

博士論文

抗 T 細胞性急性白血病活性を示す

新規シード化合物の探索

細胞療法分野

宮下 和也

目次	
略語一覧	3
要旨	5
総合序論	8
第一章	12
序論	12
材料と方法	15
結果	20
考察	28
図表	32
第二章	48
序論	48
材料と方法	51
結果	56
考察	59
図表	61
総合考察	75
参考文献	77
謝辞	82

略語一覽

ALL: acute lymphoblastic leukemia

ATL: adult T cell leukemia

BM-MNCs: bone marrow mononuclear cells

CCND3: cyclin D3

CD: cluster of differentiation

CLL: chronic lymphocytic leukemia

CLP: common lymphoid progenitor

CMP: common myeloid progenitor

EGFP: enhanced green fluorescent protein

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

ERG: ETS-related gene

EYFP: enhanced yellow fluorescent protein

FACS: fluorescence activated cell sorting

FBS: Fetal bovine serum

FLI1: Friend leukemia integration 1

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GATA: GATA binding protein

HDF: human dermal fibroblast

HHEX: human hematopoietically expressed homeobox

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration

IgG: immunoglobulin G

IL-2: interleukin 2

LBL: lymphoblastic lymphoma

LDB1: LIM domain binding 1

Lhx2: LIM homeobox 2

LMO2: LIM only 2

MYC: myelocytomatosis oncogene

NSG: NOD/SCID common-gamma knockout

PB-MNCs: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate buffered saline

PI: propidium iodide

TAL1: T cell acute lymphocytic leukemia 1

TCR: T cell receptor

要旨

急性リンパ芽球性白血病(ALL)は、小児において最も頻発するがんの一種である。ALL は B リンパ球性の B-ALL と T リンパ球性の T-ALL からなり、ALL における発症率はそれぞれ 75%と 25%であり、T-ALL の方が予後不良である。近年、分子標的薬や細胞療法の開発により、フィラデルフィア染色体陽性 ALL と B-ALL の治療成績は劇的に改善された。それに対し、フィラデルフィア染色体陰性 T-ALL に対する効果的な治療薬・治療法は乏しい。そこで、T-ALL に対し有効な薬剤開発のシーズを得るため、二つの独立した方法でアプローチした。一つは、T-ALL の発症に寄与していることの知られている転写補助因子 LMO2 を標的とする転写制御因子 Lhx2 を用いる手法、二つ目は T-ALL に対してのみ薬効を示す天然化合物をライブラリスクリーニングから得る方法である。

まず、レトロウイルスを用いて Lhx2 を T-ALL を含む様々なヒトがん細胞株に強制発現させ、増殖への影響を解析した。その結果、Lhx2 は T-ALL・骨髄球性白血病細胞株の増殖を阻害した。しかし、この様な効果は、B リンパ腫や上皮性癌細胞では観られなかった。次に、この T-ALL 細胞の増殖抑制が LMO2 タンパク量の減少によるかを解析したところ、Lhx2 を過剰発現させた T-ALL 細胞では空ベクター群と比べて LMO2 のタンパク量の減少が起こっていたが、mRNA 量に変化はなかったことから、仮説通り T-ALL 細胞においても LMO2 タンパク質が標的となっていることが示唆された。先行研究によると、LMO2 複合体は *HHEX* 遺伝子の発現を上昇させることで、胸腺細胞に自己複製能を与えることが報告されているため、Lhx2 を過剰発現させた T-ALL 細胞における *HHEX* 遺伝子発現量変化を調べた。その結果、Lhx2 過剰発現群では *HHEX* 遺伝子の顕著

な発現低下が確認された。Lhx2 過剰発現 T-ALL 細胞に Lmo2 を用いたレスキュー実験を実施したところ、増殖抑制効果の緩和、LMO2・HHEX タンパク量の回復が観られた。しかし、HHEX によるレスキュー実験では、Lmo2 の様な緩和効果は得られなかった。以上の結果は、Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制効果は、一部は LMO2 タンパク量低下に起因するが、その他の経路も作用していることを示唆する。

続いて、Lhx2 の活性責任部位を同定するため、Lhx2 の機能ドメインの欠失・変異体を作成し、T-ALL 細胞への増殖抑制効果を元の Lhx2 と比較したところ、Lhx2 の C 末端側 LIM ドメインとホメオドメインが活性に必須であることが判明した。さらに、Lhx ファミリーのうちどれが最も強力な T-ALL 抑制活性を持つかを解析したところ、Lhx2 と Lhx6 が最も T-ALL 細胞の増殖を阻害した。これらの実験結果は、Lhx2 または Lhx6 の活性を模倣する生理活性物質を得ることができれば、LMO2⁺T-ALL の治療薬となりうることを示唆している。

次に、二つ目の取り組みとして、B リンパ腫細胞株の増殖に影響を与えず、T-ALL 細胞株の増殖を特異的に抑制する化合物を約 15 万の天然化合物ライブラリーからスクリーニングしたところ、三種類 (44D-L008, 31D-F005, 21D-D016) の化合物の同定単離に成功した。うち二種 (44D-L008, 31D-F005) は構造類縁体であり、様々なヒト造血器腫瘍由来細胞株の増殖を強力に抑えたものの、上皮性癌細胞の増殖には影響を与えなかった。さらに、31D-F005 は皮膚線維芽細胞に対しても毒性を示さず、ヒト正常顆粒球、単球/マクロファージ、T 細胞の増殖・分化にも T-ALL 細胞への有効濃度範囲内で影響を与えなかった。しかしながら、赤芽球系のコロニー形成は低濃度域においても完全に抑制したため、貧血の副

作用を持つ可能性が懸念される。

赤芽球系へ副作用を持つ可能性があるものの、31D-F005は有望な T-ALL 治療薬のシード化合物となると考え、T-ALL/LBL 患者由来細胞への影響を解析した。2 症例の T-ALL/LBL 患者由来細胞の増殖を、31D-F005 はサブマイクロモラーで抑制した。しかし、別の白血病サブセットである ATL 患者由来細胞の増殖にはサブマイクロモラーでは全く影響を与えなかったことから、31D-F005 はがん種に特異性を持つことが示唆された。

Lhx2 を用いた一連の実験結果は、LMO2⁺T-ALL に対して、Lhx2 の C 末端 LIM ドメインとホメオドメインが創薬の標的になることを示唆している。今後、Lhx2 の LMO2 分解活性の最小作用領域を最小化し、機能活性を模倣する生理活性物質を見つけることができれば、T-ALL に対する新たな治療薬となる可能性がある。B リンパ腫細胞に影響を与えず T-ALL 細胞特異的に増殖を抑制する化合物を探索した大規模スクリーニングから得られた 31D-F005 は、患者由来細胞を含む T-ALL 細胞に強力な増殖抑制活性を示し、赤芽球を除く正常血液細胞へ毒性を示さなかった。31D-F005 の詳細な作用メカニズムを解析することで、赤芽球に毒性を示さない様な化合物が得られる可能性があり、その様な化合物は T-ALL に対する有望なリード化合物であると期待される。

総合序論

全てのヒト血液細胞は、造血幹細胞を頂点として、系統別前駆細胞を経て各々の成熟血液細胞に分化していく。まず造血幹細胞は、ニッチから離脱して活発に増殖する多能性前駆細胞(multipotent progenitor: MPP)へ分化し、さらに骨髓球性共通前駆細胞(common myeloid progenitor: CMP)とリンパ球性共通前駆細胞(common lymphoid progenitor: CLP)へと分かれる。リンパ球前駆細胞の性質はMPPに近いという報告もあるが、CMP 及び CLP に到達した時点で初めて細胞系譜の決定がなされ则认为られている。CMP は骨髓系前駆細胞(granulocyte/monocyte progenitor: GMP)と赤芽球/巨核球前駆細胞(megakaryocyte/erythroid progenitor: MEP)を産生し、GMP と MEP が最終的に好中球、単球、マクロファージ、あるいは赤血球と血小板をそれぞれ生み出す。CLP は T リンパ球前駆細胞、B リンパ球前駆細胞、そして自然リンパ球前駆細胞を産生し、これらの細胞が成熟することでリンパ球が発生する则认为されている¹。

T リンパ球は他の成体血液細胞と異なり、骨髓ではなく胸腺で発生することが知られている。胸腺内に移入した時点では、まだ T リンパ球への運命決定は済んでいない。胸腺前駆細胞は胸腺皮質と胸腺髄質の境目から胸腺に移入し、胸腺皮質から胸腺髄質へと移動する過程で、胸腺上皮細胞によるポジティブセレクションとネガティブセレクションを受け、獲得免疫系成立に必須な T リンパ球レパートリーが完成していく²。即ち、胸腺前駆細胞の増殖及び分化は、細胞外微小環境により時空間的に厳密に制御されている。それ故に、この前駆細胞の増殖や分化制御の破綻は白血病の発症に繋がると考えられている。

白血病は、その細胞起源と進行パターンにより急性骨髓性白血病 (acute

myelogenous leukemia: AML)、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML)、急性リンパ球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL)、慢性リンパ球性白血病 (chronic lymphocytic leukemia: CLL)の4つに大別される。日本ではAML、ALL、CML、CLLの順に罹患率が高く、急性白血病と慢性白血病の発症率の比は約4 : 1である。とりわけ、CLLは欧米において最も罹患率の高い白血病であるが、わが国では白血病全体の5%程度に止まる。急性白血病に着目すると、骨髄球性とリンパ球性の発症率の比は小児においては1 : 4、成人においては4 : 1と逆転する。特に、ALLは小児において最も発症率の高いがんの一種として知られている^{3,4}。

ALLはBリンパ球起源のB-ALLとTリンパ球起源のT-ALLに分類され、ALL全体での割合は3 : 1である⁵。T-ALLはB-ALLに比べ、発症の割合は低いものの、予後不良であることが報告されている。かつては不治の病と言われていたALLも、近年の爆発的な分子生物学の発達とともに治療成績が改善されている。例として、BCR-ABL融合遺伝子を標的としたイマチニブ、B細胞マーカーCD20を標的としたリツキシマブを従来の化学療法と組み合わせることで、それぞれフィラデルフィア染色体(Ph)陽性ALL患者とB-ALL患者の完全寛解導入効率を劇的に上昇させることに成功している⁶⁻⁹。さらに近年、B細胞マーカーCD19を標的とする抗体の細胞外ドメインとCD3ζの細胞内ドメインのキメラ遺伝子を導入した患者由来T細胞を利用する細胞療法(CAR-T細胞療法)が開発され、B-ALL治療成績のさらなる改善が期待されており、すでに米国では認可されている¹⁰。一方で、Ph陰性T-ALLに対しては、上記のような効果的な薬剤や治療法は確立されていない。プリン拮抗薬ネララビンは、初めて単剤でT-ALL/T-LBLに有効性が観られた抗がん剤であり、小児の4割弱、及び成人の2割程

度に対し完全寛解を誘導するものの、傾眠等の神経系への副作用を持つ^{11,12}。最近、多発性骨髄腫に対するヒト抗CD38抗体薬ダラツムマブがCD38を高発現する小児T-ALL患者検体の異種間移植系において、移植マウスの生存を延長させることが示された¹³。しかし、ナチュラルキラー細胞を欠くNSGマウスにおいて、抗体依存性細胞障害はマクロファージの活性に依存しているが、NSGマウスは成熟T細胞も欠いているため、抗体依存性細胞障害活性は通常のマウスより非常に弱い。補体依存性細胞障害のみでこのような劇的な効果が得られているのか、実際のT-ALLに対する作用機序には不明点が多い。さらに、ダラツムマブは小児の症例のみを対象として試験されていたため、成人T-ALLに対する抗体薬は依然として確立されていない。これは、T細胞由来の腫瘍細胞と抗腫瘍細胞活性を促す正常T細胞が多く、細胞表面マーカーやサイトカインシグナル伝達経路を共有することに起因する。T-ALLは再発率が非常に高く、成人では再発患者の約60%が死亡する。腫瘍化したT細胞に活性を示し、正常T細胞に影響を与えない薬剤や治療法の開発が急務な状況にある。

本博士論文では、T-ALL を標的とした治療薬を開発する上での分子シーズを得るため、2つの方法でアプローチした。転写制御因子 Lhx2 が T-ALL の発症と強く関連している転写補助因子 Lmo2 の分解を促進することが示されていた。そこで第一章では、Lhx2 が T-ALL 細胞の増殖を抑えるかを調べたところ、Lhx2 は T-ALL 細胞の増殖を強力に阻害した。加えて、Lhx2 を強制発現させた T-ALL 細胞株では LMO2 のタンパク量が低下しており、Lhx2 の活性を模倣する分子標的薬開発のための基礎データを得ることに成功した。第二章では、二種類のヒト造血器腫瘍由来細胞株を用いた天然物ライブラリーのスクリーニングを行い、ヒト T-ALL 細胞の増殖を特異的に阻害

する化合物を探索したところ、有望な三種類の化合物の同定単離に成功した。このうち一種は白血病患者細胞の増殖を抑制する一方で正常 T 細胞の増殖・生存に影響を与えず、T-ALL に対する新規治療薬のリード化合物として有望である。

第一章

序論

胸腺内で分化する胸腺前駆細胞は、自己を正しく認識できるよう再構成された T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) の刺激強度によるポジティブセレクションとネガティブセレクションを受ける。この過程で大半の胸腺前駆細胞が細胞死を引き起こし、体内で自己反応性 T リンパ球が出現するのを防いでいる。TCR 再構成の過程では、RAG 遺伝子による二本鎖 DNA の切断と再結合が起こる。この二本鎖 DNA の切断による TCR 遺伝子座とがん原遺伝子座の転座が、20~35% の T-ALL 発症を引き起こす原因の一例となることが報告されている¹⁴。

LIM-only 型転写補助因子 LMO2 は T-ALL 患者の t(11;14)(p13;q11) 転座部位から同定された遺伝子であり、約 10% の T-ALL 患者に LMO2 座の転座が見られる^{15,16}。また、Lmo2 は造血幹細胞の維持と赤血球分化に必須の役割を果たすことが報告されている^{17,18}。しかしながら、LMO2 座に転座の観られない症例においても、約半数の患者で LMO2 遺伝子の発現が亢進している^{5,19-23}。これは β -HLH 型転写因子 TAL1 が染色体転座などにより異所的に発現し、ES 細胞様の転写ネットワークを再形成することで LMO2 を含む TAL1 結合タンパク質の異所的発現を誘導する転写ネットワーク異常に起因すると考えられている²⁴。一部の症例では、LMO2 のプロモーター部位に変異が入り、MYB の結合標的配列が新規に形成されることが原因であることが示された²⁵。また、重度免疫不全患者の造血幹細胞にレトロウイルス治療を行なった際に、LMO2 のプロモーター部位にレトロウイルスの配列が挿入され、LMO2 の異所的発現が誘導されることで T-ALL を発症したという例も報告されている²⁶⁻²⁸。

近年、胸腺特異的 Lmo2 トランスジェニックマウスを用いた胸腺細胞の移植実験から、Lmo2 の異所的発現が胸腺前駆細胞に自己複製能を与えることが示された²³。さらに、Lmo2 に対する細胞内抗体やペプチドアプタマーは、胸腺特異的 Lmo2 トランスジェニックマウスから得られた白血病細胞を用いた移植系で、T-ALL の発症を抑制することが示された^{29,30}。しかしながら、Lmo2 は赤芽球分化に必須の遺伝子であり、上記の薬剤は副作用として赤血球の分化阻害を示した。この結果は、Lmo2 を標的とした既存の薬剤は重度の貧血を伴う可能性を示唆している。

LIM ホメオボックス型転写制御遺伝子 Lhx2 は、毛根幹細胞の機能制御や脳の発生において重要な役割を果たすことが報告されている^{31,32}。先行研究において、Lhx2 は ES/iPS 細胞から分化誘導した造血幹細胞様細胞の体外増幅活性を持つことが示されている³³。この方法で作出した Lhx2 を強制発現している造血幹細胞様細胞は、成熟 T リンパ球への分化能を失っていた。しかし、Lhx2 の発現を止めると T リンパ球への分化が再開したため、Lhx2 は幼弱な胸腺細胞の増殖あるいは分化を阻害していると推察される³⁴。LIM ドメインを保有するタンパク質は、転写補助因子 LDB1 と結合し、DNA 結合性ドメインを持つ転写制御因子を呼び込むことで標的 DNA 配列に結合する複合体を形成する³⁵。Lhx2 を Lmo2 と同時に 293T 細胞に過剰発現させると、Lmo2 の分解が促進されることが先行研究において示された³⁶。LIM タンパク質は定常状態において、Ldb1 と複合体を形成しており、どの LIM タンパク質が優先的に結合するかはそれぞれの LIM タンパク質の存在量と Ldb1 に対する結合解離定数 (K_d)によって定まる³⁷。Lhx2 と Lmo2 が同時に存在する場合、Ldb1 は Lhx2 と優先的に複合体を形成

する。Ldb1 と結合せず単量体で存在する Lmo2 は、E3 リガーゼ Rlim によって速やかにユビキチン化され、26S プロテアソーム系による分解を受ける³⁸。

これらの先行研究の結果を考慮し、この章では LMO2⁺T-ALL 細胞においても Lhx2 の過剰発現が LMO2 の低下を誘導し、増殖抑制活性を示すかどうかをレトロウイルスによる強制発現系で評価していくことを試みた。Lhx2 が T-ALL 細胞の増殖を顕著に阻害し、仮説通り LMO2 タンパク量の低下を伴っていたことを証明した一連の実験結果を記載する。

材料と方法

細胞培養

CCRF-CEM、Molt-4、Jurkat、TALL-1、PEER、THP-1、Mo7e、K562、Raji (Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan)、TF-1 (北村俊雄教授より分与)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA)、1% penicillin/streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、0.5% 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)を添加した RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)培地を用いて 37°C-5% CO₂ の条件下で培養した。TF-1 と Mo7e は上記の培地に human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (5 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ)を添加して培養した。SH-SY5Y、MCF-7 (Health Science Research Resources Bank)、PLAT-A (北村俊雄教授より分与)は、10% FBS、1% P/S を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich)を用いて同上の条件下で培養した。

遺伝子導入

各腫瘍細胞株への遺伝子導入には pMYs-ires-EGFP (IG)または pMYs-ires-EYFP (IY)レトロウイルスベクターを用いた。pMYs-IG (IY)ベクターをリポフェクタミン試薬 (Invitrogen)により PLAT-A へトランスフェクションし、組換え体レトロウイルスを作製した。24 時間の培養後、メディウムを交換し、さらに 24 時間後、メディウムを回収した。回収したメディウムは遠心を 2 回行い (1 回目 : 1,500 rpm、5 分、4°C、2 回目 : 2,500 rpm、5 分、4°C)、余分な細胞を取り除き、感染効率を高めるため 8 µg/ml ポリブレンを加え、 $0.2\sim1.2\times10^6$ の細胞へ spin infection 法 (1,200 xg、2 時間、15°C)により感染させた。なお、本実験は、東京都医学総

合研究所の遺伝子組換え生物実験・病原体実験安全委員会にて事前承認された実験計画に基づいて、P2 実験室にて実施した。

増殖アッセイ

組換えレトロウイルスを感染してから3日後を Day0 とし、さらに3日間培養した後の細胞数を測定した。EGFP 単独感染の場合は、FACSAriaIII (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて Day3 の EGFP⁺細胞数を計測した。EGFP/EYFP の二重感染実験では、Day0 に 3000 細胞/ウェルとなるように EGFP⁺/EYFP⁺細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24、48、72 時間培養後に CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を添加し、さらに4時間培養して 450nm の吸光度を測定した。得られた吸光度の値は、既知の細胞数での吸光度を基に作製した検量線を用いて細胞数に変換した。

定量的 PCR

細胞を TRIzol (Invitrogen)に溶解し、total RNA を得た。500 ng の total RNA を鋳型に、PrimeScript RT Master Mix (Takara, Otsu, Japan)を用いて cDNA を合成した。定量的 PCR はこの cDNA を鋳型として、SYBR premix ExTaq II (Takara)を用いて行った。DNA 増幅は、Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用いて記録した。発現量は、*GAPDH* を内部標準として、ウイルス非感染細胞の値に対する相対値として表した。使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

ウエスタンブロッティング

10⁶ 個の細胞懸濁液に、等量の SDS-lysis buffer (20% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris-Cl pH6.8) を添加し、15 分間のソニケーション後、95°Cで 5 分間処理した。10 µl の細胞溶解液を SuperSep Ace 10~20% (Wako, Osaka, Japan) にアプライし、電気泳動後 Hybond-P PVDF Membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) にブロットした。その後、rabbit 抗 LMO2 抗体 (EP3257, Abcam, Cambridge, UK)、rabbit 抗 HHEX 抗体 (EPR3361, Abcam) または rabbit 抗 actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、次に Horseradish peroxidase 標識抗 rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare) と反応させた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて発光させ、生じたシグナルを Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

細胞内 FACS 解析

10⁵~10⁶ 細胞を回収し、培養上清を除いた後、1% paraformaldehyde を用いて固定した。透過性を高めるために等量の 0.1% NP-40-PBS を添加し、室温で 15 分間静置した。遠心後、上清を除去し、permeability buffer (5% FBS-0.1% NP-40-PBS) 中に再懸濁し、rabbit 抗 LMO2 抗体、rabbit 抗 HHEX 抗体、rabbit IgG isotype control 抗体 (Abcam) のいずれかを添加し、氷上に 30 分間静置した。遠心後、上清を取り除き、permeability buffer に再懸濁し、Alexa Fluor 647 標識 goat 抗 rabbit IgG 抗体 (Abcam) を添加し、氷上で 30 分間反応させた。細胞を洗浄し、permeability buffer に再懸濁した後、FACS Aria III にて蛍光強度を測定した。データは FlowJo

(FlowJo LLC, Ashland, OR)を用いて解析した。

アポトーシス解析

10^5 個の CCRF-CEM 細胞を回収し、5% FBS-PBS で 2 度洗浄した後、1x Annexin V binding buffer (10 mM Hepes pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2)に再懸濁した。APC 標識 Annexin V (BioLegend, San Diego, CA)と propidium iodide (PI, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Wako)を添加し、氷上で 15 分間染色した後、速やかに FACS Aria IIIを用いて蛍光強度を測定した。

細胞周期解析

10^5 個の CCRF-CEM 細胞を回収し、0.1% NP-40-PBS に懸濁後、PI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加して室温で 15 分間暗所に静置した。FACSCalibur (BD Biosciences)を用いて DNA 含量を解析した。増殖細胞の定量目的では、70% ethanol で一晩固定した Day3 の CCRF-CEM 細胞に PE 標識 mouse 抗 human Ki-67 抗体、または PE 標識 isotype control (BD Biosciences)を添加し、氷上で 30 分間染色した。その後、FACS Aria IIIにて蛍光強度を測定した。G₀ 細胞については、Day3 の CCRF-CEM 細胞を回収後、PBS に懸濁して Hoechst33342 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Dojindo)を添加し、37°Cで 40 分間染色した。その後、Pyronin Y (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich)を添加し、さらに 37°Cで 20 分間染色した後、FACS Aria IIIにて蛍光強度を測定した。

統計解析

各グラフの測定値は平均値±標準偏差で示し、有意差は unpaired Student's t 検

定によって判定した。検定結果は P 値0.05以下をもって有意と判定し、*: $P<0.05$ 、
** : $P<0.005$ 、*** : $P<0.001$ と表記した。

結果

Lhx2 は T-ALL 細胞株の増殖を強力に阻害する

まず、Lhx2 が T-ALL 細胞株の増殖にどのような影響を与えるかを解析するため、レトロウイルスベクターを用いて T-ALL 由来を含む様々なヒトがん細胞株に Lhx2 を過剰発現させた。レトロウイルス感染細胞は EGFP を発現するため、EGFP 陽性細胞をソーティングによって分取後(Day0)、3 日間培養を行い(Day3)、空ベクター発現群と Lhx2 過剰発現群の増殖能の変化を比較解析した。Lhx2 を過剰発現させた 5 種類全てのヒト T-ALL 由来細胞株(CCRF-CEM, Molt-4, Jurkat, TALL-1, PEER)は空ベクター群に比べ、有意に増殖が阻害されていた (図 1 A~E)。しかし、ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株 Raji、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3 や骨肉腫由来細胞株 Saos-2 では、増殖抑制効果は観られなかった (図 2 A~C)。意外なことに、Lhx2 は実験に用いた全ての骨髓球性白血病細胞株の増殖も阻害した (図 3 A~D)。次に、Lhx2 の感染実験に用いた細胞株の LMO2 発現を RT-PCR とウエスタンブロッティングにより解析したところ、LMO2 は本実験に用いた全ての細胞株において発現が確認された (図 4 A, B)。LMO2 は造血発生と白血病発症に深く関係している核内タンパク質であるが、肺や大腸を含めた多くの臓器でも発現しており (<https://www.proteinatlas.org/>)、本実験の結果はそれと合致している。今回の実験結果は、Lhx2 の過剰発現が単に細胞毒性を持っているのではなく、細胞種に依存して毒性を示していることを示唆する。

Lhx2 の過剰発現は T-ALL 細胞株の LMO2 を mRNA レベルではなくタンパクレベルで低下させる

Lhx2 による T-ALL 細胞株の増殖抑制が LMO2 タンパク質の低下によるものかを明らかにするため、Lhx2、または空ベクターを CCRF-CEM 細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現させ、Day0 における LMO2 タンパク量をウェスタンブロットティングにより比較した。Lhx2 過剰発現 CCRF-CEM 細胞では、LMO2 タンパク量が劇的に減少していた (図 5 A)。さらに定量的なデータを得るため、EGFP 陽性細胞をソーティングし、3 または 6 日間培養後 (Day3、または Day6)、細胞内 FACS 解析を行い LMO2 のタンパク量変化を定量したところ、LMO2 の蛍光輝度が顕著に低下していることが明らかとなった (図 5 B)。次に、Lhx2 による LMO2 タンパク量の減少が当初の仮説通り LMO2 タンパク質の分解によるものなのか、または LMO2 の mRNA 発現量の低下によるものなのかを明らかにするため、Day0 と Day3 における Lhx2、または空ベクター過剰発現 CCRF-CEM 細胞の LMO2 遺伝子発現の変化を定量的 PCR により解析したところ、LMO2 発現量は Lhx2 の過剰発現に影響を受けないことが判明した (図 5 C)。これらの結果は、Lhx2 が T-ALL 細胞株の LMO2 を mRNA レベルではなくタンパクレベルで低下させていることを示す。

Lhx2 の過剰発現は LMO2 複合体の下流遺伝子の発現を低下させる

LMO2 は、転写補助因子 LDB1 とそれぞれ 2 分子ずつからなるヘテロテトラマーを形成し、ここに RUNX1、GATA ファミリー、 β HLH 因子、ETS ファミリーなどの転写因子を呼び込み、転写を正負に調節する³⁹。LMO2 は LDB1、ERG、FLI1 と複合体を形成し、下流エフェクター因子 *HHEX* のエンハンサー領域、LMO2 のプロモーター領域、ERG 及び *FLI1* のプロモーター、エンハンサー領域

に結合し、ポジティブフィードバックを形成していることが報告されている⁴⁰。

そこで、まず、増殖アッセイに用いた細胞株が HHEX を発現しているかどうかをウエスタンブロッティングにより確認したところ、Lhx2 耐性であった Raji のみ HHEX 陰性であった (図 4 B)。続いて、Lhx2 の発現がこの LMO2 複合体の転写産物に影響を与えているかを定量的 PCR によって評価した (図 6)。FLII の発現は Day0 では Lhx2 過剰発現群で減少傾向にあったものの、Day3 では空ベクター群と発現量に差は見られなかった。これに対して、HHEX、ERG は Lhx2 過剰発現群において劇的に発現量の低下が確認された。ERG は継時的に発現低下していることが明らかとなった。これらに加えて、Lhx2 の下流因子として知られている SOX4 の発現が上昇していたことから、Lhx2 が LMO2 と競合的に LDB1 に結合し、LMO2 複合体の形成を阻害していることが示唆される。さらに、T-ALL 患者で LMO2 と共に発現亢進の観られる NOTCH1 遺伝子とその下流遺伝子 HES1、MYC、CCND3 の発現変化を解析したところ、NOTCH1 の有意な発現低下、CCND3 を除く NOTCH シグナルの下流遺伝子の顕著な発現減少が確認された。以上の結果は、Lhx2 が LMO2 複合体の下流因子と NOTCH1 遺伝子の発現を低下させることで T-ALL の増殖を阻害する可能性を示唆する。

Lhx2 と Lmo2 の同時過剰発現は Lhx2 による T-ALL 細胞株への増殖抑制効果を緩和する

Lhx2 による LMO2 のタンパク量低下、及び下流遺伝子の発現低下が直接的に増殖抑制活性に寄与しているのであれば、Lmo2 を再導入することで Lhx2 による効果が消失すると考えられる。また、コア因子である Ldb1 を Lhx2 と同時に

過剰発現させれば、LMO2 タンパク質が安定化すると考えられるので、Lhx2 の効果を弱められる可能性がある。そこで、Lhx2 と Lmo2 または Ldb1 をそれぞれ EGFP と EYFP と共発現させ、EGFP と EYFP の二重陽性細胞をソーティングによって純化し、増殖能の変化を解析した (図 7 A)。これまでの結果と合致して、Lhx2 単独発現群は空ベクターのみ、または Lmo2 単独群に比べて増殖が抑制されていた。これに対し、Lhx2 と Lmo2 の同時過剰発現群では、Lhx2 単独に比べ、有意に増殖抑制効果の緩和が観られた。このような効果は、Lhx2 と Ldb1 を同時に過剰発現させた際には確認されなかった。これらの細胞集団で実際に LMO2・HHEX タンパク質の回復が起こっているのかを調べるため、細胞内 FACS 解析を行ったところ、Lhx2 と Lmo2 の同時過剰発現集団では、Lhx2 単独発現集団に比べ、LMO2・HHEX 共にタンパク量の増加傾向が観られた (図 7 B)。これらの結果は、Lhx2 の T-ALL に対する増殖抑制効果は LMO2 タンパク量の低下が一因となっていることを示す。

Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制効果は LMO2 複合体の下流エフェクターの同時過剰発現では回復しない

LMO2 タンパク量の低下による下流遺伝子の発現低下が Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制活性の責任を担っているのであれば、Lhx2 とその下流遺伝子を共発現させれば、Lhx2 と Lmo2 の同時過剰発現実験の結果を再現することが期待される。そこで、Lhx2 過剰発現時に顕著に発現低下の観られた HHEX、ERG、c-Myc を Lhx2 と同時に過剰発現させて、これらの遺伝子による影響を調べた (図 8)。その結果、いずれの遺伝子を Lhx2 と同時に過剰発現させても Lmo2 の

ような緩和効果は観られなかった。この結果は、Lhx2 による増殖抑制効果は LMO2 複合体の単一の下流因子のみではなく、複数の下流因子の発現を同時に過剰発現させる必要があることを示唆する。

Lhx2 は T-ALL 細胞を G₀ 期へ移行させてからアポトーシスを誘導する

Lhx2を過剰発現させたT-ALL細胞株は縮小し、歪な細胞形態であった (図 9 A)。そこで、この増殖阻害が細胞周期停止によるのか、アポトーシス亢進によるのかをLhx2を過剰発現させたCCRF-CEM細胞を用いて調べた。Day3において、空ベクター群、Lhx2過剰発現群共にアポトーシスを起こしている細胞はほとんど検出されなかったのに対し、Lhx2過剰発現群ではG₁/G₀期の細胞集団の割合が顕著に増加していた (図 9 B, C)。そこで、この集団がG₁、G₀期のどちらであるのかを調べるために、増殖マーカーKi-67で染色を行ったところ、Lhx2過剰発現群ではKi-67陽性集団の比率が有意に低下していた (図 10 A)。さらに、Pyronin Y とHoechst 33342で二重染色を行い、両試薬の取り込みが低い細胞の割合が顕著に増加していることもLhx2過剰発現群がG₀期への移行を促していることを支持する (図 10 B)。次に、この細胞周期が停止した後、再び細胞周期が動くのか、細胞死が誘導されるのかを明らかにするため、Day3細胞をさらに3日間培養したところ、Lhx2過剰発現群のみでAnnexin V⁺かつPI⁺のアポトーシスを起こした細胞集団が確認された (図 10 C)。さらに、Lhx2によるG₀期への移行にG₁サイクリン関連遺伝子の発現低下が伴っているかを確認するため、まずはT-ALL細胞株のG₁サイクリン関連遺伝子群の発現解析を行ったところ、Jurkatを除くT-ALL細胞株ではDタイプサイクリンのうちCCND3 (CYCLIN-D3)が排他的に発現してお

り、*CDK4*と*CDK6*はすべての細胞において発現が確認された(図 1 1 A)。CCRF-CEMとJurkatでは、*MYC*に加えて*MYCN*の発現も観られた。そこで、Lhx2を過剰発現させたCCRF-CEMの*CDK4*、*CDK6*及び*MYCN*の発現量を定量的PCRにより空ベクター群と比較したところ、Day3においていずれの遺伝子も有意な発現低下が確認された(図 1 1 B)。Lhx2は、G₁サイクリン関連遺伝子のうち、*CDK4*と*CDK6*の発現低下を介してT-ALL細胞の増殖を阻害している可能性が考えられる。以上の結果は、Lhx2はT-ALL細胞の細胞周期をG₀期へ移行させ、最終的にアポトーシスを誘導することを示す。

Lhx2 の T-ALL 増殖抑制活性には C 末端側 LIM ドメインとホメオドメインが必須である

Lhx2 は T-ALL 細胞の増殖を阻害するが、Lhx2 は 2 つのタンパク質同士の結合を介在する LIM ドメインと DNA 結合能をもつホメオドメインからなる転写制御因子であるため、このまま治療に用いることはできない。しかし、Lhx2 の活性を模倣する物質は T-ALL に対する治療薬となる可能性を秘めている。そこで、Lhx2 の最小作用領域の特定を行うため、LIM ドメインまたはホメオドメイン欠失体、2 つの LIM ドメインの片方あるいは両方に不活性化変異を導入した変異体をそれぞれ作成し、活性への影響を解析した (図 1 2 A,B、図 1 3 A)。その結果、両欠失体 (Δ HD、 Δ LIM)及び両方の LIM ドメインに不活性化変異を入れた変異体 (mtNC)では完全に CCRF-CEM 細胞に対する増殖抑制効果が消失していた。C 末端 LIM ドメイン変異体 (mtC)では、全長の Lhx2 よりも弱いものの

活性が保持されていた。これに対し、N 末端側 LIM ドメイン変異体 (mtN)は全長の Lhx2 と同等の活性を保有していた。さらに、これらの欠失・変異体を導入した際に LMO2 のタンパク量の変化を細胞内 FACS 解析により調べたところ、活性を示さなかった欠失・変異体では細胞内の LMO2 量がコントロールと比べて変化していなかったのに対し、活性を示した mtN および mtC では減少が確認され、活性の強い mtN では元の Lhx2 と同等の LMO2 量まで低下していた (図 1 3 B)。以上の結果は、Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制活性には C 末端側の LIM ドメインとホメオドメインが必須の役割を果たしていることを示唆する。

Lhx ファミリーのうち Lhx2 と Lhx6 が最も強く T-ALL 細胞の増殖を阻害する

Lhx ファミリーは Lhx1~Lhx9 の 8 つの遺伝子と Lmx1a,b、及び Islet1,2 の遺伝子群から構成されている。Lhx1~9 のうち、Lhx2 よりも活性の強い他のファミリー遺伝子が存在すれば、それは Lhx2 よりも T-ALL に対する治療薬開発の際に有望であると考えられる。そこで、Lhx1~Lhx8(Lhx7)の 6 つのファミリー遺伝子とホメオドメインを保持するが LIM ドメインを持たない HoxB4 をネガティブコントロールとしてクローニングし、CCRF-CEM 細胞へ導入して増殖への影響を Lhx2 と比較した (図 1 4 A, B)。その結果、Lhx2 から配列の相同性の低い Lhx1 と Lhx5 は弱い活性、それ以外の Lhx3、Lhx4、Lhx6、Lhx8 は強い活性を示した。特に、Lhx6 は Lhx2 と同等の活性を有していた。次に、これらのファミリー遺伝子を導入した際の LMO2 及び HHEX タンパク量を細胞内 FACS 解析により確認した (図 1 5 A, B)。驚くべきことに、すべての Lhx ファミリーが LMO2 量を低下させていた。この効果は LIM ドメインを有さない HoxB4 では観られなかった

ため、ホメオドメインではなく LIM ドメインによるものと考えられる。HHEX は Lhx4、Lhx6、及び Lhx8 で顕著にタンパク量の減少が観られ、最も増殖抑制活性の強かった Lhx6 は Lhx2 の強度と同等であった。以上の結果から、すべての Lhx ファミリーは LMO2 タンパクの減少を引き起こすことができるものの、フェノタイプとして増殖抑制効果を示すには HHEX などの LMO2 複合体の下流因子の発現低下を伴う必要があることを示唆する。

考察

本研究では、Lhx2 の強制発現が T-ALL 細胞の増殖を強力に抑制することを見出した。当初の予測通り、Lhx2 を過剰発現させた CCRF-CEM 細胞では、LMO2 の mRNA レベルではなくタンパクレベルの減少が起こっていた。Lmo2 を Lhx2 と同時に過剰発現させることで、Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制効果が緩和された。さらに、LMO2 複合体の下流エフェクター因子 HHEX、ERG の発現が顕著に低下していた。これらの実験結果は、Lhx2 による LMO2 タンパク量の低下は LMO2 複合体の機能を抑制していることを示唆する。しかし、Lmo2 を Lhx2 と同時に過剰発現させても完全に増殖抑制効果はレスキューされず、LMO2 複合体の下流因子と Lhx2 の同時過剰発現は、Lhx2 による増殖抑制効果を全く阻害できなかった。この事実は、Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制効果が LMO2 による HHEX または ERG の低下のみに起因するのではなく、複数の因子が協調して機能していることを示唆しており、二通りの可能性を与える。一つは、LMO2 複合体によって抑制を受けていた遺伝子の発現が上昇し、増殖を抑制していた可能性が考えられる。Lmo2/Tal1 複合体は、*Cd4* 遺伝子の発現を抑制することで胸腺細胞の分化を抑制しているという報告と一致して、Lhx2 を過剰発現させた CCRF-CEM 細胞では細胞表面の CD4 の発現が顕著に増加していた (data not shown)。二つ目は、Lhx2 はホメオドメインを持ち、様々な遺伝子のプロモーター/エンハンサーの TAATTA モチーフ配列に結合し転写を制御するため、Lhx2 により発現が上昇した遺伝子が T-ALL 細胞の増殖抑制効果に寄与している可能性が挙げられる。これは、Lhx2 のホメオドメイン欠失体が T-ALL 細胞の増殖抑制活性を持たないというデータによっても支持される。

先行研究において、Lhx2 により体外増幅された造血幹細胞様細胞は *Gata3*、*Sox4*、*Tal1* 遺伝子の発現が上昇していることが報告されていたため、Lhx2 を強制発現させた CCRF-CEM 細胞において上記の遺伝子発現変化を解析したところ、*SOX4* の有意な発現上昇が確認された (図 6)。しかしながら、*SOX4* 遺伝子を CCRF-CEM 細胞に強制発現させて増殖能の変化を解析したが、遺伝子導入による変化は全く確認されなかった (data not shown)。Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制時には *NOTCH1* 遺伝子とその標的遺伝子の一部が発現低下していたため、個々の遺伝子の変化だけではなく様々なシグナルが複雑に絡み合っていることが推察される。

Lhx2 を過剰発現させた CCRF-CEM 細胞は、まず G₀ 期に移行し、その後アポトーシスが誘導されることを実験的に示した。Lhx2 の過剰発現による G₁/G₀ アレストとアポトーシスの誘導、そして T リンパ球分化マーカー CD4 の発現亢進は、CCRF-CEM 細胞に p16^{INK4A} を強制発現させた先行研究の結果と類似している⁴¹。しかし、CCRF-CEM 細胞は p16^{INK4A} 遺伝子を両アリルとも欠失しているため、このサイクリンインヒビターの関与は否定される。正常胸腺細胞と T-ALL 細胞では、血球細胞に一般的に発現している Cyclin-D2 ではなく Cyclin-D3 が G₁ 期通過に必須である、と報告されている⁴²。実際、本研究で使用した Jurkat を除く 4 種類の T-ALL 細胞株と Raji は D タイプサイクリンのうち、*CYCLIN-D3* (*CCND3*)だけを発現していた(図 1 1 A)。しかし、Lhx2 を過剰発現させた CCRF-CEM 細胞群の *CCND3* mRNA レベルはベクターコントロール細胞群と有意差はなかった(図 6)。これに対し、*CCND3* の結合パートナーである *CDK4* と *CDK6* の発現レベルが低下していた(図 1 1 B)。加えて、*CDK6* の上流制御因子である

MYC と *MYCN* の発現がともに顕著に低下していた (図 6、図 11B)。しかし、*c-Myc* と *Lhx2* の同時過剰発現では *Lmo2* の場合と異なり *Lhx2* による増殖抑制をレスキューできなかった。したがって、*Lhx2* は *MYC*, *MYCN* の発現抑制に加えて他のメカニズムを介して、CCND3-CDK4/6 複合体の機能を阻害しているのかもしれない。

Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖阻害活性にはタンパク質結合性の C 末端側 LIM ドメインと DNA 結合性のホメオドメインが必須であった。意外なことに、LIM ドメインのみからなるホメオドメイン欠失体は活性を示さず、*LMO2* タンパク量の減少も引き起こさなかった。これは、ホメオドメインの存在が *LMO2* 未満の *LDB1* に対する K_d 値を示すために必須であることを示唆する。しかしながら、*Lhx2* と *mtN* に比べ、*mtC* 及び *mtNC* はタンパク発現量が低かったため、それぞれのタンパク質の細胞内絶対量が活性の差を反映している可能性は否定できない。続く *Lhx* ファミリーを用いた増殖アッセイの結果から、*Lhx2* と *Lhx6* が最も強い増殖抑制活性を持つことが判明した。各 *Lhx* ファミリータンパク発現量の総量に差があるため、*Lhx2* の欠失・変異体と同様に細胞内のタンパク量の総量が活性に影響を与えている可能性は完全に否定できない。しかし、他の *Lhx* ファミリー遺伝子に比べ総量の低い *Lhx8* が強力な活性を持っており、一概に細胞内タンパク質の総量だけで活性が決まっているのではないことが推察される。さらに、全ての *Lhx* ファミリーは CCRF-CEM 細胞の *LMO2* タンパクの量を低下させていることが明らかとなった。この結果は、ホメオドメインの存在が *LMO2* 未満の *LDB1* に対する K_d 値を与える上で要求されるという仮説を支持する。LIM ドメイン内の Zn フィンガー様ドメイン、DNA 認識部位であるホメオ

ドメインの C 末端側共に Lhx1, 5、Lhx3, 4、Lhx2, 9、Lhx6, 8 サブファミリー間では配列保存性が高い。CCRF-CEM の感受性も $Lhx2 \geq Lhx6, 8 > Lhx3, 4 > Lhx1, 5$ の順に高くなり、概ねサブファミリー間で保存されていると考えられる。しかし、LMO2 複合体の下流因子 HHEX のタンパク量に注目すると、Lhx6 と Lhx8 では Lhx6 の方が有意に存在量を減少させていた。この差異を元に Lhx6 と Lhx8 の配列をドメインごとに置換し、活性に決定的な領域を狭めていけば、Lhx サブファミリー間での活性の差を解明できるかもしれない。この情報は、Lhx2 の活性を模倣する薬剤を開発していく上で有用である。

表1 PCRに用いたプライマーリスト

	Forward (5' - 3')	Reverse (3' - 5')
<i>LMO2</i>	AGTACTGGCACGAGGACTGC	GAATCCGCTTGTACACAGGAT
<i>HHEX</i>	TCAGAATCGACGCGCTAAAT	AGGGCGAACATTGAGAGCTA
<i>ERG</i>	AAGTAGCCGCCTTGCAAAT	GCGGCTGAGCTTATCGTAGT
<i>FLI1</i>	TGGCCTCAACAAAAGTCCTC	GAATTGCCACAGCTGGATCT
<i>SOX4</i>	TCTCCAACCTGGTTTTTCACC	AGCCAGCCCTGCTTACTTTT
<i>NOTCH1</i>	CTGAAGAACGGGGCTAACAA	CAGGTTGTACTCGTCCAGCA
<i>HES1</i>	CGGACATTCTGGAAATGACA	CATTGATCTGGGTCATGCAG
<i>MYC</i>	CCTACCCTCTCAACGACAGC	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
<i>CCND3</i>	AGACCTTTTGGCCCTCTGT	AGCTTCGATCTGCTCCTGAC
<i>CCND1</i>	CCTGTCCCTACTACCGCCTCA	TCCTCCTCTTCCTCCTCCTC
<i>CCND2</i>	GCTGGAGGTCTGTGAGGAAC	CCAAGAAACGGTCCAGGTAA
<i>CDK4</i>	GAAACTCTGAAGCCGACCAG	AGGCAGAGATTCGCTTGTGT
<i>CDK6</i>	CATTCAAAATCTGCCCAACC	GGTGGGAATCCAGGTTTTCT
<i>MYCN</i>	CACAAGGCCCTCAGTACCTC	AGGCATCGTTTGAGGATCAG
<i>GAPDH</i>	GATCATCAGCAATGCCTCCT	TTCAGCTCAGGGATGACCTT

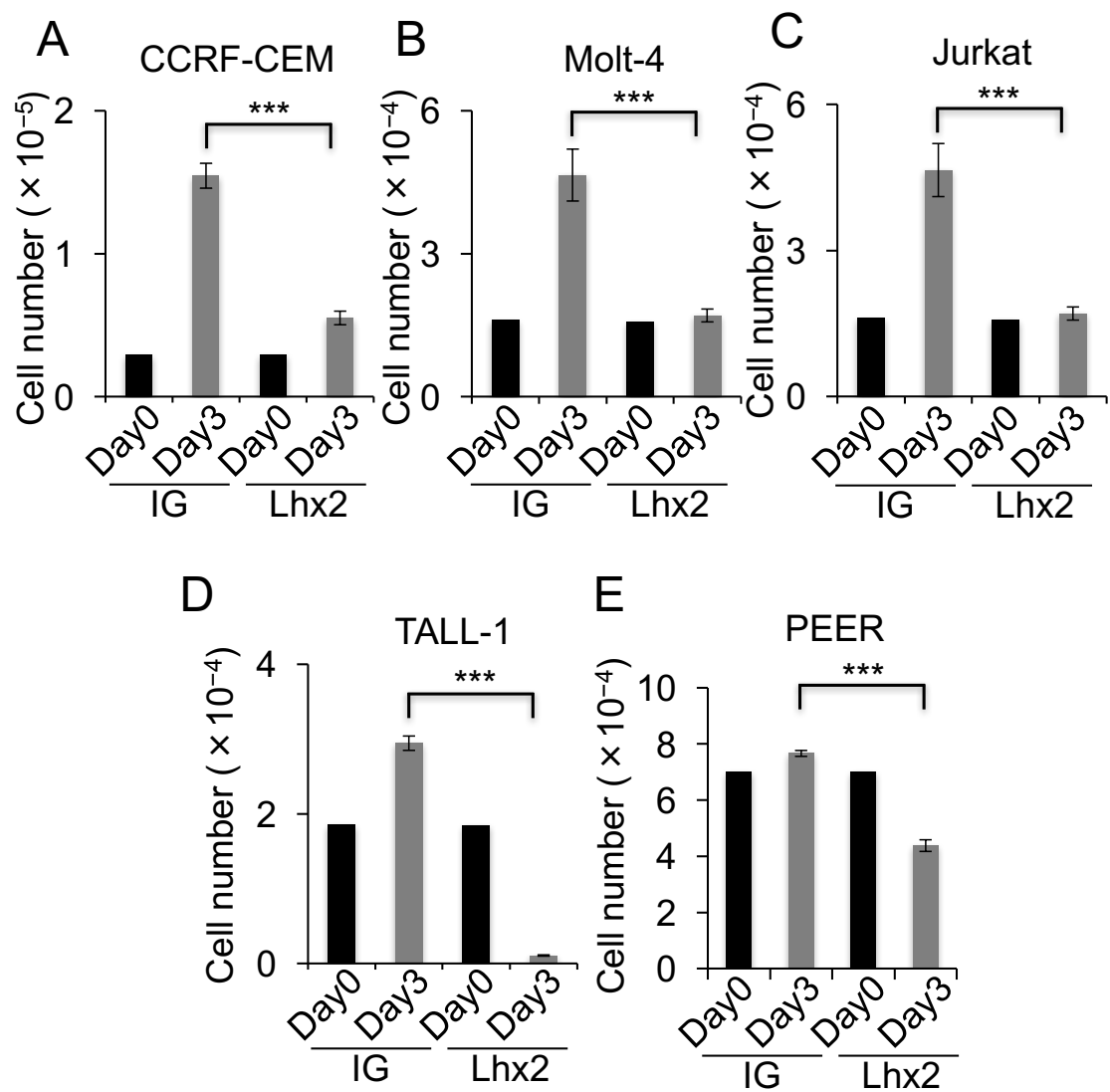


図1 Lhx2の強制発現はヒトT-ALL細胞株の増殖を抑制する

(A-E) 空ベクター(IG)またはLhx2レトロウイルスベクターをスピニン感染法により各ヒトT-ALL細胞株に感染させ、3日間培養した後、ソーティングによりウイルス感染細胞を単離した(Day0)。さらに3日間の培養後(Day3)、セルソーターにより細胞の絶対数を測定した (mean ± S.E., n=3). ***, $P < 0.001$.

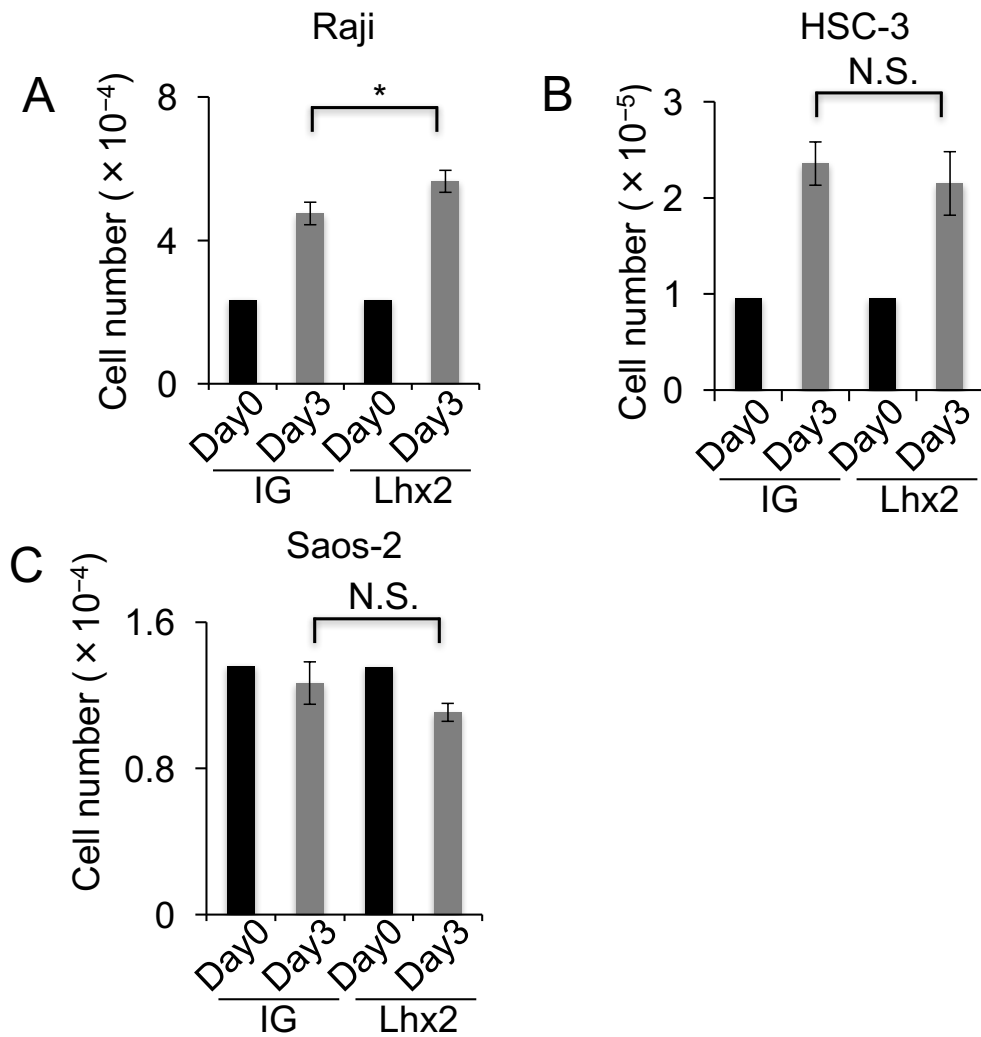


図2 Lhx2は単に細胞毒性を示していたのではない

(A-C) 空ベクター(IG)またはLhx2レトロウイルスベクターをスピニンフェクション法により各ヒトがん細胞株に感染させ、3日間培養した後、ソーティングによりウイルス感染細胞を単離した(Day0)。さらに3日間の培養後(Day3)、セルソーターにより細胞の絶対数を測定した (mean \pm S.E., n=3)。*, $P < 0.05$, N.S., not significant.

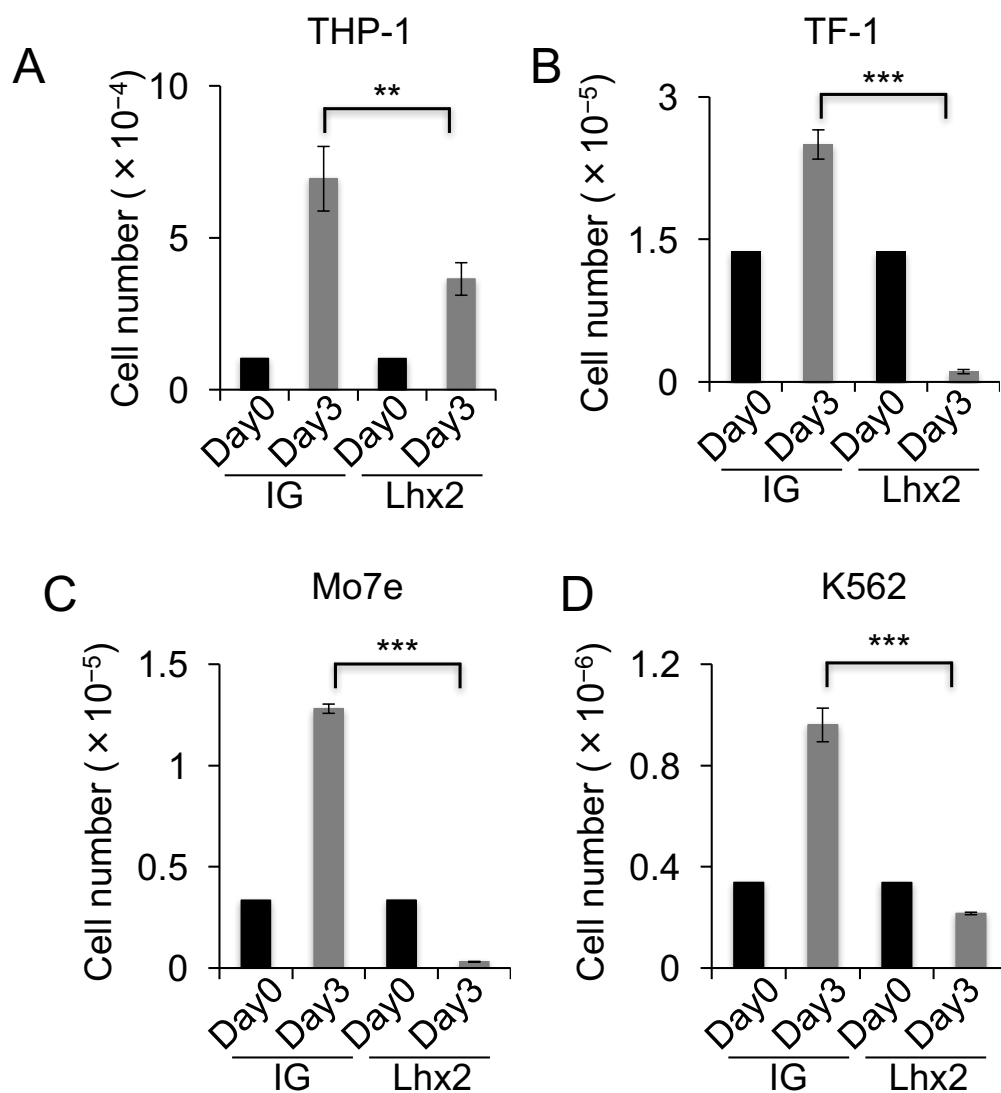


図3 Lhx2はヒトAML細胞株の増殖も抑制する

(A-C) 空ベクター(IG)またはLhx2レトロウイルスベクターをスピニンフェクション法により各ヒトAML細胞株に感染させ、3日間培養した後、ソーティングによりウイルス感染細胞を単離した(Day0)。さらに3日間の培養後(Day3)、セルソーターにより細胞の絶対数を測定した (mean \pm S.E., n=3)。**, $P<0.01$ 、***, $P<0.001$ 。

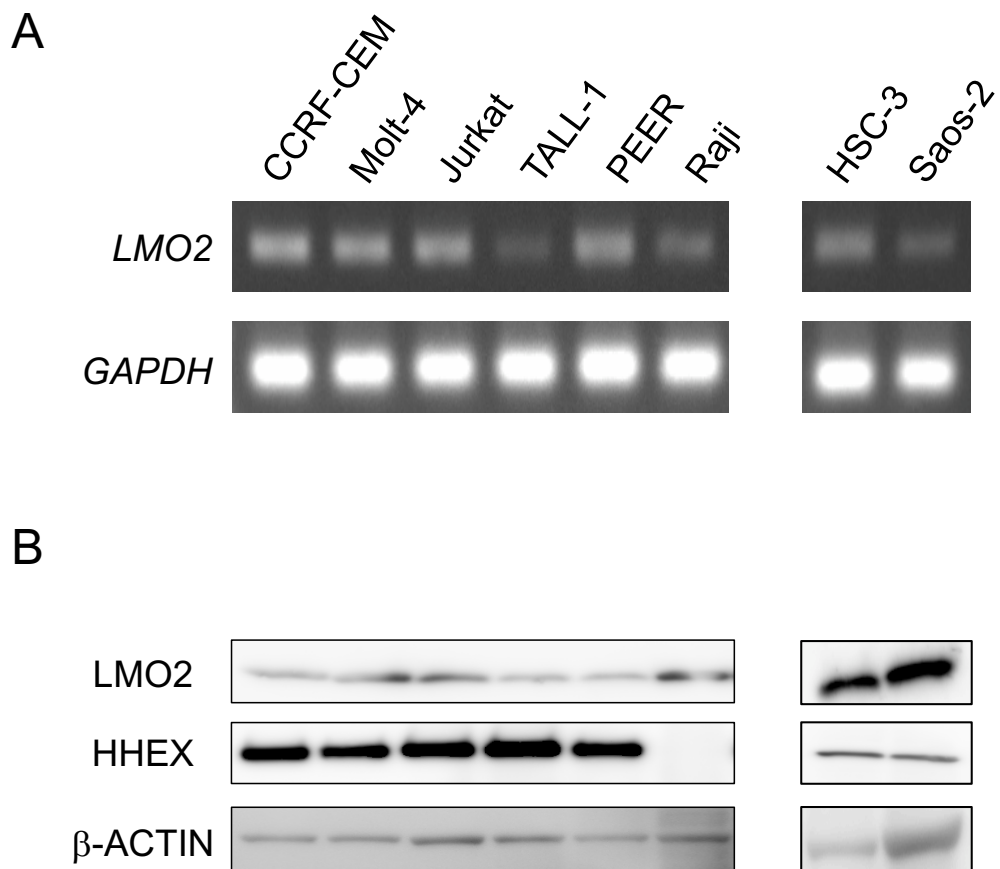


図4 各種ヒトがん細胞株におけるLMO2の発現

(A) RT-PCRにより、各種ヒトがん細胞株の*LMO2*発現を解析した。*GAPDH*はテンプレートコントロールとして用いた。

(B) ウェスタンブロッティングにより、各種ヒトがん細胞株における*LMO2*と*HHEX*タンパク質の発現を比較した。 β -ACTINはローディングコントロールとして用いた。

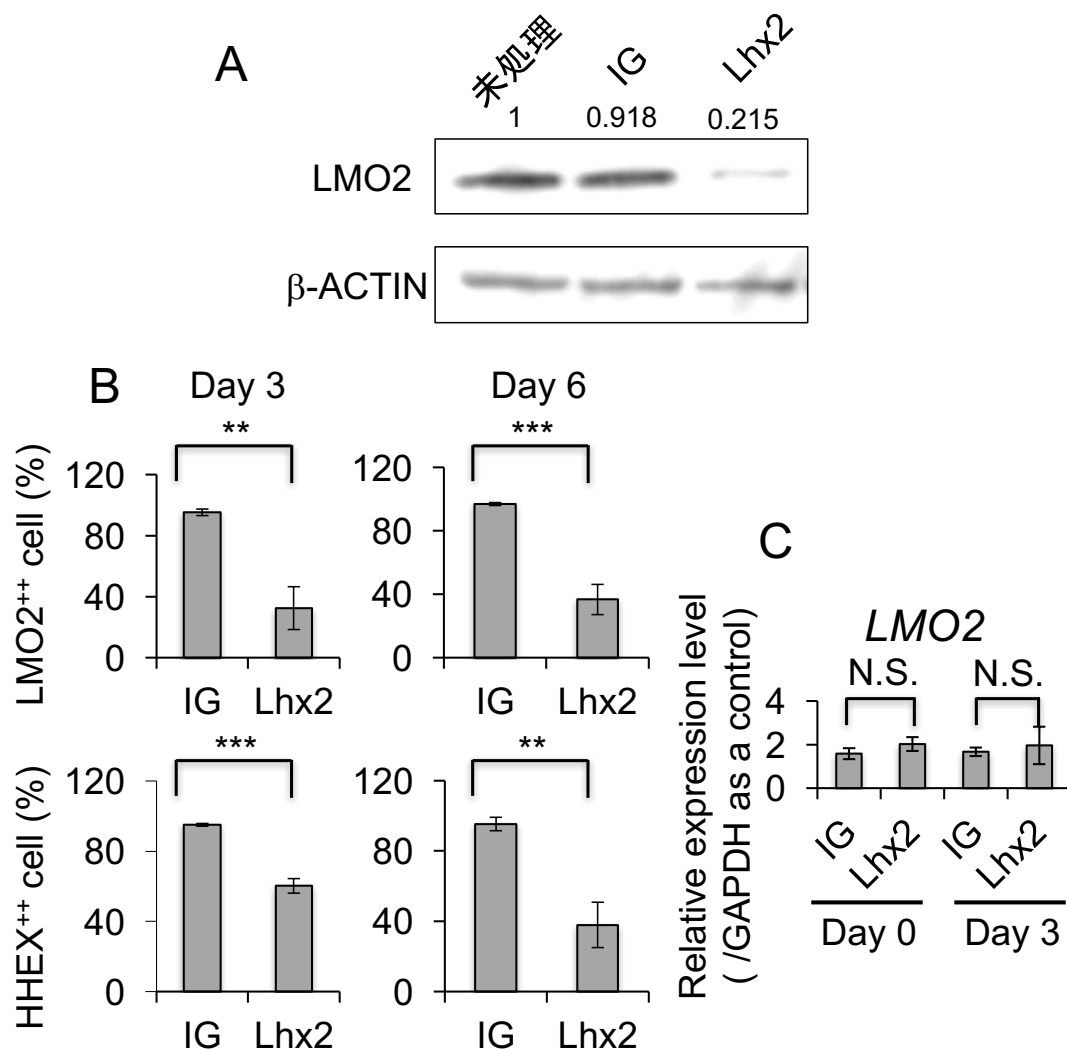


図5 Lhx2はCCRF-CEM細胞のLMO2タンパク量を低下させる

(A) 空ベクター(IG)またはLhx2を導入したCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、ウエスタンブロットティングによりLMO2タンパク量を比較した。各数字はLMO2バンド強度をβ-ACTINバンド強度で除し、未処理に対する比を示す。β-ACTINはローディングコントロールとして用いた。

(B) IGまたはLhx2を導入したCCRF-CEM細胞をソーティングによって分離し、さらに3または6日間培養を行った。EGFP⁺細胞を回収し、細胞内FACS解析を行った (mean ± S.E., n=3)。**, $P < 0.01$ 、***, $P < 0.001$ 。

(C) IGまたはLhx2を導入したCCRF-CEM細胞をソーティングによって分離した際、または3日間培養を行った後、EGFP⁺細胞からtotalRNAを抽出し、LMO2遺伝子発現量を定量的PCRにより解析した (mean ± S.E., n=3)。N.S., not significant。

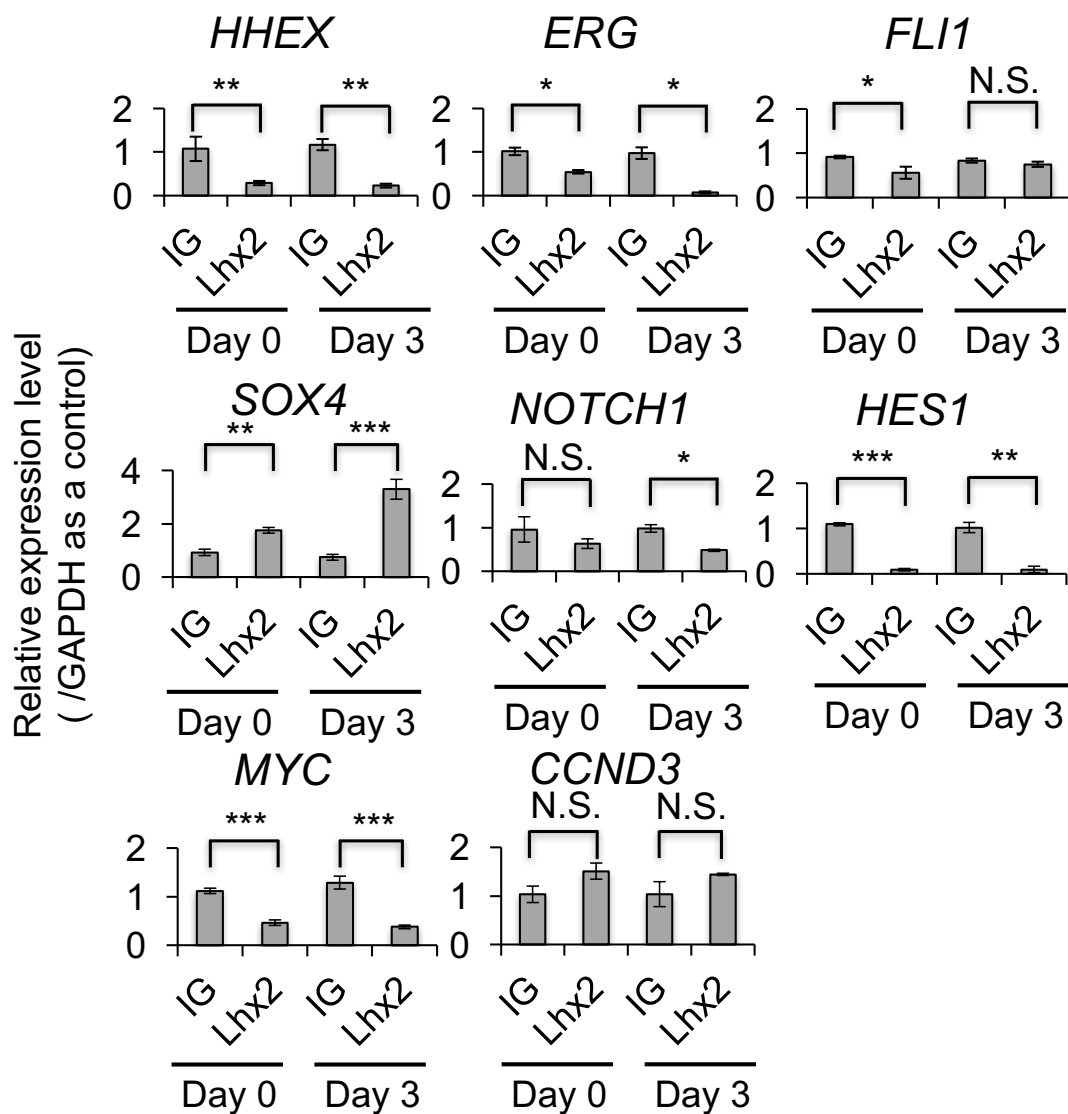


図6 Lhx2はLMO2複合体の下流遺伝子の発現量を低下させる

空ベクター(IG)またはLhx2を導入したCCRF-CEM細胞をソーティングによって分離した際、または3日間培養を行った後、EGFP⁺細胞からtotalRNAを抽出し、LMO2複合体の下流遺伝子とNOTCHシグナル関連遺伝子発現を定量的PCRにより解析した (mean \pm S.E., n=3)。*, $P < 0.05$ 、**, $P < 0.01$ 、***, $P < 0.001$ 、N.S., not significant.

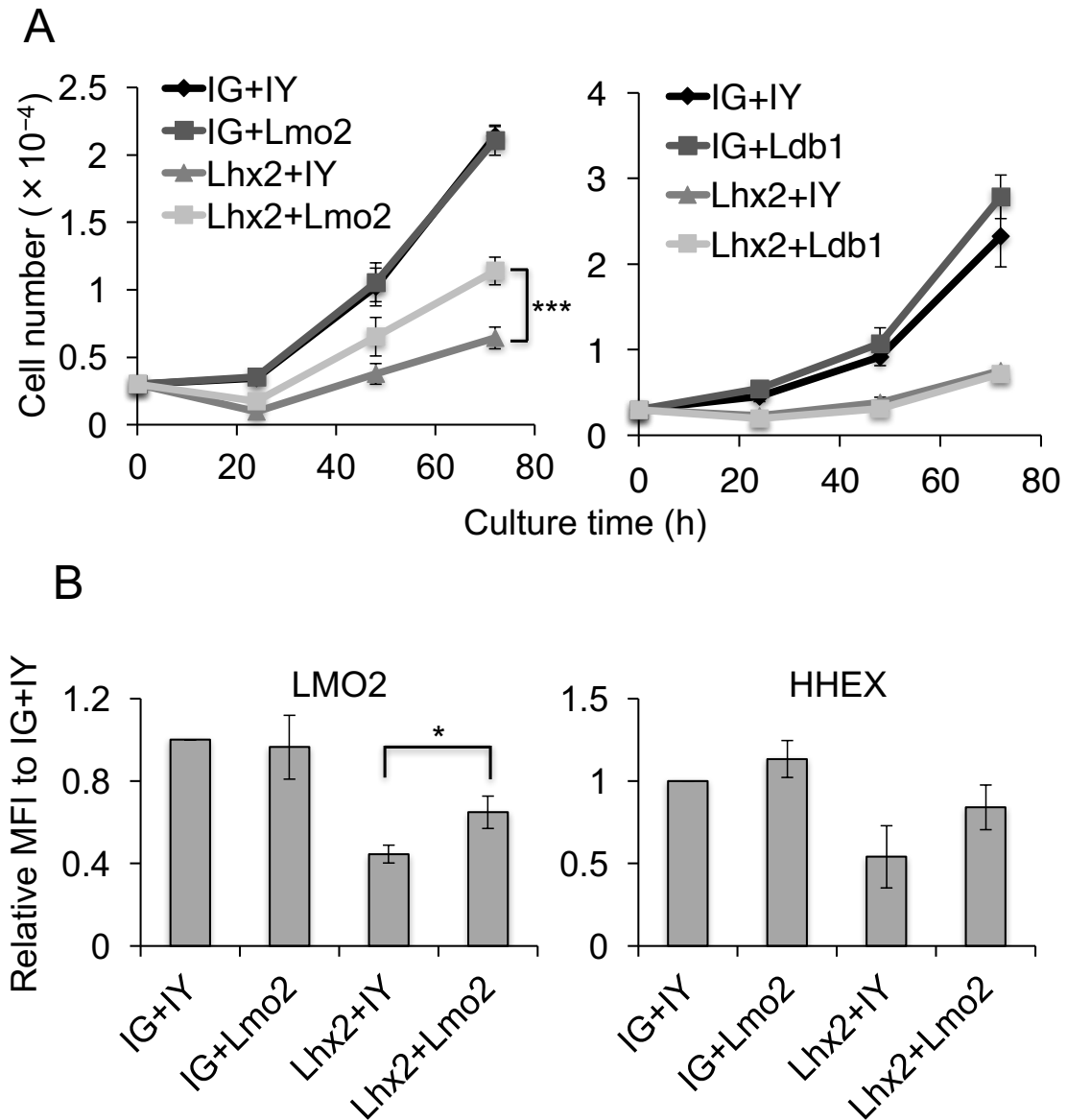


図7 Lhx2とLmo2の同時過剰発現はLhx2による増殖抑制効果を緩和させる

(A) EGFPをサロゲートマーカーとして発現する空ベクター(IG)またはLhx2と、EYFPをサロゲートマーカーとして発現する空ベクター(IY)またはLmo2、Ldb1をそれぞれ導入し、EGFPとEYFPの二重陽性 CCRF-CEM細胞をソーティングによって分離して増殖能の変化を解析した (mean \pm S.E., $n=5$).***, $P<0.001$.

(B) EGFPとEYFPの二重陽性CCRF-CEM細胞をセルソーティングによって回収し、細胞内FACSにより LMO2またはHHEXの蛍光強度を比較した (mean \pm S.E., $n=3$).*, $P<0.05$.

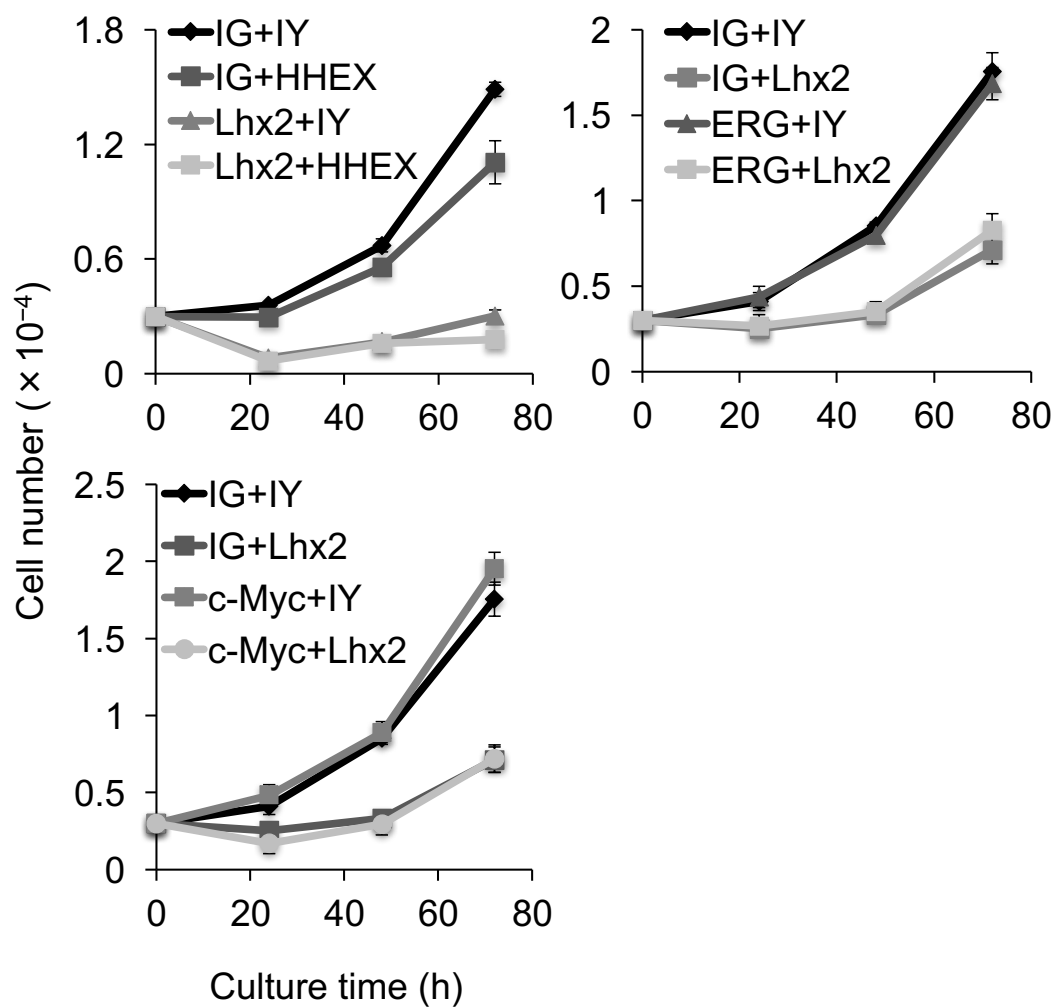


図8 Lhx2とLMO2の下流遺伝子の同時過剰発現はLhx2による増殖抑制効果を打ち消せない
EGFPまたはEYFPをサロゲートマーカーとして発現する空ベクター(IGまたはIY)とLhx2、またはLMO2下流遺伝子(HHEX、ERG、c-Myc)をそれぞれ導入し、EGFPとEYFPの二重陽性CCRF-CEM細胞をソーティングによって分離して増殖能の変化を解析した (mean ± S.E., n=5)。

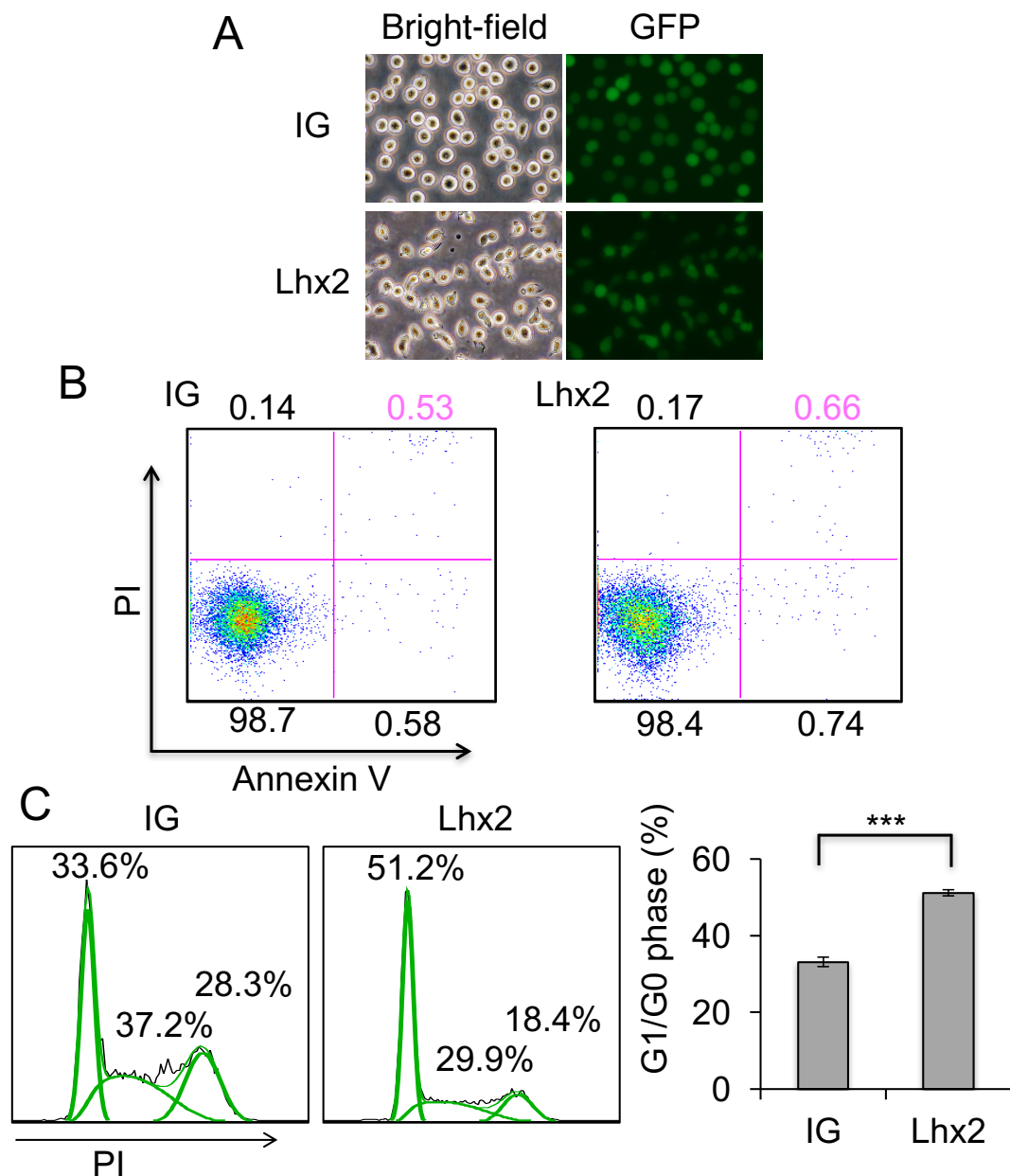


図9 Lhx2はCCRF-CEM細胞をG₁/G₀期に移行させる

(A) 空ベクター(IG)またはLhx2を過剰発現させたCCRF-CEM細胞の形態。

(B) IGまたはLhx2を発現させたCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、3日間培養後、PIとAnnexin Vで染色し、二重陽性の後期アポトーシス細胞集団の比率を解析した。

(C) IGまたはLhx2を発現させたCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、3日間培養後、PIで染色し、各細胞のDNA含量から細胞周期の各段階の比率を解析した。左図は代表的なFACSヒストグラム、右図はG₁/G₀期の細胞集団の割合を示す (mean ± S.E., n=3)。***, $P < 0.001$.

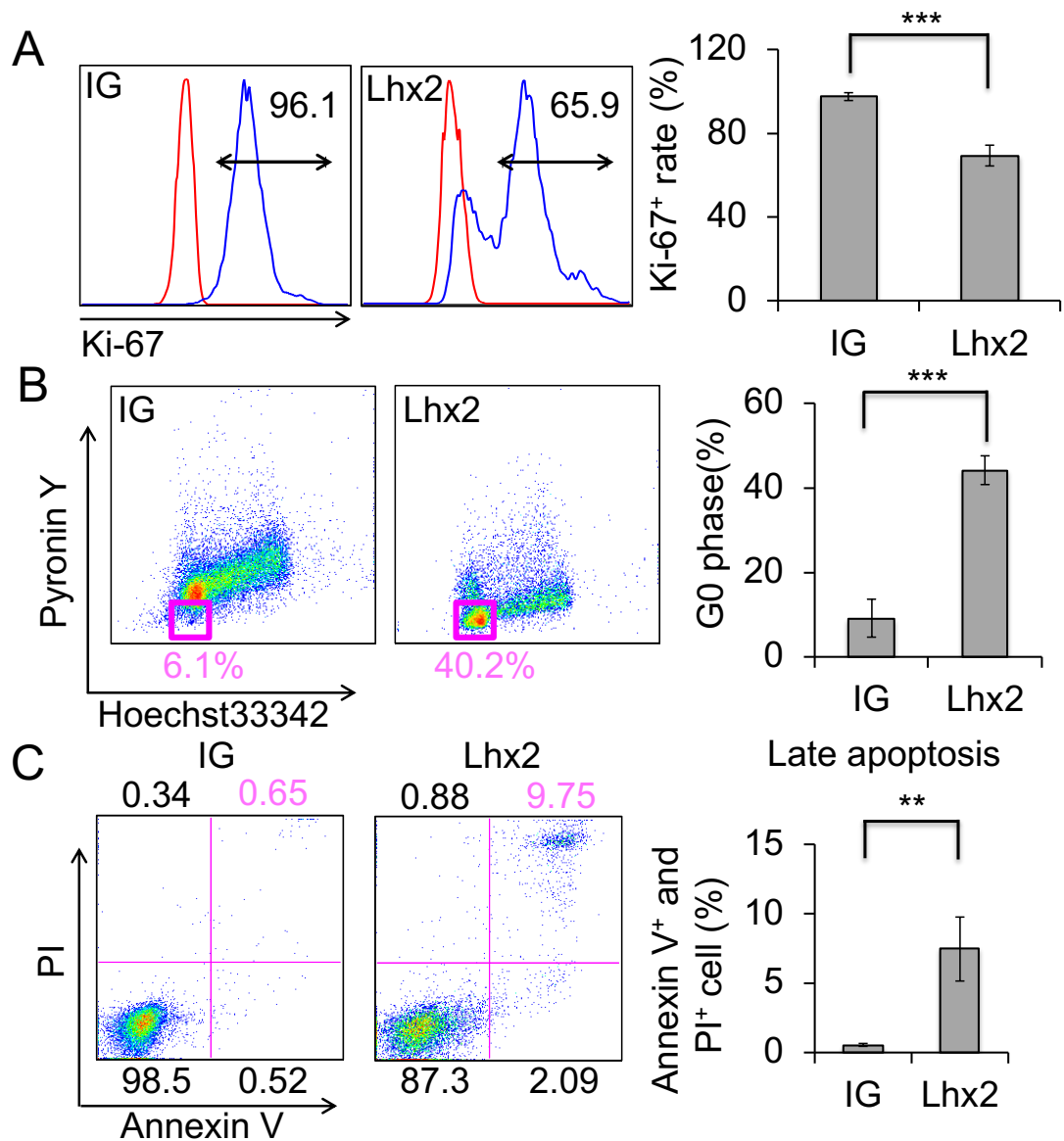


図10 Lhx2はCCRF-CEM細胞をG₀期に移行させ、アポトーシスを誘導する

(A) 空ベクター(IG)またはLhx2を過剰発現させたCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、3日間培養後、EGFP⁺細胞をKi-67で染色した。左図は代表的なFACSヒストグラム、右図はKi-67⁺の細胞集団の割合を示す (mean ± S.E., n=3)。***, $P<0.001$ 。

(B) IGまたはLhx2を発現させたCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、3日間培養後、Pyronin YとHoechst33342で染色し、二重陰性のG₀期の集団の比率を解析した。左図は代表的なFACSヒストグラム、右図はG₀期の細胞集団の割合を示す (mean ± S.E., n=3)。***, $P<0.001$ 。

(C) IGまたはLhx2を発現させたCCRF-CEM細胞をソーティングによって回収し、6日間培養後、PIとAnnexin Vで染色し、二重陽性の後期アポトーシス細胞集団の比率を解析した。左図は代表的なFACSヒストグラム、後期アポトーシス集団の割合を示す (mean ± S.E., n=3)。**, $P<0.01$ 。

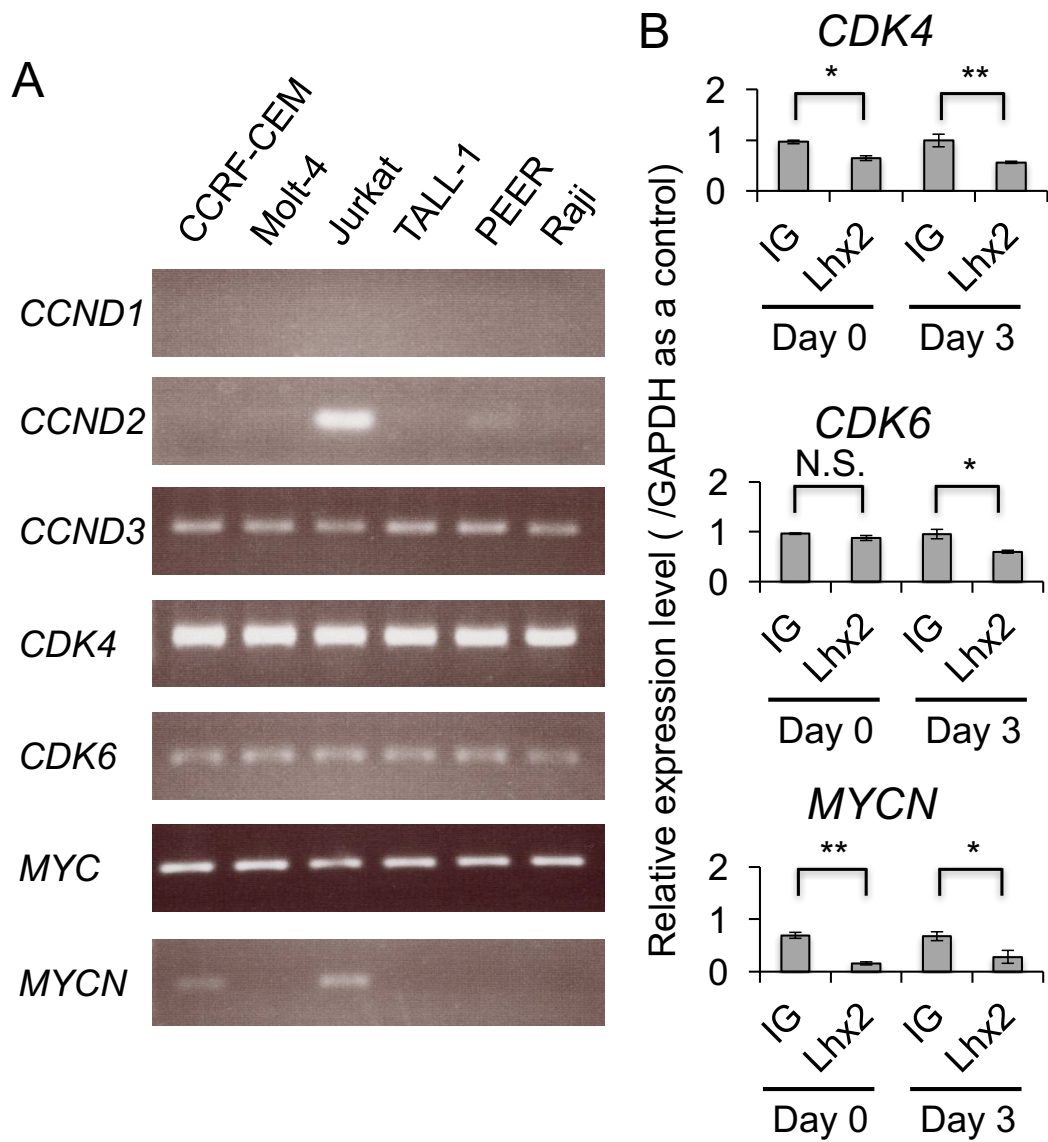


図11 Lhx2はCDK4/6の遺伝子発現を低下させる

(A) RT-PCRにより、各種ヒトT-ALL細胞株のG1関連遺伝子発現を解析した。GAPDHはテンプレートコントロールとして用いた。

(B) 空ベクター(IG)またはLhx2を導入したCCRF-CEM細胞をソーティングによって分離した際、または3日間培養を行った後、EGFP⁺細胞からtotalRNAを抽出し、G1関連遺伝子発現を定量的PCRにより解析した (mean \pm S.E., n=3)。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant.

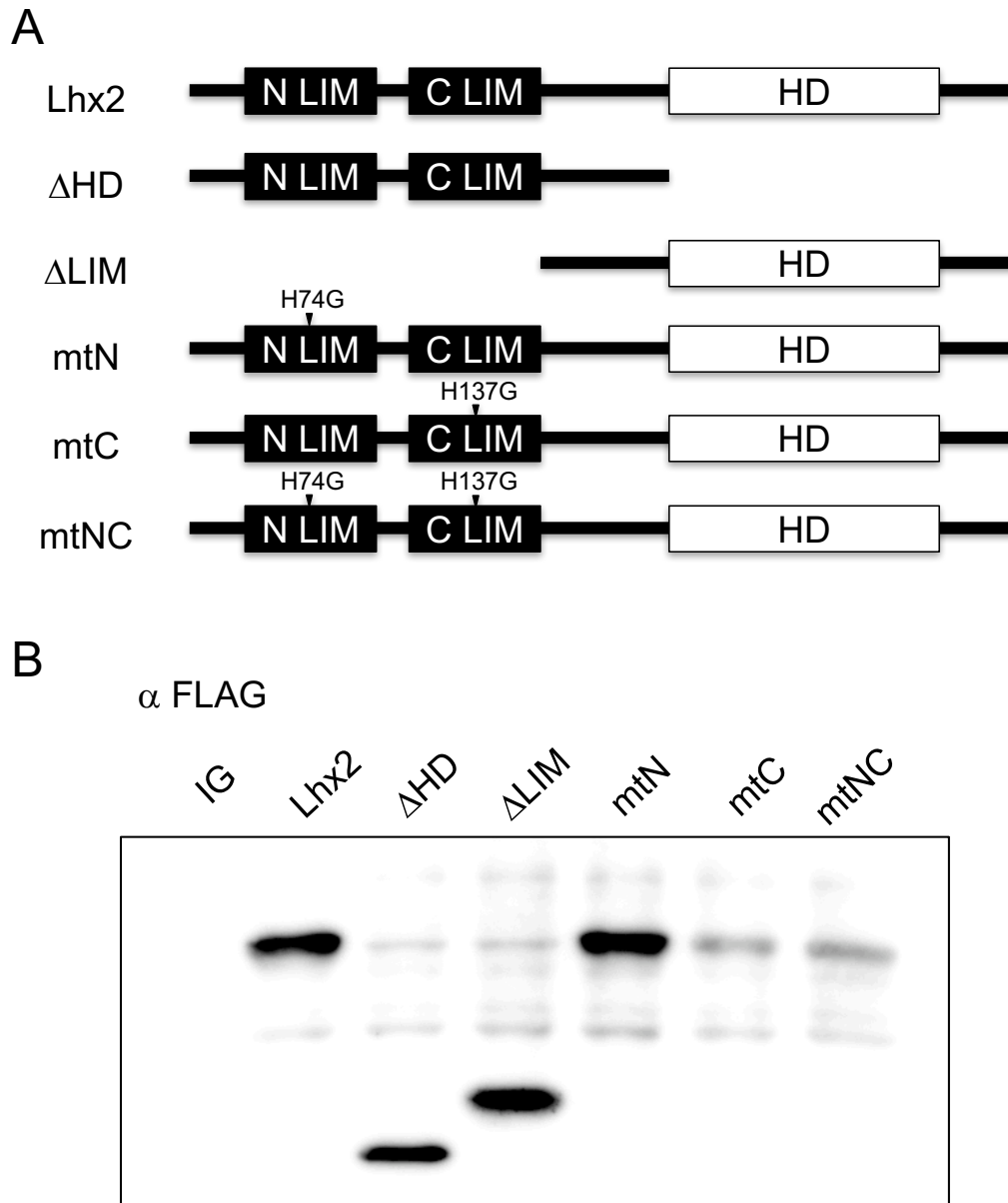


図12 Lhx2の機能欠失・変異体の作製

(A) Lhx2の機能欠失・変異体の模式図。NまたはC LIMはそれぞれN末端側LIMドメインC末端側LIMドメインを、HDはホメオドメインを示す。LIMドメイン上の英数字は導入変異を示す。

(B) 293T細胞に一過性に空ベクター(IG)またはLhx2の全長、機能欠失・変異体を発現させ、ウエスタンブロットティングにより、タンパク質の発現を確認した。

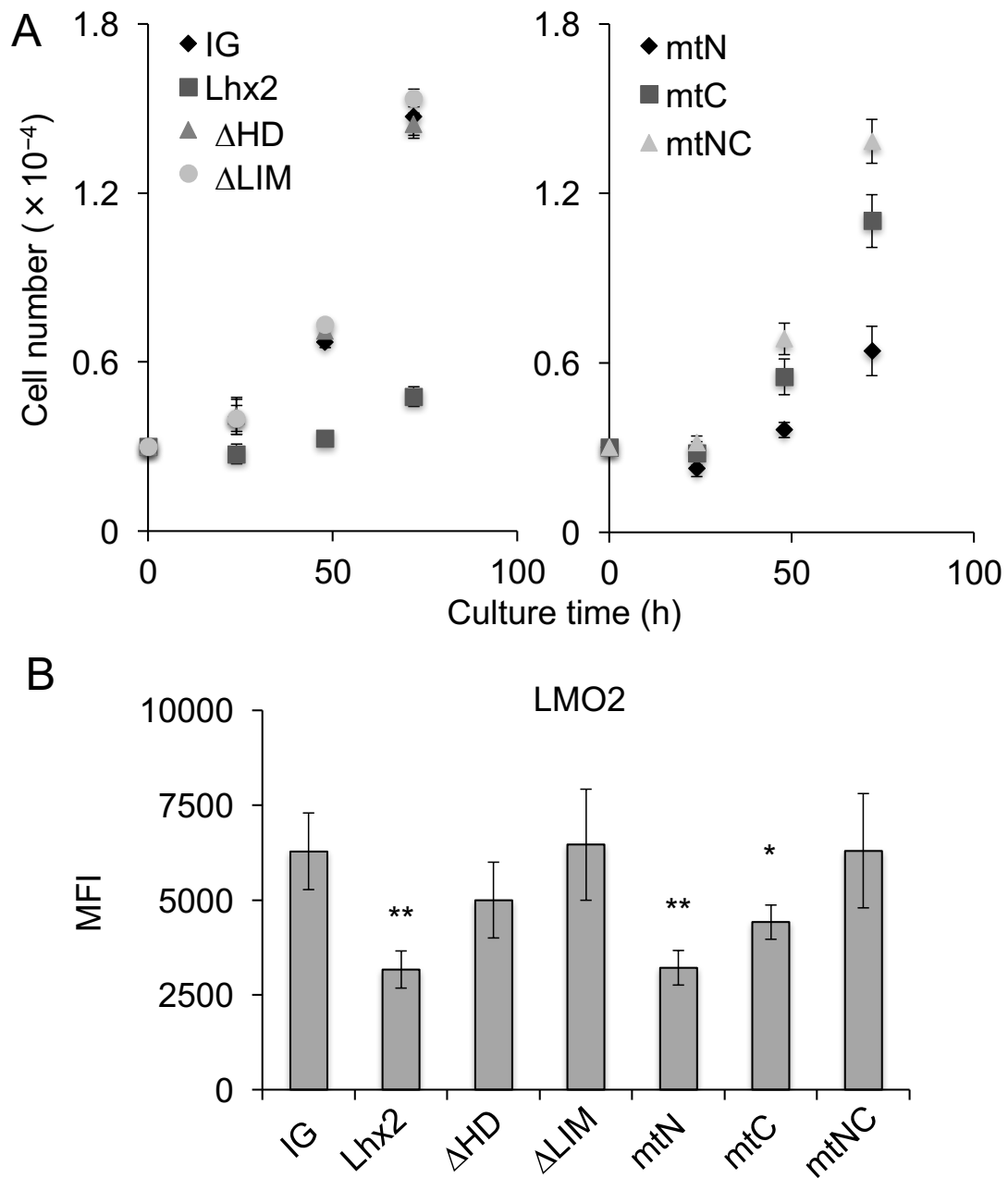


図13 Lhx2のT-ALL増殖抑制活性にはC末端側LIMドメインとホメオドメインが必須である
 (A) 空ベクター(IG) またはLhx2の全長、機能欠失・変異体をCCRF-CEM細胞に発現させ、EGFP⁺細胞をソーティングによって分離し、増殖能の変化を解析した (mean \pm S.E., n=5)。
 (B) EGFP陽性のCCRF-CEM細胞をセルソーティングによって回収し、細胞内FACSによりLMO2の蛍光強度を比較した (mean \pm S.E., n=3)。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

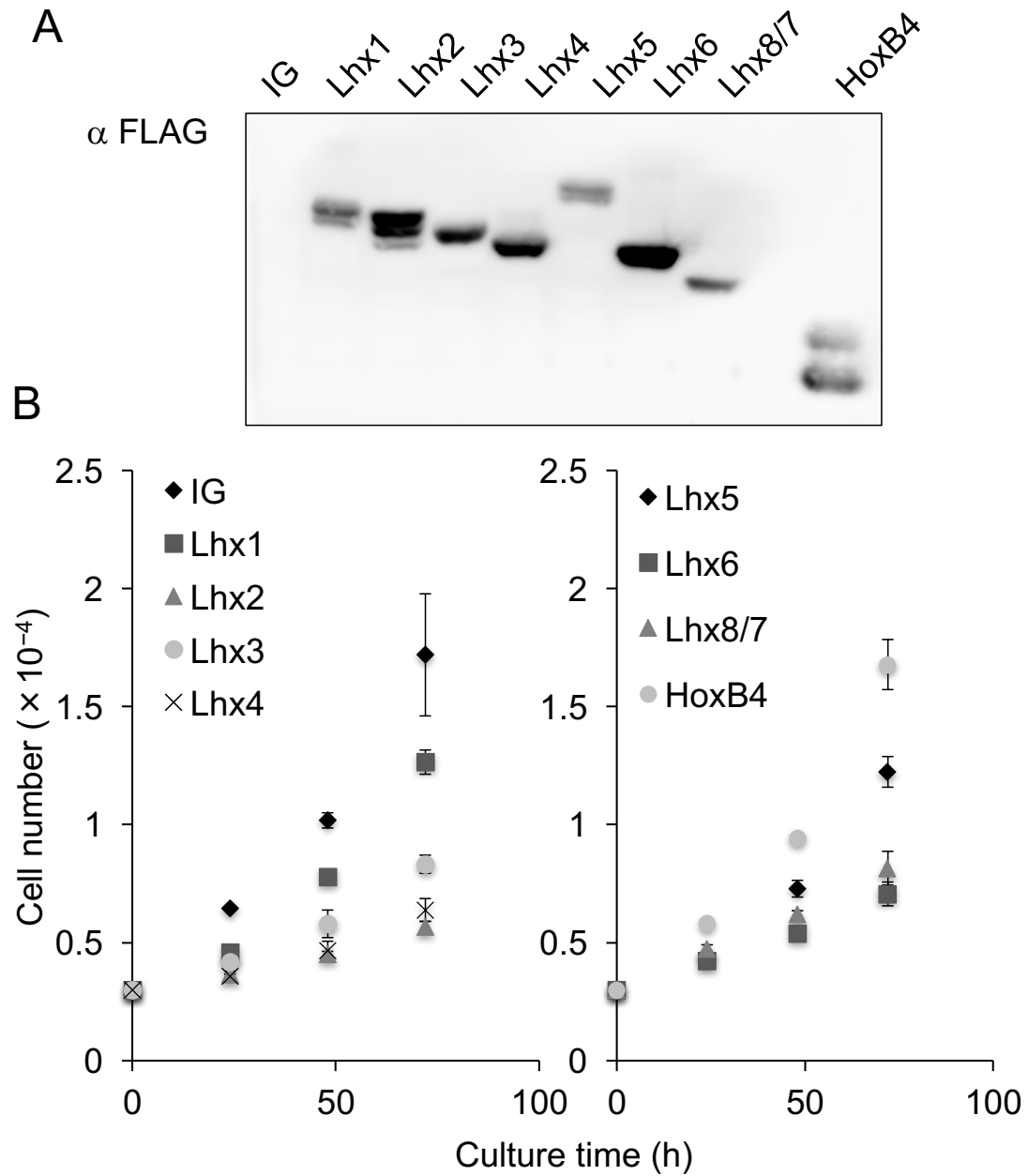


図14 Lhx2の機能欠失・変異体の作製

(A) 293T細胞に一過性に空ベクター(IG)、HoxB4またはLhxファミリーを発現させ、ウェスタンブロッティングにより、タンパク質の発現を確認した。

(B) IG、HoxB4またはLhx2の全長、機能欠失・変異体をCCRF-CEM細胞に発現させ、EGFP⁺細胞をソーティングによって分離し、増殖能の変化を解析した (mean \pm S.E., n=5)。

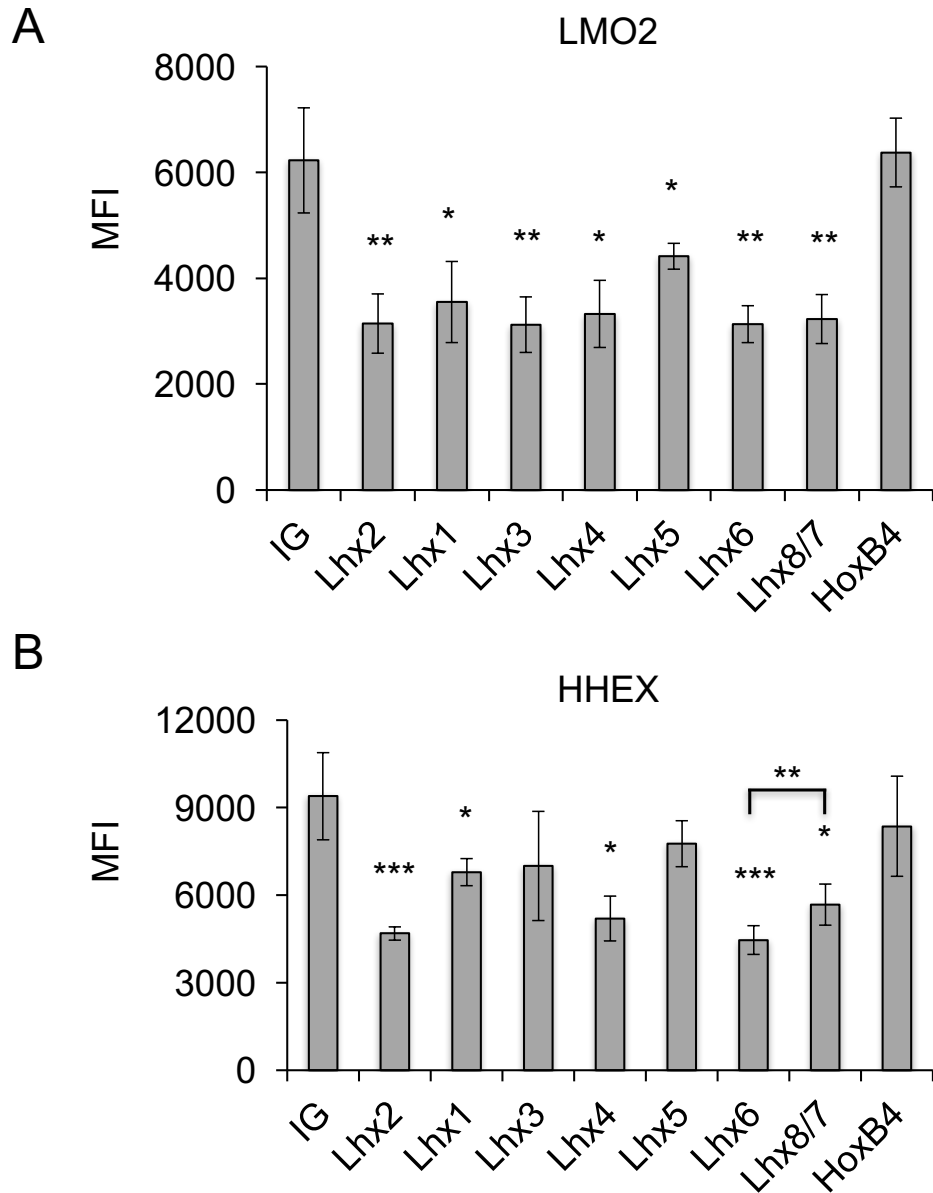


図15 Lhxファミリーの細胞内LMO2とHHEXの存在量

(A, B) 空ベクター(IG)、HoxB4またはLhxファミリーを発現させ、EGFP陽性のCCRF-CEM細胞をセルソーティングによって回収し、細胞内FACSによりLMO2(A)またはHHEX(B)の蛍光強度を比較した(mean \pm S.E., n=3)。*, $P<0.05$ 、**, $P<0.01$ 、***, $P<0.001$ 。

第二章

序論

生物の表現系を担う遺伝子の解析はメンデルによる順遺伝学研究に端を発し、遺伝子操作による特定の遺伝子ノックアウト生物種を利用した逆遺伝学の成功は、遺伝子と生体機能の結びつきを迅速に紐解くことに繋がった。しかしながら、順遺伝学・逆遺伝学ともに、責任遺伝子の欠失という不可逆的な特性を持つため、遺伝子機能の動的な解析には適さない。この遺伝学の弱点を補うため、生物活性を持つ生理活性物質による特定のタンパク質の機能阻害実験が行われてきた。遺伝学と同様に、生理活性物質を添加した際に起こる表現系に着目して標的遺伝子を同定する手法をフォワードケミカルゲノミクス、特定のタンパク質の機能を阻害する生理活性物質を用いて生物機能への影響を解析する手法をリバースケミカルジェネティクスと呼ぶ。フォワードケミカルジェネティクス研究にはその特性上、多量の生理活性物質からなるケミカルライブラリーが必要となり、目的の物質を得られるかはライブラリーの質に依存する。また、予見できない物質と標的タンパク質との関係を解明できる魅力があるものの、順遺伝学と同様に、細胞の表現型から責任遺伝子を同定する必要があり、膨大な時間と労力を伴う。これとは異なり、リバースケミカルジェネティクス研究では目的のタンパク質に対する阻害活性を持つ物質から展開されるため、作用標的分子の同定は原則的に必要ではない。しかしながら、標的となるタンパク質がどこに局在するかによって、膜透過性や細胞内安定性の問題が生じることも少なくない。また、創薬を考慮に入れるとリピンスキーの **rule of five** に則る必要が出てくるため、構造に制限が生じる。上述のように、どちらのケミカルゲノミクス手法に

も一長一短があり、一概にどちらが優れた手法かを述べることはできない。

生理活性物質を探索するために作製された化合物ライブラリーには、合成化合物と天然化合物からなるものが存在する。近年の化学合成技術の進展は目覚ましく、合成化合物ライブラリーにも異なる構造の物質が多数含まれているが、多様な微生物種が産生する比較的大きい化合物も含む複雑性に富んだ天然物ライブラリーには及ばない。我が国は、天然有機化合物を中心とする生理活性物質の探索研究において、長年にわたり世界を牽引してきた。フグ毒テトラドトキシン、貝毒オカダ酸、イワスナギンチャク由来毒素パリトキシンなどは日本人が研究に参与した天然物である。特筆すべき点は、これらの毒素が非常に低濃度で生物活性を有するという点であり、医薬品を目的としたフォワードケミカルジェネティクス手法を用いたスクリーニングと非常に相性が良い。

現在、代表的な ALL 治療に用いられている分子標的薬イマチニブは Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害剤、リツキシマブは CD20 抗原に対する抗体薬であり、それぞれ酵素と細胞表面抗原に結合する。T-ALL に上述のような分子標的薬が存在しない一因は、正常 T リンパ球と腫瘍化 T リンパ球が共通のレセプターやシグナル伝達系を有していることである。しかしながら、第一章で述べたように、T-ALL 細胞と正常 T リンパ球の遺伝子発現プログラムは大きく異なっている。酵素やレセプターの阻害剤開発には、標的タンパク質の触媒部位やリガンド結合部位に高親和性で結合する低分子が適していると提唱されている。それに対し、転写因子は DNA や相互作用タンパク質と比較的広い領域を介して結合するため、低分子化合物による完全な活性阻害は難しく、近年では中分子天然物による阻害剤開発が着目されている。上記の現状を考慮すると、T-ALL 細胞に特異

的な新規治療薬を開発していくには、LMO2 のような転写因子を標的に含められる可能性を持つ天然物ライブラリーを用いて、スクリーニングした方が成功しやすいと推察される。

そこで、天然物ライブラリーを用いて T-ALL 細胞に選択的に作用する化合物をスクリーニングしたところ、有望な三種類の化合物が得られた。第二章では、それらのうち一種が、患者由来 T-ALL 細胞に対して増殖抑制活性を示し、正常 T リンパ球の増殖及び生存に影響を与えないことを証明した実験結果を記述する。

材料と方法

化合物ライブラリーのスクリーニング

独立行政法人産業技術総合研究所・天然化合物組合が所有する約 15 万の天然化合物からなるライブラリーを用い、同研究所の新家一男上級主任研究員チームとの共同研究として、2 種類の白血病細胞株を用いたハイスループットスクリーニングを実施した。スクリーニングには 384 well plate を用い、CCK-8 を用いた比色解析を実施した。一次スクリーニングで得られた候補化合物について、二次スクリーニングを実施し、再現性の得られたサンプルに対しては菌の再培養を行った。一次及び二次スクリーニングで用いたサンプルは菌体と培養液のクルードサンプルであったため、どちらの分画に活性があるかを決定し、その後 HPLC により得られた各 20 分画の活性を複数回に渡って評価し、活性責任化合物の同定を行った。

細胞培養

UC、H23 (Health Science Research Resources Bank)は 10% FBS、1% P/S、0.5% 2-mercaptoethanol を添加した RPMI 培地を用いて 37°C-5% CO₂ の条件下で培養した。HeLa、SH-SY5Y、MCF-7 (Health Science Research Resources Bank)は、10% FBS、1% P/S を添加した DMEM を用いて同上の条件下で培養した。

ヒト初代細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF)、ヒト骨髓血由来単核球 (hPB-MNCs)は、LONZA (Basel, Switzerland)から、ヒト末梢由来単核球 (hBM-MNCs)は Takara からそれぞれ

れ購入した。HDF は 10% FBS、1% P/S を添加した DMEM を用いて 37°C-5% CO₂ の条件下で培養した。ヒト末梢血単核細胞 (hPB-MNCs) から末梢血由来 T 細胞を得る目的には、10% FBS、1% P/S、0.5% 2-mercaptoethanol を添加した RPMI 培地に最終濃度が 30U/ml となるように human IL-2 (Peprotech) を添加して 24 well-plate で培養した。ここに、PBS によって洗浄した Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific, Kanagawa, Japan) を 1 well あたり 25 µl 添加し、細胞と共培養することで T 細胞を選択的に増やした。

患者検体

本研究で実施されたヒト試料を対象とする研究は東京都医学総合研究所倫理委員会の承認を得た上で、「人を対象とする研究の倫理指針」を遵守して行われた。末梢血、骨髄液、心嚢水及び胸水は東京都立駒込病院から倫理委員会の承認を得て、対象患者のインフォームドコンセントを取得した上で連結不可能匿名化されて本研究室に提供された。T-ALL/LBL または ATL と診断された 3 例の患者を対象に本研究を行った。2 例の患者からは、末梢血、骨髄液、心嚢水、及び胸水が採取され、残りの 1 例の患者は骨髄液の -80°C 凍結検体を用いた。採取された検体から Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を用いて単核球を遠心分離し、human IL-2 (10 ng/ml)、human IL-7 (Peprotech, 10 ng/ml)、human SCF (Peprotech, 25 ng/ml)、human FLT3L (Peprotech, 50 ng/ml) を添加した HPGM 培地 (LONZA) 中で 37°C-5% CO₂ の条件下で培養した。凍結検体は細胞融解後、1.2 Gy の放射線照射をした NOD/SCID common-gamma knockout (NSG) マウスに 10⁵ 細胞/匹ずつ尾静

脈投与した。8～12週後、脾臓を回収してビオチン標識マウス CD45.1 で標識し、Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) と反応させ、残存するマウス由来細胞を除いた後、生検体と同様の方法で培養を行った。

実験動物

NSG マウスは、ジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME) より購入し、患者検体の移植実験に用いた。マウスは、特定病原体フリーの動物実験飼育室にて、12 時間の明暗サイクル条件下で飼育した。なお、すべての動物実験プロトコールは、東京都医学総合研究所の動物実験倫理委員会にて事前承認されている。

化合物感受性試験

3000 細胞/100 μ l/ウェルとなるように CCRF-CEM または Raji 細胞を 96 well-plate に播種し、その後、各ウェルに PBS-DMSO (9:1) にて終濃度の 100 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 1 μ l ずつ添加した。72 時間培養後に CCK-8 を添加し、さらに 4 時間培養して 450 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度の値は、溶媒添加群の測定値で各ウェルの測定値を除し、溶媒添加群に対する比に換算した。

hPB-MNCs に関しては、終濃度が 10 ng/ml となるように human IL-2 を添加した HPGM 培地で 10^4 細胞/100 μ l/ウェルとなるように 96 well-plate に播種し、その後、各ウェルに PBS-DMSO (9:1) にて終濃度の 100 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 1 μ l ずつ添加した。48 時間培養後に CCK-8 を添加し、さらに 4 時間培養して 450 nm の吸光度を測定した。

ヒト末梢血由来 T 細胞に関しては、終濃度が 10 ng/ml となるように human IL-2 を添加した 10% FBS、1% P/S、0.5% 2-mercaptoethanol 含有 RPMI 培地に 1 well あたり 2 μ l となるように Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 を加えて 8×10^4 細胞/100 μ l/ウェルとなるように 96 well-plate に播種し、その後、各ウェルに PBS-DMSO (9:1)にて終濃度の 100 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 1 μ l ずつ添加した。72 時間培養後に CCK-8 を添加し、さらに 4 時間培養して 450 nm の吸光度を測定した。

患者検体に関しては、サイトカインを添加した HPGM 培地に 10^5 細胞/100 μ l/ウェル (胸水のみ 2×10^4 細胞/100 μ l/ウェル)となるように 96 well-plate に播種し、その後、各ウェルに PBS-DMSO (9:1)にて終濃度の 100 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 1 μ l ずつ添加した。72 時間培養後に CCK-8 を添加し、さらに 6 時間培養して 450 nm の吸光度を測定した。

細胞障害性試験

5×10^4 細胞/0.5 ml のヒト皮膚線維芽細胞を 12 well-plate に播種し、4~5 時間回復培養を行い、細胞のプレートへの接着を確認したのち各ウェルに DMSO にて終濃度の 1000 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 0.5 μ l ずつ添加した。3 日後、上清を回収し、遠心により不溶性画分を除去した後、各サンプルを 50 μ l ずつ 96well-plate に移し、LDH-Cytotoxic Test (Wako)を用いて死細胞の放出した LDH による発色反応を行い、570 nm における吸光度を測定した。細胞障害率は、終濃度が 0.2%となるように 10% Tween20 溶液を 10 μ l 細胞培養液に添加し、3 時間培養を行ったウェルを 100%と定義し、各吸光度の値から培地液のみの測定値

を減算した値を 100%の値に対する比で算出した。

FACS 解析

回収した細胞 PBS で 2 回洗浄し、PBS で 10^6 細胞/ml の細胞密度に調整し、1 μ l の Ghost Dye510 (Bay bioscience, Hyogo, Japan)を添加し、氷上で 30 分間反応させた。細胞を洗浄し、5% FBS-PBS 中に再懸濁し、1 mg/ml の human γ -Globulin (Wako)を添加し、氷上で 30 分間反応させた。その後、蛍光標識抗体を添加し、氷上に 30 分間静置した。細胞を洗浄し、5% FBS-PBS に再懸濁した後、フローサイトメーターLSR-FortessaX-20 (BD Biosciences)にて蛍光強度を測定した。データは FlowJo を用いて解析した。使用した抗体を表 2 に示す。

コロニー形成実験

10^5 細胞/150 μ l のヒト骨髄単核細胞 (hBM-MNCs) (LONZA)と DMSO にて終濃度の 1000 倍の濃度に調整した化合物をそれぞれ 1.65 μ l ずつ添加した 1.5 ml の MethoCult GH H4034 半固形培地 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) を混合し、30 mm のペトリディッシュ (BD Biosciences)に播種した。2 週間後、各コロニーを形態別に計測し、ギムザ染色を行った。

結果

T-ALL 細胞株に対する増殖抑制効果を示す天然化合物の同定・単離

T-ALL 細胞の増殖を阻害し、その他のがん細胞の増殖に影響を与えないような化合物を得ることができれば、これは T-ALL に対する特異的な治療薬となる可能性を秘めていると考えられる。そこで、産業技術総合研究所天然化合物組合が所有する約 15 万の天然化合物からなるライブラリーに対し、T-ALL 細胞株 CCRF-CEM の増殖率を抑え、かつバーキットリンパ腫細胞株 Raji の増殖率を抑制しない化合物をハイスループットスクリーニングにより探索した。天然物ライブラリーは 5 つの独立した提供元を起源としていたため、スクリーニングにより得られた各ライブラリー中の総ヒットサンプル数が各ライブラリーの全化合物数の 0.05%以上 1%未満となるような増殖率変化のカットオフ値を採用した。その結果、38 個のヒットサンプルが得られた。これらはいずれも菌体と培養液の混ざったクルードサンプルであったため、ここから有効成分の抽出及び同定を試みたところ、最終的に三種類 (44D-L008, 31D-F005, 21D-D016) のヒット化合物の単離に成功した (図 1 6)。44D-L008 と 31D-F005 は、構造が非常に類似した類縁体であった。これらの化合物の CCRF-CEM に対する IC₅₀ 値を算出したところ、2 μ M 未満で活性を示すことが明らかとなった (図 1 7)。続いて、単離化合物が他のヒトがん細胞株に対してどのように影響を与えるかを解析したところ、実験に用いた全ての CCRF-CEM 以外の T-ALL 細胞株と骨髓球性白血病細胞株に対して増殖抑制活性を示した (図 1 8)。しかし、44D-L008 と 31D-F005 は上皮性の癌細胞株に対しては増殖抑制活性を示さなかった。したがって、CCRF-CEM と Raji の増殖能を利用したスクリーニングから得られたヒット化合物 44D-L008

と 31D-F005 は、T-ALL に対する治療薬開発のスタート材料として有望と考えられる。

44D-L008 は赤血球を除く本研究において用いたヒト正常細胞に強い毒性を示さない

創薬を視野に入れる上で、正常細胞へ毒性を与えないことが必要であるため、まずは HDF に対する毒性を検討した (図 1 9、2 0)。その結果、44D-L008 は低濃度域においても HDF の細胞死が誘導されていたが、31D-F005 は高濃度域では細胞死が起こっていないものの、CCRF-CEM に対する有効濃度範囲内においては細胞死を誘導していなかった。この結果を踏まえて、以降の実験には 31D-F005 を用いることにした。

31D-F005 のヒト正常血液細胞への影響を解析するため hPB-MNCs に対する毒性を検討した。31D-F005 は 1 μM では全く影響を与えず、10 μM という高濃度下においても増殖率は 80%程度までしか低下しなかった (図 2 1)。しかし、hPB-MNCs は T 細胞、B 細胞、単球からなる不均一な細胞集団であるため、31D-F005 が T 細胞に毒性を持つ可能性を否定できない。そこで、hPB-MNCs を CD3/CD28 ビーズで刺激し、T 細胞のみを選択的に増やして増殖に対する影響を調べた。その結果、31D-F005 は正常 T 細胞には 3.29 μM の IC_{50} 値を示し、これは CCRF-CEM 細胞の IC_{50} 値 0.511 μM より約6倍高いことが判明した (図 2 2 A)。これらの細胞を FACS 解析した結果、末梢血 T 細胞の亜集団である $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞と $\text{CD8}^+\text{T}$ 細胞の比率に変化は観られなかったため、T 細胞の特定のサブセットに毒性を示す可能性は排除された (図 2 2 B)。

次に hPB-MNCs より未分化な造血前駆細胞を含む hBM-MNCs を用いて、コロニー形成能に対する 31D-F005 の影響を調べた (図 2 3 A, B)。hPB-MNCs の結果と一致して、31D-F005 は骨髓球性細胞集団 CFU-GM、CFU-G、マクロファージのコロニー

数に影響を与えなかった。これに対し、赤血球性細胞集団 BFU-E の形成は 500 nM の 31D-F005 によって完全に抑制された。この結果は、31D-F005 を *in vivo* 投与した場合には貧血が起こる可能性を示唆する。上記の一連の実験結果は、31D-F005 は T-ALL 細胞に対する有効濃度範囲内において、赤血球に対しては毒性を示すものの正常 T 細胞の増殖及び正常骨髓球細胞の分化に毒性を発揮しないことを示す。

31D-F005 は T-ALL 患者検体細胞の増殖も抑制する

31D-F005 は調べた限りすべてのヒト T-ALL 細胞株の増殖を抑制する性質を持っていたが、実際の T-ALL 患者検体に対して有効であるかどうかは定かではない。そこで、T 細胞性血液疾患患者由来の検体細胞に対する有効性を検討した。まず、T-ALL/T-LBL 患者1例と T-ALL 患者1例から得た白血病細胞は、いずれも 1 μ M 未満の 31D-F005 によって増殖が阻害されることが判明した (図 2 4 A, B)。これに対し、ATL 患者1例の白血病細胞は、正常 T 細胞と同様に 1 μ M 未満の 31D-F005 によって生存率が低下することはなかった (図 2 4 C)。これらの結果は、31D-F005 ががん種特異性を有していることを明示している。さらに、T-ALL/T-LBL 患者の例では血液細胞の未分化マーカーである CD34 を発現する細胞集団が、IC₅₀ 値を境に減少していった (図 2 5)。しかし、このような変化は CD2 のような他の T-ALL 細胞マーカーでは確認されなかった(図 2 6)。これは、31D-F005 がより未分化な白血病細胞を標的としている可能性を示唆している。

考察

天然化合物ライブラリーに対する大規模スクリーニングの結果、Raji 細胞の増殖に影響を与えず、CCRF-CEM 細胞の増殖を抑制する三種類のシード化合物 (44D-L008, 31D-F005, 21D-D016)の同定単離に成功した。さらに、44D-L008 と 31D-F005 が類縁体であったため、2種類の白血病細胞株を用いたスクリーニング系が精確に機能していたことが証明された。T-ALL を含む様々なヒトがん細胞株の増殖能に関してパネル解析を行なった結果、44D-L008 と 31D-F005 は造血器腫瘍由来の細胞株に対して特異的に作用することを見出した。さらに、31D-F005 はサブマイクロモラーで T-ALL 細胞株の増殖を阻害するが、この濃度域ではヒト皮膚線維芽細胞に対して毒性を示さないことが判明した。続いて hPB-MNCs 及び hBM-MNCs を用いて正常血液細胞への影響を解析したところ、31D-F005 は CCRF-CEM 細胞に対する有効濃度範囲内で顆粒球、単球/マクロファージ、T 細胞の分化・増殖に影響を与えないことが明らかとなった。正常 T 細胞に毒性を与えない一方で、31D-F005 は T-ALL/T-LBL 患者検体の白血病細胞の増殖をサブマイクロモラーで阻害した。これらの結果は、31D-F005 が T-ALL 治療薬の有望なシード化合物であることを示している。

しかしながら、31D-F005 は BM-MNCs から赤芽球系のコロニー形成を完全に遮断した。この結果と合致して、31D-F005 は急性赤白血病細胞株 TF-1 の増殖を強力に阻害した。一方で、慢性骨髄性白血病の急性転化患者由来細胞株 K562 は T-ALL 細胞に対する有効濃度範囲内で 31D-F005 に耐性であった (図 2 7)。K562 細胞が 31D-F005 耐性を獲得したメカニズムを調べていけば、貧血の副作用を起こさない化合物を創出できる可能性がある。

31D-F005 は、T-ALL と骨髓球性白血病細胞株の増殖と赤血球系コロニー形成を抑制し、バーキットリンパ腫細胞株 Raji の増殖を抑制しないことから、第1章で用いた Lhx2 と同様に LMO2 を標的としている可能性が示唆された。そこで、31D-F005 を CCRF-CEM 細胞に添加した際の細胞内 LMO2 タンパク量を解析したが、LMO2 の減少は確認されなかったため、31D-F005 は LMO2 分解とは異なる作用メカニズムで T-ALL 細胞株に対し毒性を示していると考えられる(図 2 8)。

表2 FACSに用いた抗体リスト

標識	抗原	クローン	入手元
FITC	human CD3	HIT3a	BioLegend
PE	human CD4	OKT4	Bay Bioscience
APC	human CD8a	OKT8	Bay Bioscience
PE/Cy7	human CD19	HIB19	Bay Bioscience
APC	human CD34	561	BioLegend
Biotin	human CD2	RPA-2.10	BioLegend

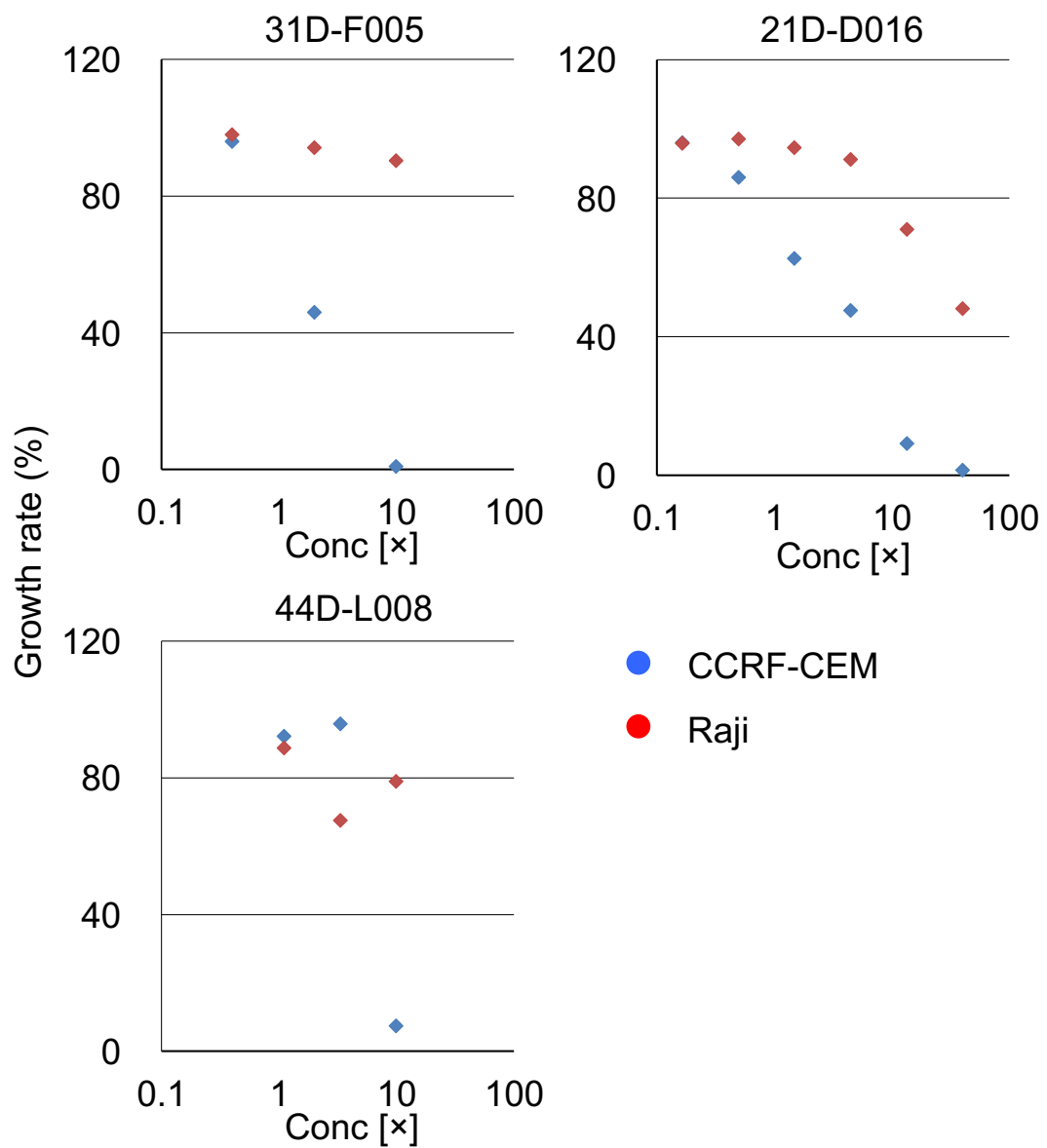


図16 単離化合物はCCRF-CEM細胞の増殖を特異的に抑える
CCRF-CEM細胞とRaji細胞に各化合物を添加し、72時間培養後、0 μ Mに対する増殖率を測定した。

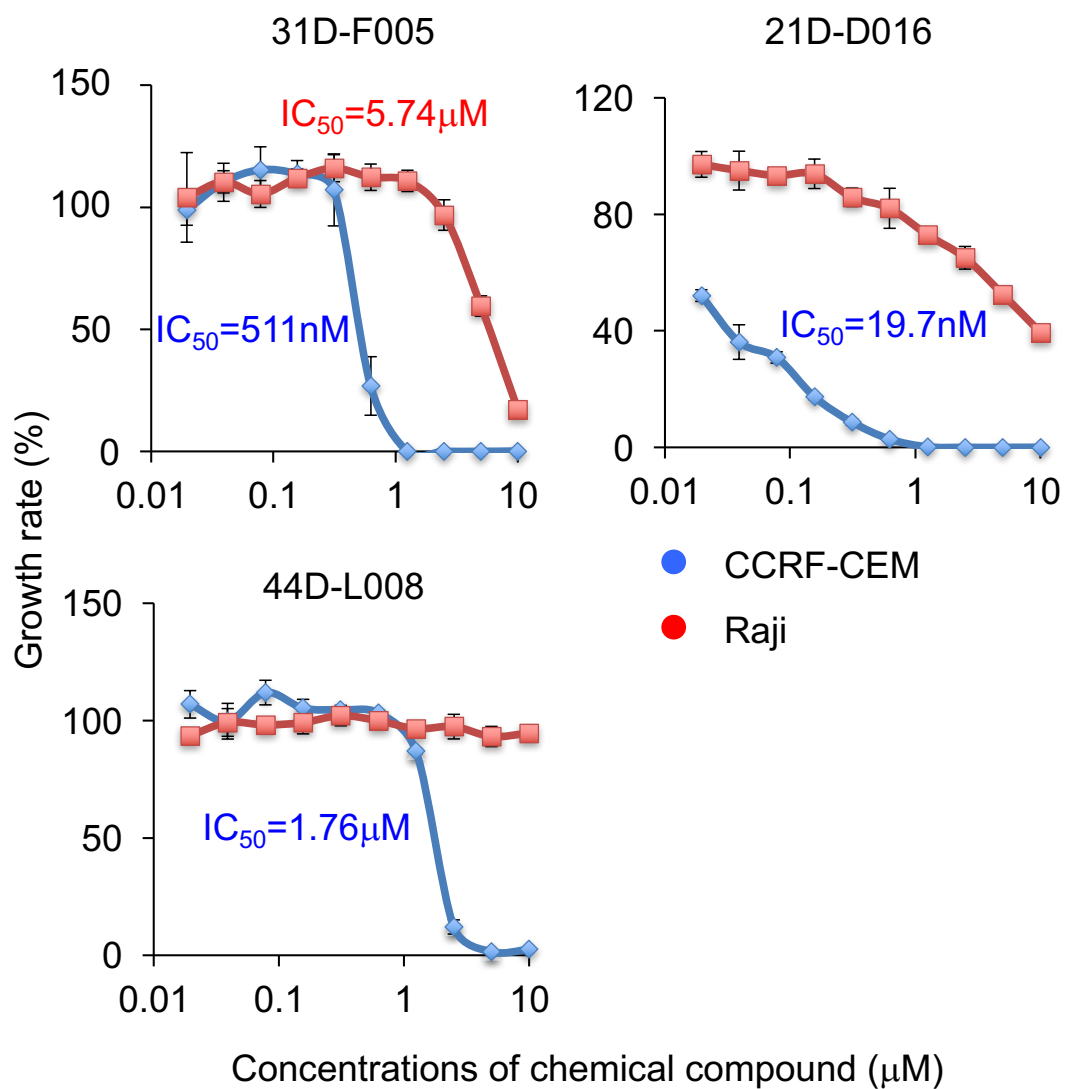


図17 単離化合物はCCRF-CEM細胞の増殖に2μM未満で作用する
 CCRF-CEM細胞とRaji細胞に各化合物を段階希釈して添加し、72時間培養後、0μMに対する増殖率の変化を解析した (mean ± S.E., n=5)。

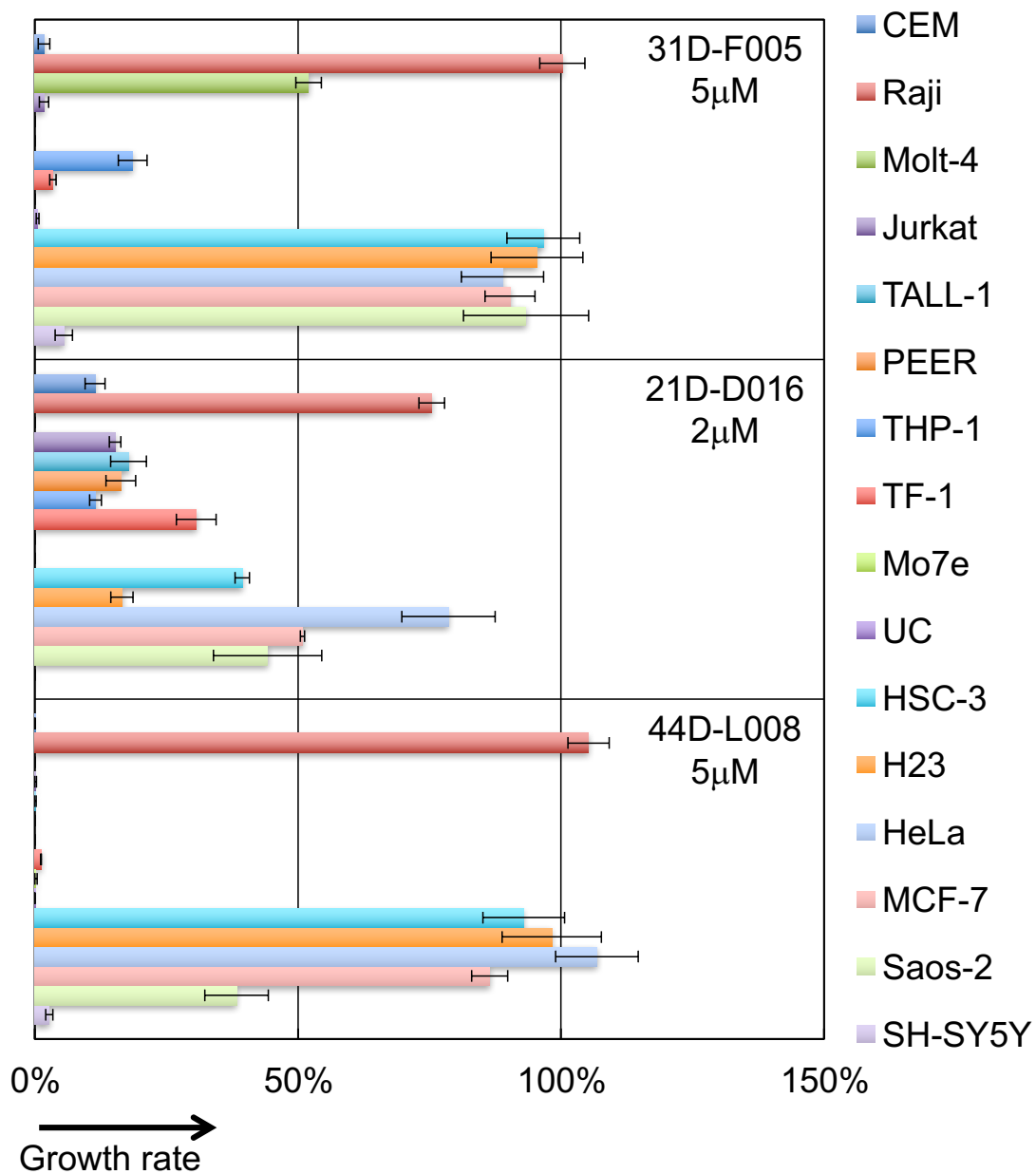


図18 31D-F005と44D-L008はヒト造血期由来細胞株の増殖を特異的に阻害する
各種ヒトがん細胞株に各化合物を添加し、72時間培養後、0μMに対する増殖率の変化を解析した (mean±S.E., n=5)。

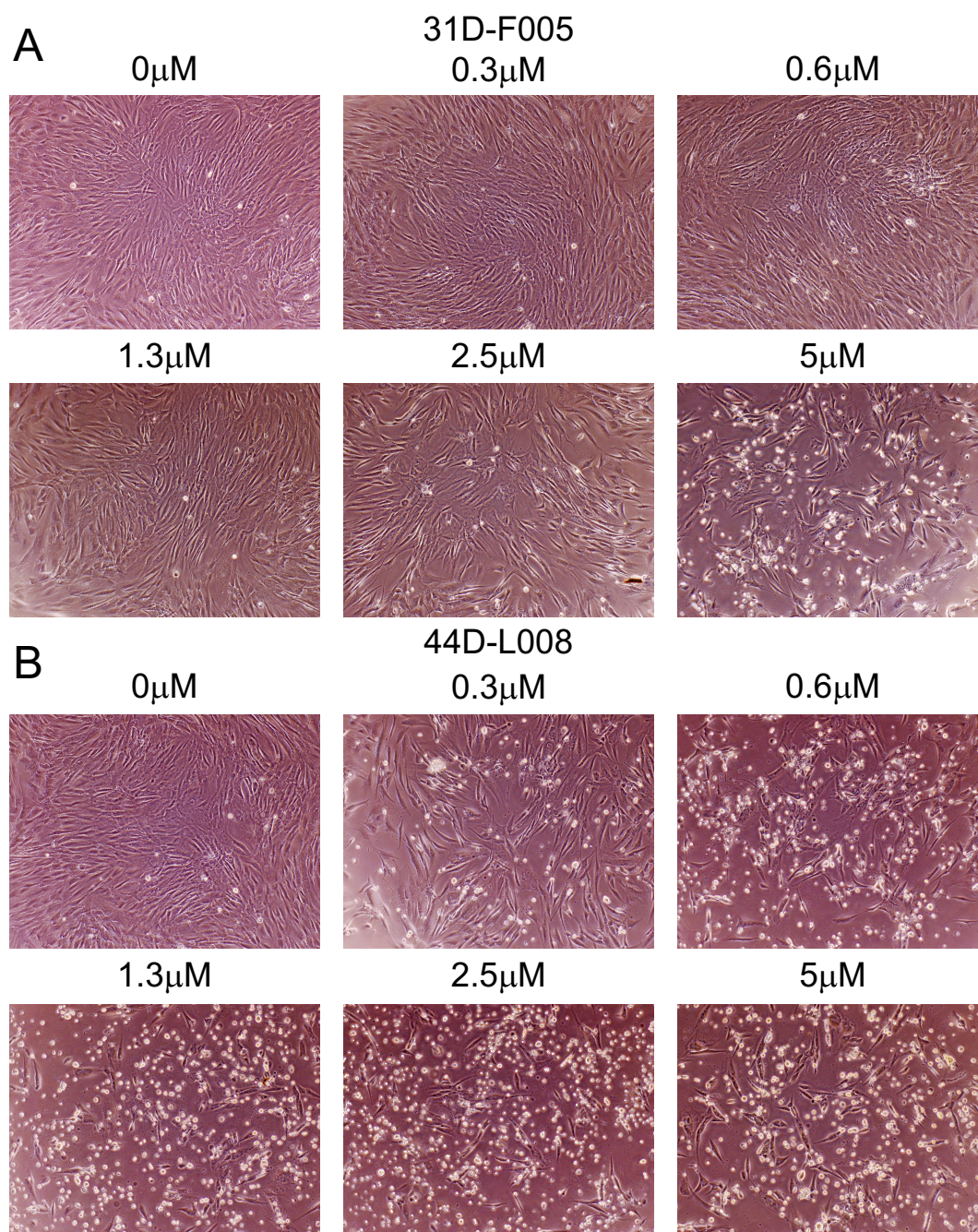


図19 31D-F005はT-ALL細胞株に対する有効濃度範囲内でヒト皮膚線維芽細胞に毒性を示さない
ヒト皮膚線維芽細胞に各化合物を段階希釈して添加し、72時間培養後の細胞形態。

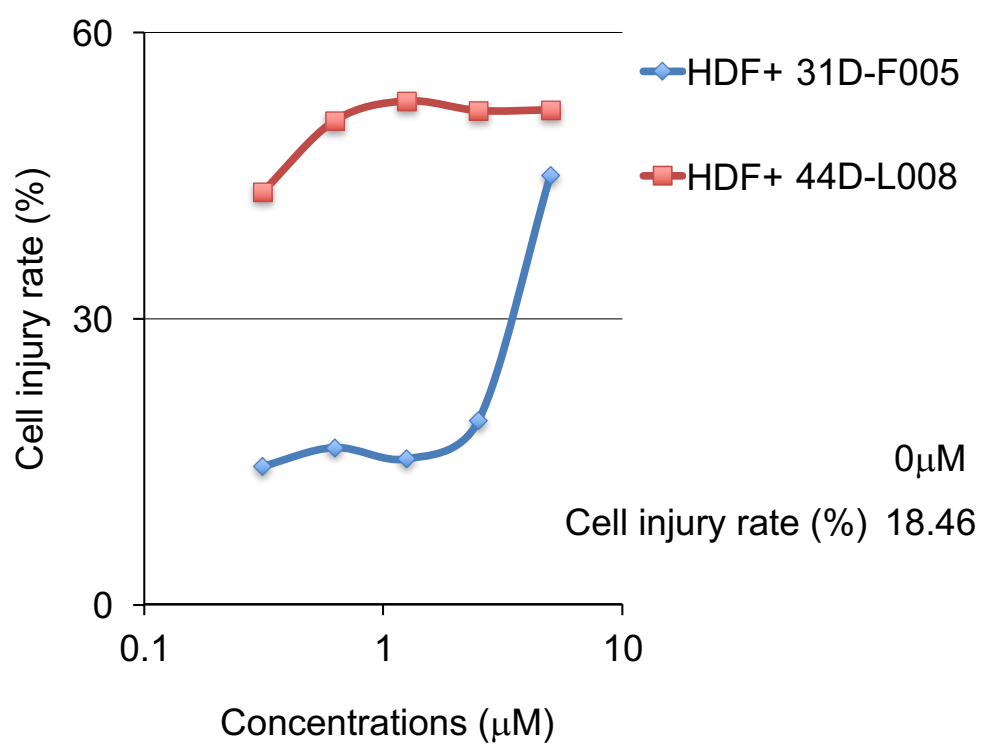


図20 31D-F005と44D-L008のヒト皮膚線維芽細胞に対する毒性解析
 ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)に各化合物を段階希釈して添加し、72時間培養後、細胞障害率を調べた。

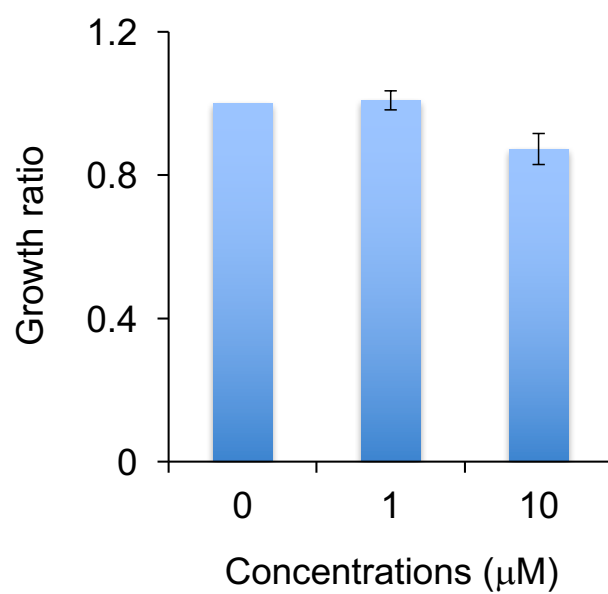


図21 31D-F005はヒト末梢血由来単核球に対して高濃度域でも毒性を示さない

ヒト末梢血由来単核球に31D-F005を段階希釈して添加し、48時間培養後、0μMに対する細胞増殖率を比較した (mean ± S.E., n=5)。

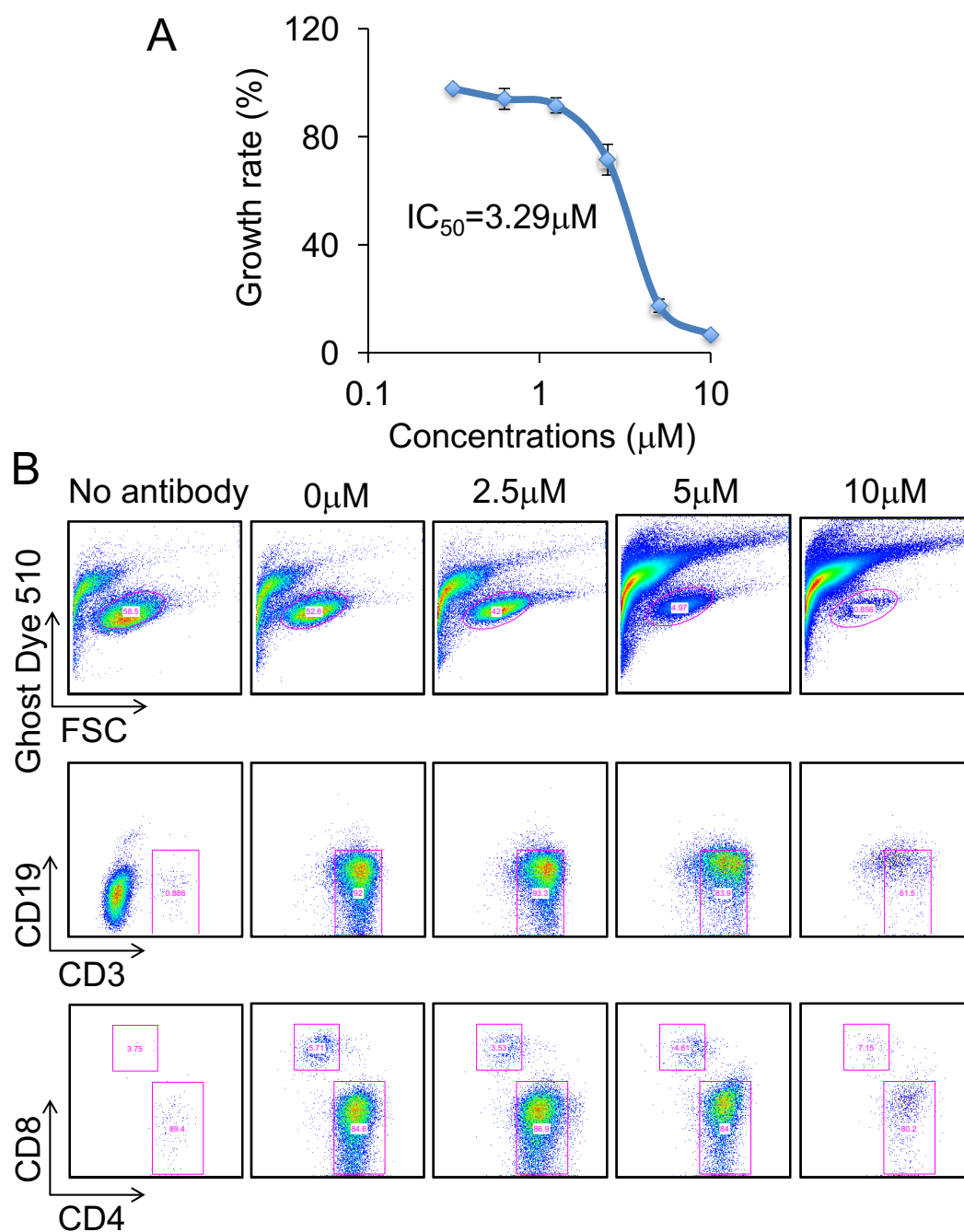


図22 31D-F005はヒト末梢血由来T細胞にT-ALL細胞に対する有効濃度範囲内で毒性を示さない
 (A) ヒト末梢血由来T細胞に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、 $0\mu\text{M}$ に対する細胞増殖率を比較した (mean \pm S.E., $n=5$)。
 (B) Aで細胞増殖率を測定した各ウェルのT細胞マーカーで染色したFACS解析結果。

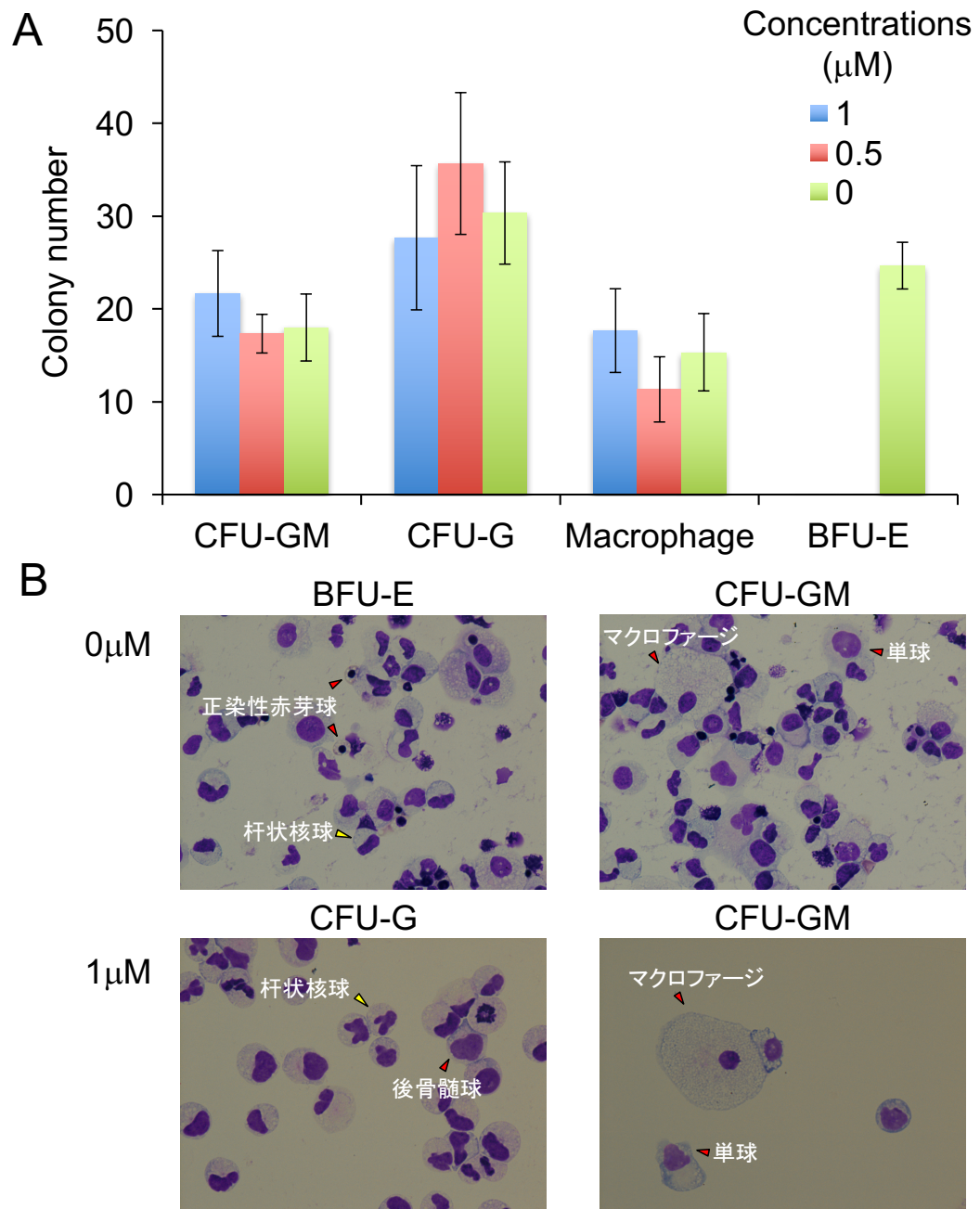


図23 31D-F005はヒト赤血球コロニーの形成を阻害する

(A) ヒト骨髄由来単核球に31D-F005を段階希釈して添加し、2週間半固形培地で培養後、各細胞系列のコロニー数を計測した (mean ± S.E., n=3)。

(B) Aで計測したコロニーを採取し、サイトスピンを行なった後のギムザ染色像。

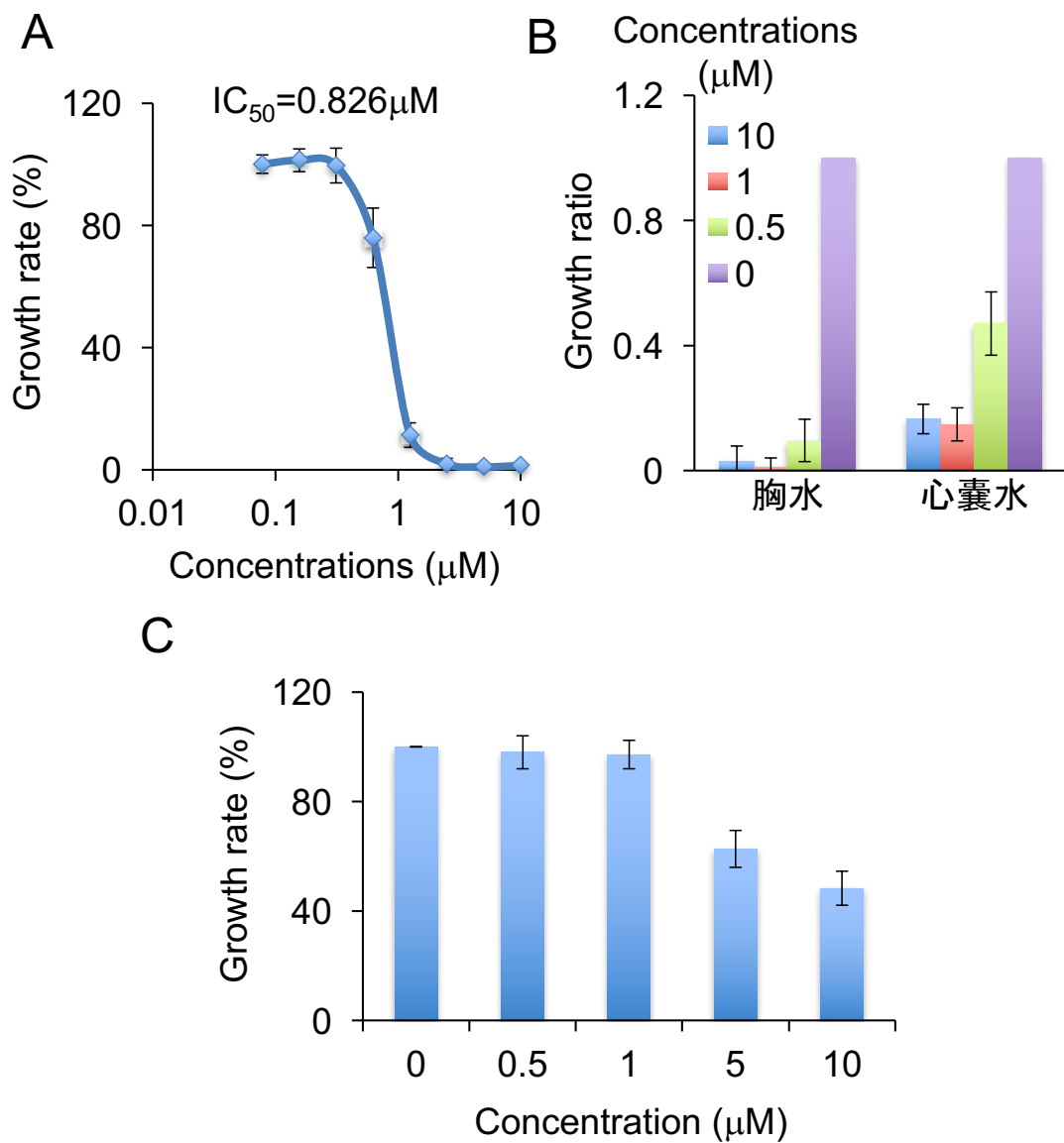


図24 31D-F005はヒトT-ALL/LBL患者細胞の増殖を阻害する

(A) ヒトT-ALL患者の骨髓由来の凍結単核球をNSGマウスに尾静脈投与し、9週後末梢血に30%程度のヒト細胞を確認後、脾臓細胞を回収した。回収した細胞に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、0 μMに対する細胞増殖率を比較した (mean ± S.E., n=5)。

(B) ヒトT-ALL/LBL患者の胸水または心嚢水から単離した単核球に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、0 μMに対する細胞増殖率を比較した (mean ± S.E., n=5)。

(C) ヒトATL患者の末梢血から単離した単核球に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、0 μMに対する細胞増殖率を比較した (mean ± S.E., n=5)。

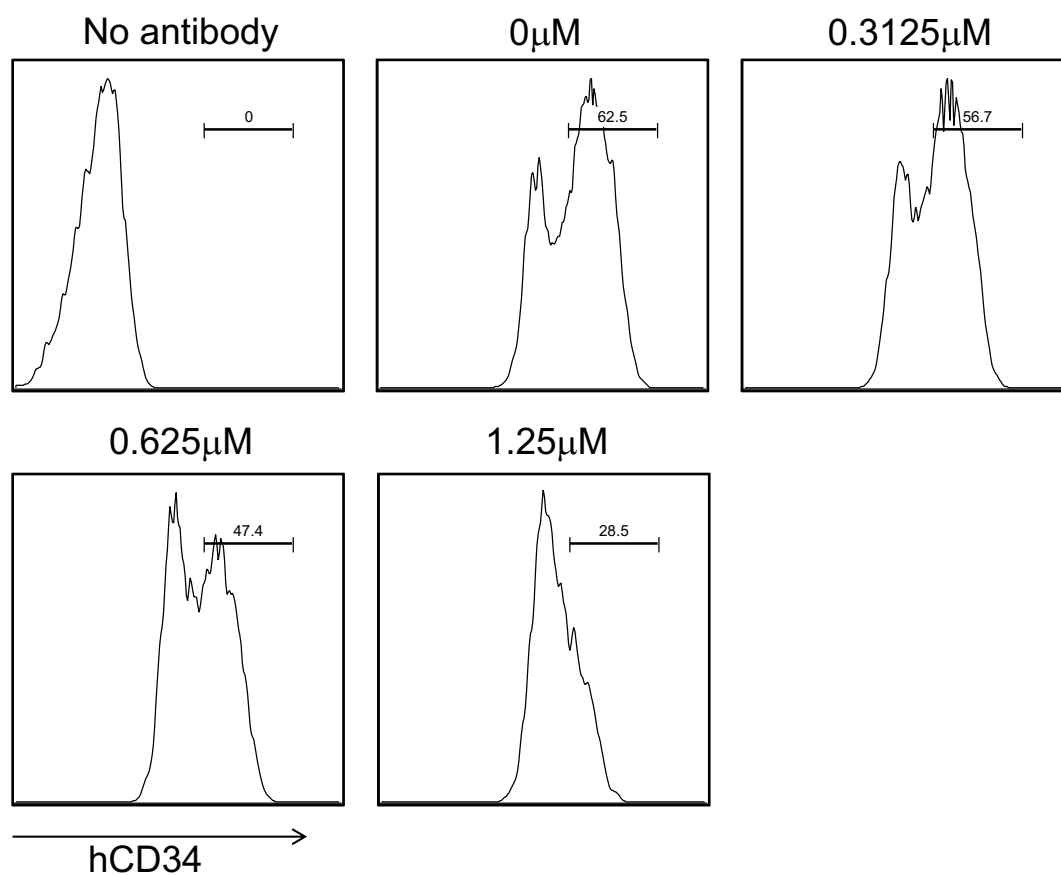


図25 31D-F005はヒトT-ALL/LBL患者細胞のCD34陽性細胞の比率を低下させる
 ヒトT-ALL/LBL患者の骨髓由来の凍結単核球をNSGマウスに尾静脈投与し、9週後末梢血に30%程度のヒト細胞を確認後、脾臓細胞を回収した。回収した細胞に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、死細胞をGhost Dye510によりゲートアウトし、ヒトCD34⁺細胞の比率を解析した。

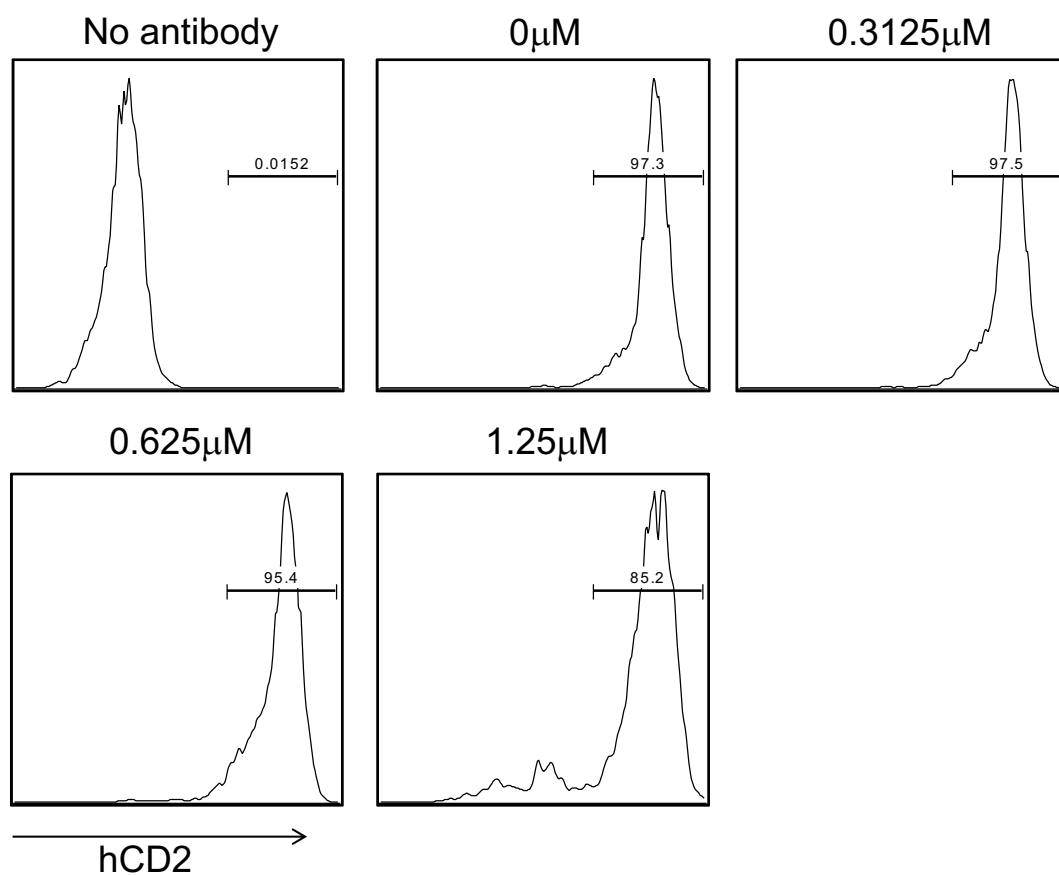


図26 31D-F005はヒトT-ALL/LBL患者細胞のCD2陽性細胞の比率に影響を与えない
 ヒトT-ALL/LBL患者の骨髓由来の凍結単核球をNSGマウスに尾静脈投与し、9週後末梢血に30%程度のヒト細胞を確認後、脾臓細胞を回収した。回収した細胞に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、死細胞をGhost Dye510によりゲートアウトし、ヒトCD2⁺細胞の比率を解析した。

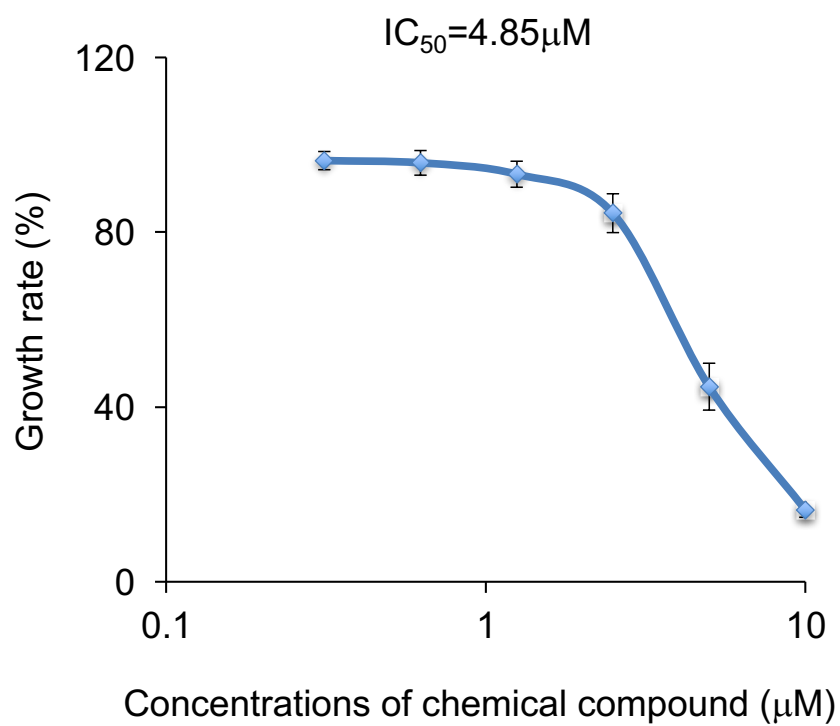


図27 31D-F005はK562細胞の増殖にT-ALL細胞への有効濃度範囲内で影響を与えない
K562細胞に31D-F005を段階希釈して添加し、72時間培養後、0μMに対する増殖率の変化を解析した
(mean ± S.E., n=5)。

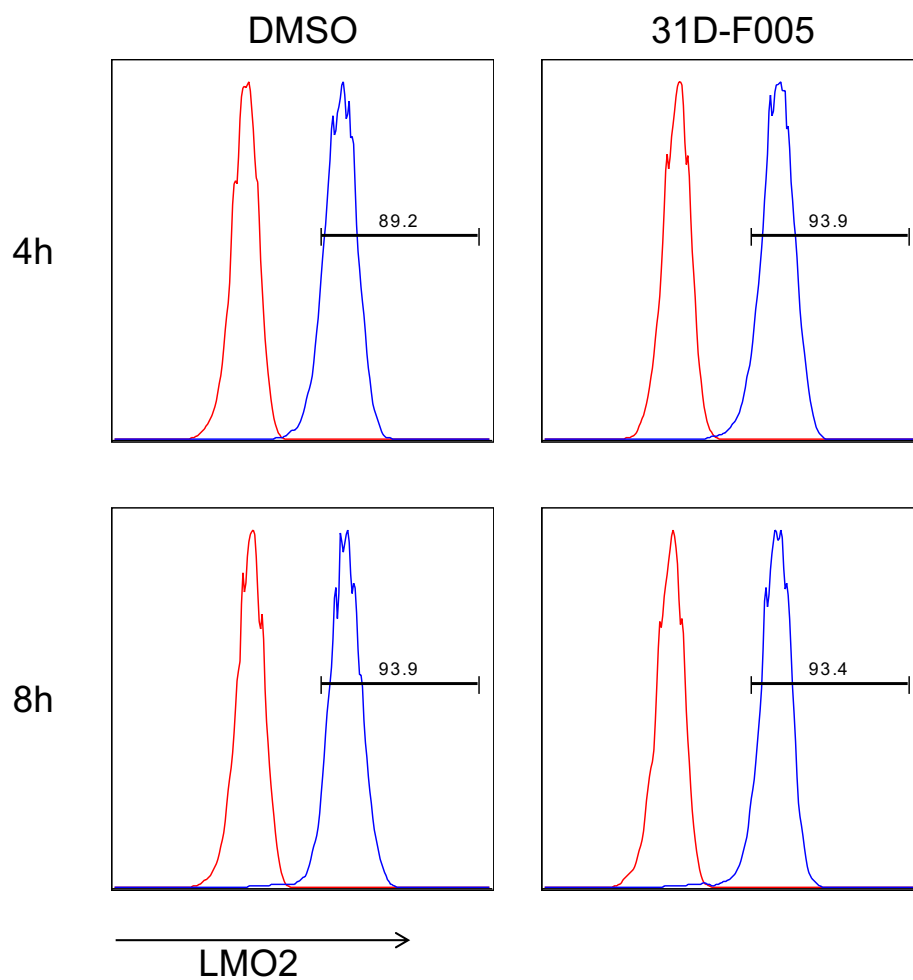


図28 31D-F005はCCRF-CEM細胞のLMO2タンパク量を低下させない
DMSOまたは31D-F005をCCRF-CEM細胞と4時間、または8時間共培養し、死細胞をゲートアウトして細胞内FACS解析によりLMO2の蛍光強度を解析した。

総合考察

本研究では、T-ALL に対する新規治療薬を開発するための基礎データを得るために、二つの独立した研究を行なった。一つ目の研究では、T-ALL の発症に深く関連していることが報告されている LMO2 のタンパク量を Lhx2 が T-ALL 細胞においても減少させ、増殖を阻害することを初めて示した。LMO2 を標的とした既存の薬剤はいずれも赤血球分化を阻害という副作用を持つが、Lhx2 により体外増幅された造血幹細胞様細胞は赤血球の分化異常を起こさない^{29,30,33}。この事実は、Lhx2 の活性を模倣する化合物は貧血を誘導しない LMO2 標的型 T-ALL 治療薬となる可能性を示唆する。加えて、Lhx2 は iPS 細胞から分化誘導した造血幹細胞様細胞の体外増幅を誘導するため、Lhx2 模倣剤は T-ALL 治療薬としてのみではなく造血幹細胞の移植用細胞ソースを調整することにも応用できると考えられる³³。二つ目の研究では、T-ALL の増殖を阻害する生理活性物質を、天然化合物ライブラリーを対象として増殖能を指標にスクリーニングし、有望な化合物の発見に成功した。本研究により発見された 31D-F005 は、正常 T リンパ球に影響を与えず、患者検体を含む T-ALL 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。現在、31D-F005 の活性を模倣する合成類縁体の作成に取り組んでおり、有望な低分子化合物の合成と機能性官能基の同定に成功している。この合成類縁体を利用すれば、31D-F005 の標的タンパク質の同定と作用メカニズムに迫れるのではないかと期待される。もちろん、この類縁体と 31D-F005 の作用標的が全く同一かどうかは不明であり、合成類縁体の赤芽球系・正常 T リンパ球への影響も再検討する必要がある。課題はあるものの、本研究で得られた類縁体の化学構造を少しずつ改変し、正確な活性評価を続けていけば、正常血液細胞への副作用が少ない切れ味鋭い T-ALL 薬に到達できるのではないかと期待している。

本博士論文において、T-ALL の治療薬開発の上で有望な二つのシーズに関する基礎研究結果を提示した。どちらの研究結果とも、詰めるべき課題は存在する。Lhx2 による T-ALL 細胞の増殖抑制効果は、当初の想定よりも複雑に入り組んだ分子メカニズムが背後に存在していた。活性責任を持つ下流因子群の同定には、トランスクリプトームなどにより網羅的に細胞内の変化を解析していく必要がある。31D-F005 の抗 T-ALL 活性は非常に有望であるが、本研究において実施できた正常細胞への副作用の検討は、血液細胞と皮膚上皮細胞に限定されている。創薬を視野に入れると、心筋への影響、肝毒性などについても検討することが必須である。また、T-ALL/T-LBL 患者由来細胞を NSG マウスに移植した異種間移植モデルに対し、31D-F005 の合成類縁体による治療を実施したが、*in vivo* 活性はまだ観察されていない (data not shown)。類縁体の体内安定性が低い可能性もある。私の本研究への関与はここで終了となるが、新しい T-ALL 治療薬開発を目指した研究の着実な進歩を期待したい。

参考文献

1. Vivier E, van de Pavert SA, Cooper MD, Belz GT. The evolution of innate lymphoid cells. *Nature immunology*. 17: 790-794, 2016.
2. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nature reviews Immunology*. 8: 9-21, 2008.
3. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*. 339: 605-615, 1998.
4. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*. 354: 166-178, 2006.
5. Hoang T. Of mice and men: how an oncogene transgresses the limits and predisposes to T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*. 2: 21ps10, 2010.
6. Hoelzer D, Walewski J, Dohner H, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood*. 124: 3870-3879, 2014.
7. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 106: 1569-1580, 2006.
8. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, et al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 123: 843-850, 2014.
9. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, et al. First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 116: 2070-2077, 2010.

10. Sadelain M, Riviere I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 545: 423-431, 2017
11. Cohen MH, Johnson JR, Massie T, et al. Approval Summary: Nelarabine for the Treatment of T-Cell Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Clinical Cancer Reserch*. 12: 5329-5335, 2006
12. Zwaan CM, Kowalczyk J, Schmitt C, et al. Safety and efficacy of nelarabine in children and young adults with relapsed or refractory T-lineage acute lymphoblastic leukemia or T-lineage lymphoblastic lymphoma: results of a phase 4 study. *British journal of haematology*. 179: 284-293, 2017
13. Bride KL, Vincent TL, Im SY, et al. Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Blood*. pii: blood-2017-07-794214, 2018
14. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature reviews Immunology*. 8: 380-390, 2008.
15. Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig WD. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene*. 6: 1887-1893, 1991.
16. Van Vlierberghe P, Pieters R, Beverloo HB, Meijerink JP. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 143: 153-168, 2008.
17. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*. 78: 45-57, 1994.
18. Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95: 3890-3895, 1998.

19. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 1: 75-87, 2002.
20. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, et al. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 19: 484-497, 2011.
21. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM, et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood.* 106: 274-286, 2005.
22. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Beverloo HB, et al. The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 108: 3520-3529, 2006.
23. McCormack MP, Young LF, Vasudevan S, et al. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science.* 327: 879-883, 2010.
24. Sanda T, Lawton LN, Barrasa MI, et al. Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 22: 209-221, 2012.
25. Rahman S, Magnussen M, Leon TE, et al. Activation of the LMO2 oncogene through a somatically acquired neomorphic promoter in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 129: 3221-3226, 2017.
26. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 302: 415-419, 2003.

27. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation*. 118: 3143-3150, 2008.
28. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine*. 348: 255-256, 2003.
29. Nam CH, Lobato MN, Appert A, Drynan LF, Tanaka T, Rabbitts TH. An antibody inhibitor of the LMO2-protein complex blocks its normal and tumorigenic functions. *Oncogene*. 27: 4962-4968, 2008.
30. Appert A, Nam CH, Lobato N, et al. Targeting LMO2 with a peptide aptamer establishes a necessary function in overt T-cell neoplasia. *Cancer research*. 69: 4784-4790, 2009.
31. Rhee H, Polak L, Fuchs E. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science*. 312: 1946-1949, 2006.
32. Porter FD, Drago J, Xu Y, et al. Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development*. 124: 2935-2944, 1997.
33. Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. *Blood*. 117: 3748-3758, 2011.
34. Kitajima K, Kawaguchi M, Miyashita K, Nakajima M, Kanokoda M, Hara T. Efficient production of T cells from mouse pluripotent stem cells by controlled expression of Lhx2. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 20: 720-738, 2015.

35. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *The EMBO journal*. 16: 3145-3157, 1997.
36. Kitajima K, Kawaguchi M, Iacovino M, Kyba M, Hara T. Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Stem cells*. 31: 2680-2689, 2013.
37. Retaux S, Bachy I. A short history of LIM domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Molecular neurobiology*. 26: 269-281, 2002.
38. Ostendorff HP, Peirano RI, Peters MA, et al. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature*. 416: 99-103, 2002.
39. Chambers J, Rabbitts TH. LMO2 at 25 years: a paradigm of chromosomal translocation proteins. *Open Biology*. 5: 150062, 2015.
40. Oram SH, Thoms JA, Pridans C, et al. A previously unrecognized promoter of LMO2 forms part of a transcriptional regulatory circuit mediating LMO2 expression in a subset of T-acute lymphoblastic leukaemia patients. *Oncogene*. 29: 5796-5808, 2010.
41. Ausserlechner MJ, Obexer P, Geley S, Kofler R. G1 arrest by p16INK4A uncouples growth from cell cycle progression in leukemia cells with deregulated cyclin E and c-Myc expression. *Leukemia*. 19: 1051-1057, 2005.
42. Sawai CM, Freund J, Oh P, et al. Therapeutic targeting of the cyclin D3:CDK4/6 complex in T cell leukemia. *Cancer Cell*. 22: 452-465, 2012.

謝辞

本研究の実施に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 細胞療法分野 北村俊雄教授、合山進准教授に心より感謝の意を表します。

本研究を通じて6年間終始直接の御指導、御助言を戴きました公益財団法人東京都医学総合研究所 幹細胞プロジェクトの原孝彦プロジェクトリーダー、北島健二主席研究員に深く感謝致します。

天然物ライブラリーの提供及びスクリーニングの実施において、直接の御指導御鞭撻を頂きました国立研究開発法人産業技術総合研究所 最先端バイオ技術探求グループ新家一男研究グループ長、加賀谷紀貴博士、ヒット化合物の精製を頂いた泉川美穂博士に深く感謝致します。

東京都立駒込病院血液内科の大橋一輝部長、稲本恭子医師、名島悠峰医師、土岐典子医師、小林武医師、垣花和彦医師には白血病患者検体をご提供いただき、御礼申し上げます。本研究の実施に際し、検体の御提供に御賛同頂きました白血病患者の皆様とその御家族の皆様にも心より感謝の意を表します。

最後に、本研究を陰で支えてくださいました父・英一、母・美和に対してここに感謝の意を表します。