage in dying T lymphocytes. *Cell Death Differ*. 12: 243-254.

2005.

- 47) Zheng L, Saunders CA, Sorensen EB, Waxmonsky NC, Conner SD. Notch signaling from the endosome requires a conserved dileucine motif. *Mol Biol Cell.* 24: 297-307. 2013.
- 48) Wang YT, Yang WB, Chang WC, Hung JJ. Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol.* 414: 1-14. 2011.
- 49) Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat.* 192: 275-83. 2010.
- 50) Shin HM, Minter LM, Cho OH, Gottipati S, Fauq AH, Golde TE, Sonenshein GE, Osborne BA. Notch1 augments NF- $\kappa$ B activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J.* 25: 129-138. 2006.
- 51) Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell.* 153: 320-334. 2013.
- 52) Fulciniti M, Amin S, Nanjappa P, Rodig S, Prabhala R, Li C, Minvielle S, Tai YT, Tassone P, Avet-Loiseau H, Hideshima T, Anderson KC, Munshi NC. Significant biological role of sp1 transactivation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 17:6500-6509. 2011.