

氏名	さいとう しおり 齊藤詩緒里
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第540号
学位授与年月日	平成30年3月19日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を標的とする新規白血病治療薬の開発と作用機序の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 森本 哲 (委員) 教授 室井 一男 准教授 金田 るり

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、本邦での年間の新規の発症数は約 500 人と推定される。T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) は胸腺細胞に由来する ALL で、小児では 10~15%、成人では約 25% を占める。小児および青年における ALL の予後は、治療の強化により近年改善されており、5 年無再発生存率は現在 60~75% の範囲にある。しかしながら、治癒率が約 85% に達している小児 B-ALL と比べ、T-ALL の予後はまだ不良である。とくに T-ALL では中枢神経系 (CNS) への浸潤・再発が予後を大きく左右する。

LSD1 (lysine-specific demethylase 1) は FAD を補因子とするヒストン脱メチル化酵素で、histone H3-lysine 4 (H3K4) と H3K9 を基質とし、context-dependent に転写制御を行っている。申請者の所属する研究部では、LSD1 が T-ALL を含む急性白血病全般で強発現しており、造血幹細胞に人為的に強発現すると T-ALL が発症することを発生工学的手法にて証明した (*Blood*. 2015 Jun 11; 125(24):3731-46)。この結果は LSD1 が腫瘍化に重要な働きをしており、T-ALL における新たな分子標的となる可能性を示している。

LSD1 活性を競合的に阻害する低分子化合物 (pargyline、tranylcypromine) の抗腫瘍効果に関する preclinical study の結果がすでに報告されている (*Cancer Cell* 2012; *Nat. Med.* 2012; *Nat. Med.* 2013)。しかしながらこれらの化合物は、代表的 FAD 依存性酵素である monoamine oxidase (MAO) も阻害することから神経系の副作用が懸念され、また LSD1 阻害作用も充分でないという問題点がある。

本研究では、理化学研究所・梅原崇史博士が開発した新規の LSD1 阻害剤候補化合物の T-ALL に対する有効性をスクリーニングし、臨床応用レベルの効果と特異性・安全性を有する阻害剤の同定を試みた。さらにマウスモデルによる有効性の検証と作用機序の解明を行った。

### 2 研究方法

既存の LSD1 阻害剤 3 種類 (RN-1, OG-L002, S2101) と理化学研究所・梅原崇史博士が合成した 3 種類の新規 LSD1 阻害剤 (S2057, S2116, S2157) を用いた。3 種類の T-ALL 由来細胞株 (CEM,

Jurkat, MOLT4) を用いて T-ALL に対する有効性を比較解析した。

## **2) LSD1 阻害剤の T-ALL に対する作用機序の解明**

上記スクリーニングによって得られた T-ALL に高い効果を有する新規 LSD1 阻害剤について、作用機序の解明を行った。cDNA マイクロアレイを用いて発現が変動する遺伝子を網羅的に解析し、LSD1 阻害剤のエフェクター分子の候補を選定した。T-ALL 細胞株における候補分子の発現変化を RT-PCR と immunoblotting にて確認し、強発現によって LSD1 阻害剤の効果が抑制されるかどうかを調べた。

## **3) マウス T-ALL モデルを用いた *in vivo* における有効性と副作用の確認**

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した MOLT4 垂株 (MOLT4-Luc) を NOD/SCID マウスに経静脈移植して、マウス T-ALL モデルを作製、新規 LSD1 阻害剤の *in vivo* での有効性・毒性を検証した。LSD1 阻害剤投与後に脳組織と末梢血液を経時的に採取し、薬効動態と CNS 移行性を評価した。

## **4) 新規 LSD1 阻害剤と既存の T-ALL 治療薬の併用効果の解析**

LSD1 阻害剤と既存の抗 ALL 薬の併用効果を isobologram 法にて解析した。相乗効果が明らかになった薬剤について、実際の治療効果をマウス T-ALL モデルで確認した。

# **3 研究成果**

## **1) 臨床応用レベルの LSD1 阻害剤のスクリーニング**

既存の LSD1 阻害剤の T-ALL 細胞株に対する IC<sub>50</sub> は 20 μM 以上であった。一方、新規 LSD1 阻害剤の S2116 と S2157 は T-ALL に対して IC<sub>50</sub> 1~5 μM と高い有効性を示した。

## **2) LSD1 阻害剤の T-ALL に対する作用機序の解明**

マイクロアレイ解析では、LSD1 阻害剤を作用させた MOLT4 細胞株において 909 遺伝子の発現が対照と比較して 2 倍以上に増加し、148 遺伝子で 50% 以下に減少した。発現が抑制される遺伝子に T-ALL において腫瘍化のドライバー因子として知られる NOTCH3 と TAL1 が含まれていた。この 2 つが LSD1 阻害剤の標的分子であることを確認するため、T-ALL 細胞株に人為的強制発現を行ったところ、それぞれ単独で LSD1 阻害剤の効果を有意に減弱させた。

## **3) マウス T-ALL モデルを用いた *in vivo* における有効性と副作用の確認**

NOD/SCID マウスに MOLT4-Luc を移植すると、約 7 日後から骨髄病変が出現し、約 10 日後には CNS 白血病が検出されるようになった。S2116 と S2157 では *in vitro* の抗 T-ALL 効果に差はないが、CNS 移行性は S2157 が 60 倍以上高いため、T-ALL モデルマウスの治療には S2157 を用いた。その結果、S2157 は CNS 病変を含め T-ALL を明らかに抑制し、未治療群に対し有意に生存期間を延長させた。

## **4) 新規 LSD1 阻害剤と既存の T-ALL 治療薬の併用効果の解析**

既存の抗 T-ALL 薬の併用効果を isobologram 法で解析した結果、S2157 は L-asparaginase および dexamethasone と相乗効果を示した。マウス T-ALL モデルにおいて S2157 と dexamethasone の併用は、それぞれの単剤での治療に比べ有意に生存期間を延長した。

# **4 考察**

T-ALL 細胞株を用いた *in vitro* のスクリーニングで、新規 LSD1 阻害剤は既存のものに比べ有意に高い殺細胞効果を示した。とくに 2 つの化合物 (S2116, S2157) が臨床応用レベルの IC<sub>50</sub> を有していた。さらに S2157 は高い CNS 移行性を有し、マウス T-ALL モデルにおいて CNS 白血病に対する治療効果を示した。T-ALL の治療に用いられる抗癌剤のほとんどは、高用量または直接髄腔

内注射によって投与されない限り、血液脳関門を通過することができない。脳への LSD1 阻害剤の浸透率が高いことは、T-ALL 治療における他の薬物と比較して大きな利点である。マウスにおいては明らかな副作用は見られず、臨床応用を最終目標として研究を継続する予定である。

## 5 結論

今回の研究で、新規 LSD1 阻害剤の T-ALL に対する有効性が確認された。また、CNS 病変を有するマウスモデルを用いることによって、今まで治療が困難とされてきた CNS 病変を有する病態に対してブレイク・スルーをもたらす可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を標的とする新規白血病治療薬の開発と作用機序の解明

新規に合成した複数の LSD1 阻害剤が、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) に対して有効であるかどうかをスクリーニングし、臨床応用レベルの効果と特異性を有する化合物を同定した。最も有効と考えられた化合物を用い、*in vitro* の系で LSD1 阻害物の作用機序の解明・T-ALL に対して用いられる既存の薬剤との併用効果を解析した。実臨床への応用を目指し、マウス T-ALL モデルを用い、有効性と安全性の検証を行った。

1) T-ALL に対し有効な LSD1 阻害剤のスクリーニングでは、LSD1 阻害剤は T-ALL に対し選択的に有効であり、新たに合成された S2116 および S2157 の有効性が高いことが確かめられた。2) *in vitro* での作用機序の検討では、LSD1 阻害剤は、アポトーシス誘導によって T-ALL 細胞の増殖を抑制していること、NOTCH3 と TAL1 の発現低下を介して効果を発揮していることが明らかとなった。3) 既存の薬剤との併用療法の検討では、LSD1 阻害剤は *in vitro* でデキサメタゾンおよび L-アスパラギナーゼと相乗的に効果を発揮することが明らかとなった。4) T-ALL のマウスモデルを用いた検討では、LSD1 阻害剤の投与により生存率が延び、中枢神経白血病に対しても効果が期待できることが明らかとなった。

本研究は、T-ALL に対する新たな治療薬の開発として意義深いものである。本論文の内容は血液領域の Top journal である Blood に現在投稿中であり、博士 (医学) の学位に十分な quality を有していると考えられた。今後、臨床応用に向けた安全性の確認等、さらなる研究の発展が期待できる。初めに提出された論文は、誤字等が多数あったため修正を求めたところ、よく修正された。改訂版を委員全員が確認し、論文審査合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

発表は学位論文に準じて行われた。発表は明快で、大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

申請者と審査委員の間で次のような質疑応答がなされた。

1. 尾静脈から T-ALL の細胞を注入することにより、白血病の中樞神経浸潤が再現できるのか？

⇒このマウスモデルでは再現可能であった。ルシフェラーゼで標識した T-ALL 細胞株を用いたため、ルシフェラーゼの発光を脳内に検出することにより、白血病細胞の中樞神経浸潤を確認した。

2. LSD1 阻害剤は、中樞神経系に対する副作用が懸念されるが、今回のモデルマウスではどうであったか？

⇒マウスレベルの実験なので限界はあるが、明らかな中樞神経障害は生じなかった。今後は、サルなどを使い安全性の検証が必要である。

3. マウスモデルに対して用いた LSD1 阻害剤の投与量でのマウス血中の薬剤濃度は、*in vitro* の実験で用いた濃度と比べてどうであったのか？

⇒薬剤のマウスでの血中濃度は、*in vitro* の実験で用いた濃度とほぼ等しかった。

4. 今回の実験からは、LSD1 はヒストン脱メチル化酵素で、その阻害剤は H3K9 のメチル化レベルを増加させたとのデータが示されたが、同時に H3K27 のアセチル化を減少させるようである。LSD1 阻害剤は、H3K27 のアセチル化を抑えることを介して働いている可能性はどうか？

⇒H3K27 のアセチル化が減少することによって発現が変化する遺伝子もあると考えられ、それによって効果が出ている可能性も考えられる。今後の検討課題である。

5. LSD1 阻害剤によって、NOTCH3 や TAL1 以外に、CXCL2 の発現が低下するようであるが、白血病細胞の中樞神経への浸潤という観点から、LSD1 阻害剤の効果との関連で何か推察できることはあるか？

⇒CXCL2 はケモカインであり、細胞の誘因に関わっているため、白血病細胞の中樞神経への浸潤を変化させた可能性も考えられる。今後の研究課題である。

以上からわかるように、申請者は自己の研究テーマに関して深い学識を有し、いずれの質問に対しても的確に返答している。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。