

ミトコンドリア機能異常を標的とした高齢者に適用可能な 急性骨髄性白血病新規治療法の開発

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
助教 阪本 貴士

(共同研究者)

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学	大学院生 徳田 知佳
京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学	大学院生 奥 雄暉
京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学	技術補佐員 阪本 千裕

はじめに

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) は加齢とともに発症頻度の上がる血液悪性疾患である。近年の病態理解・新規薬剤の登場により、高齢者など、強力な化学療法や造血幹細胞移植治療が適応とならない症例についても、薦められる治療戦略がガイドライン上も示されるようになってきている。AMLでは、その主役の一つになっているのが、抗アポトーシス分子Bcl2阻害薬 (venetoclax) + 脱メチル化薬 (azacitidine) の2剤併用療法である。臓器機能の低下した高齢者にも比較的安全に施行でき、同時に寛解率も高く、高齢AML患者に大きな恩恵をもたらしている。しかしながら、本治療レジメンのみで長期寛解を得られる症例は少なく、一定の寛解期間ののちに再発を来す症例が多いため、高齢者にも安全に実施可能な新たな治療レジメンがより多種類開発されることが、次の課題の一つである。

Venetoclaxの実臨床での成功から、ミトコンドリア機能を標的とする種々の薬剤や抗アポトーシス機能を阻害する薬剤についても、良好な抗白血病効果を有する可能性があると期待でき、盛んに研究が行われている。申請者らは留学中に *Idh1*^{R132} 変異と *Npm1c* 変異のダブルミュータントマウスが効率よくAMLを発症することを見出だし、そのダブルミュータント細胞の遺伝子変異プロファイリングデータから、酸化的リン酸化やヘム合成に関わる遺伝子群の発現が低下していることが分かった (図1)。また、本AMLマウスにvenetoclax治療を行うと生存延長効果が観察された (Wu HC, et al., *Cancer Discov.* 2021)。これらのデータから、*Idh1*^{R132};*Npm1c*ダブルミュータント細胞では、ミトコンドリア機能の変調が生じていることが示唆され、本AMLマウスモデルは、多種多様なAMLのなかでも、抗アポトーシス機能やミトコンドリア機能を標的とする薬剤の良好な感受性が期待できるAMLサブタイプであると推察された。本研究では、この申請者らが独自に確立した *Idh1*^{R132};*Npm1c*ダブルミュータントAML細胞を用いて、ミトコンドリア機能異常・代謝変化を標的とした治療薬の効果を検証し、臨床応用期待性の高い治療戦略提案へつなげるべ

く、基盤となるデータの創出を目指した。

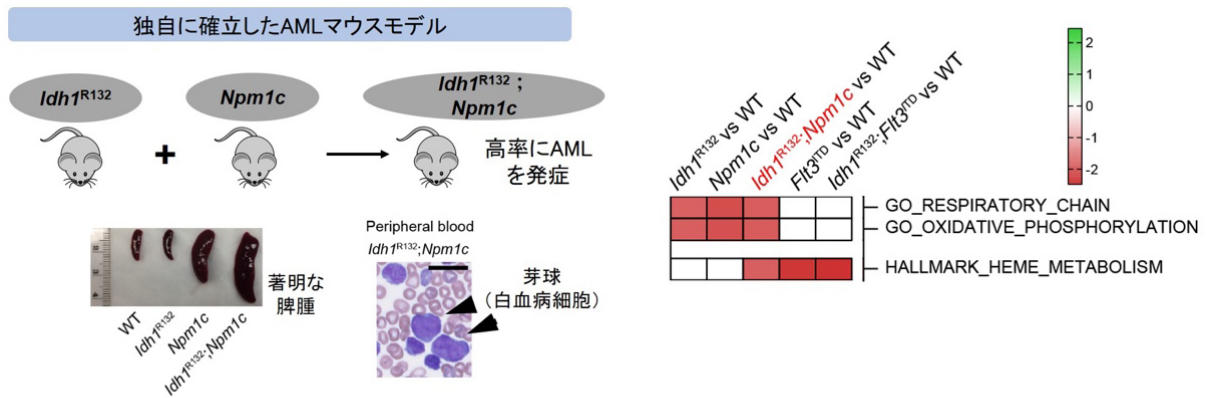


図1 *Idh1^{R132};Npm1c*変異体ダブルノックインAMLマウスモデル。酸化的リン酸化やヘム合成に関わる遺伝子群の発現低下を認めた。

結果

これまで、*Idh1^{R132};Npm1c* AML細胞は、放射線照射レシピエントマウスへの骨髄移植によって*in vivo* (マウス生体内) では継代・増殖可能で繰り返しレシピエントマウス内で致命的な白血病を発症するが (図2A)、半固形培地 (メチルセルロース) や液体培地等の*in vitro*では長期にわたって細胞を維持・継代することには成功していない。そこで、*in vitro*で抗ミトコンドリア機能阻害薬の効果を検証するため、*Idh1^{R132};Npm1c*マウスAML細胞を液体培地で一定期間培養を行うための培養条件の検討を行った。

凍結保存された*Idh1^{R132};Npm1c* AMLマウス骨髄細胞 (CD45.2⁺) を放射線照射CD45.1⁺ レシピエントマウスに骨髄移植すると、3-4週間後にAMLを発症し致命的となる (図2A)。このAMLマウスから骨髄細胞を回収し、メチルセルロース培地 Methocult M3434 (STEMCELL Technologies) に加えコロニー形成能を評価した。細胞の自己複製能を維持するためには、様々なサイトカインが必要である。元々 M3434には、造血幹細胞や造血前駆細胞に必要とされるIL-3、IL-6、SCF、EPOなどのサイトカインが添加されているが、AML細胞の増殖・維持を促進する可能性が考え得る様々なサイトカインをさらに添加し、コロニー形成能を評価した。近年、炎症性サイトカインや炎症・免疫反応シグナルがAML発症や病態形成への寄与の重要性が分かってきており (Liang, et al., *Cell*. 2017, Galen PV, et al., *Cell*. 2019, Yeaton A, *Cancer Discov*. 2022)、特にinterleukin-1 β (IL-1 β) がAML細胞の増殖を促進するという報告があることから (Carey A, et al., 2017 *Cell Rep.*)、IL-1 β を添加しその効果を観察した。AMLマウス骨髄細胞をメチルセルロース培地にプレーティング後、約10日で多数の細胞コロニーを形成した。この細胞コロニーを回収し、フローサイトメトリー (FACS) で解析すると、そのほとんどがCD45.2陽性でドナー由来*Idh1^{R132};Npm1c*ミュータント細胞由来であった (図2B)。1st platingからの回収細胞をもう一度メチルセルロース培地に2nd platingすると、再び約10日後に細胞コロニーを形成した。同様に細胞を回収しFACS解析すると、驚くべきことに、IL-1 β 添

加無しのplateではCD45.2 *Idh1*^{R132};*Npm1c* AML由来のコロニーの割合が減りレシピエント (CD45.1) 由来のコロニーが優位となったのに対して、IL-1 β 添加有りのplateではCD45.2 *Idh1*^{R132};*Npm1c* AML由来のコロニー形成が持続していた (図2B)。以上の結果から、炎症性サイトカインIL-1 β は、マウス*Idh1*^{R132};*Npm1c* AML細胞の自己複製能の維持に貢献する可能性が示唆された。

そこで次に、液体培地でも、マウス*Idh1*^{R132};*Npm1c* AML細胞の維持・継代に、IL-1 β が効果をもたらす可能性を検証した。20% (v/v) BIT 9500 serum substitute (Stem Cell Technologies, Cat# 09500), 2 mM L-アラニル-L-グルタミン (ナカライテスク)、および以下のサイトカイン (10 ng/mL IL-6 (Peprotech), 10 ng/mL IL-3 (Peprotech), 50 ng/mL SCF (Peprotech), 50 ng/mL FLT3L (Peprotech) and 25 ng/mL TPO (Peprotech)) を加えたX-VIVO 10培地 (Lonza, Cat# 04-380Q) に、移植*Idh1*^{R132};*Npm1c* AMLマウス骨髄細胞を懸濁し、10 ng/mL IL-1 β (Peprotech) の添加有りとし無しの条件で、継代し続けた (図2C)。その結果、IL-1 β の添加無しでは2~3週間で継代が不可能になり細胞が増殖しなくなったのに対して、IL-1 β の添加有りでは4~6週にわたって細胞を継代・維持することが可能になった。すなわち、炎症性サイトカインIL-1 β がマウス*Idh1*^{R132};*Npm1c* AML細胞の維持や増殖を助けていることが再度確認された。また、マウス*Idh1*^{R132};*Npm1c*ダブル mutant細胞に対し、液体培地において薬剤処理実験を行うことが可能になった。

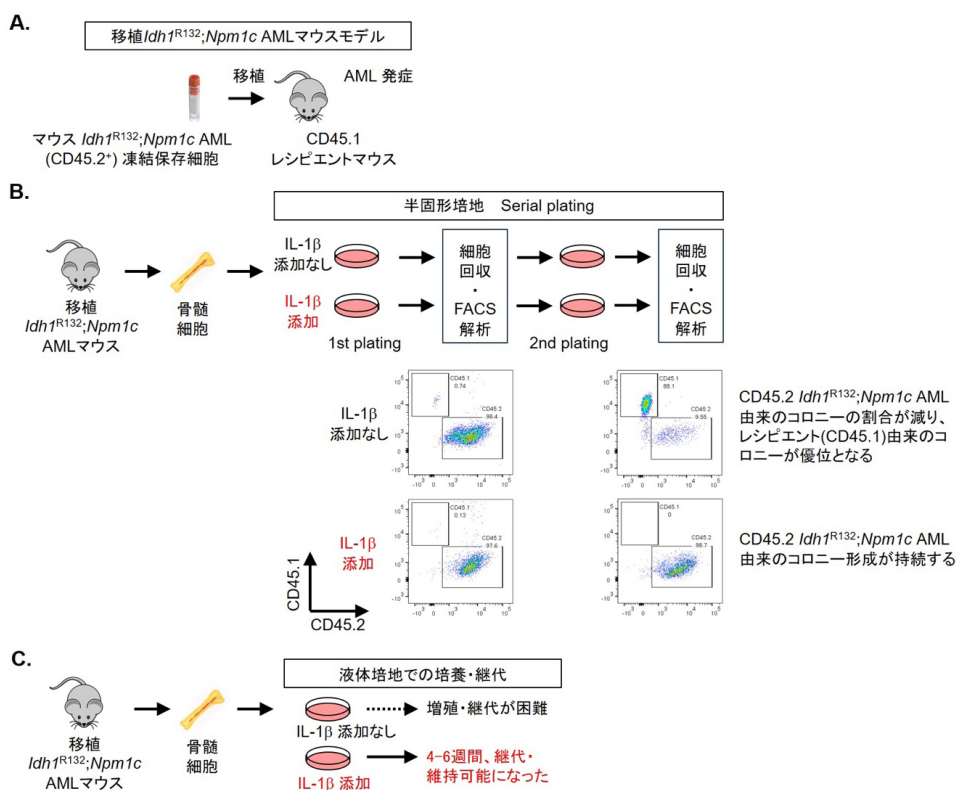


図2 *Idh1*^{R132};*Npm1c*ダブル mutantマウスAML細胞は、マウス生体内 (*in vivo*) では移植・継代可能であったが、*in vitro* では長期間維持・継代することができない。しかしこのたび、炎症性サイトカインであるinterleukin-1 β (IL-1 β) を培地中に添加することにより、数週間にわたって*Idh1*^{R132};*Npm1c* AML細胞を維持・継代できるようになり、*in vitro*での薬剤処理実験が可能となった。

上述のIL-1 β 添加液体培地で維持されたマウス $Idh1^{R132};Npm1c$ ダブルミュータント細胞に対して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害薬であるIACS-010759の効果を検証した。比較コントロールとして、すでにIDH1 変異AMLに対する分子標的薬としてFDAで認可され米国などでは臨床現場で既に使用されている、変異IDH1 阻害薬AG-120 (ivosidenib) を用いた。図3に示す各濃度で薬剤を添加し、72時間後の生細胞の割合を、フローサイトメトリーによるAnnexin V⁻, 7AAD⁻ 細胞の割合で評価した。この実験条件では効果はマイルドであったが、ミトコンドリア阻害剤IACS-010759は、既存薬剤であるAG-120と同程度に生細胞率の低下を認め細胞増殖抑制効果を示すことが示唆された。今後、より長時間の薬剤処理による効果の観察を行い、その効果が十分に期待できることを確認したうえで、移植 $Idh1^{R132};Npm1c$ AMLマウスに対する*in vivo* 治療実験を行い、その臨床応用妥当性を検証して行く必要がある。

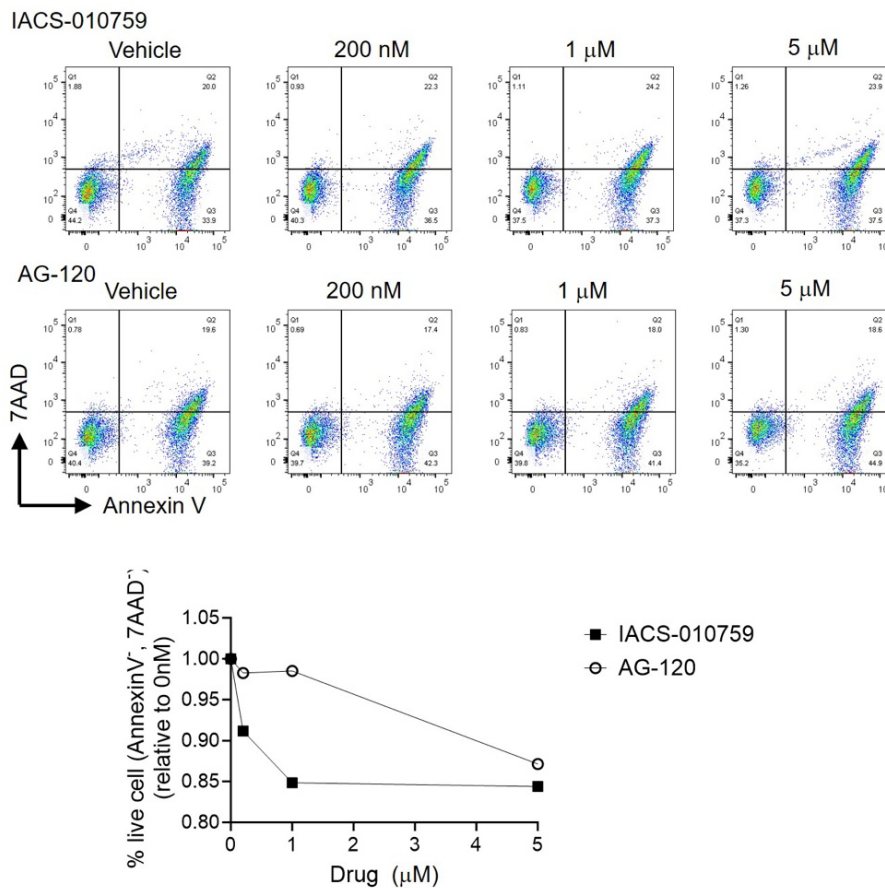


図3 $Idh1^{R132};Npm1c$ ダブルミュータントAML細胞に対する、*in vitro* 薬剤処理の効果。ミトコンドリア阻害剤 IACS-010759は、標準治療薬である $Idh1$ 変異阻害薬AG-120と同様に細胞増殖抑制効果を示した。

考 察

マウス $Idh1^{R132};Npm1c$ ダブルミュータント細胞に対して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害薬であるIACS-010759が、既存の標準治療薬であるIDH1 阻害薬AG-120

(ivosidenib)と同様に細胞増殖抑制効果が存在する可能性が示唆された。より長時間の薬剤処理など、実験を重ねてその効果が十分に期待できることを確認する必要があるが、移植 $Idh1^{R132};Npm1c$ AMLマウスに対する*in vivo*治療実験に進む価値が十分ある。 $Idh1^{R132};Npm1c$ ダブルミュータントAMLマウスモデルは、申請者らが留学中に独自に確立したAMLマウスモデルで、遺伝子変異ノックインマウスという生体内病理を極めて良く反映したマウスモデルであり、実際に血液学的表現型や遺伝子発現プロファイル、薬剤反応性の面からも、相当するヒトAMLの病態を非常に良く模倣していることをこれまでの解析で確認し得ている（未発表データ、manuscript in preparation）。従って、本AMLマウスモデルを用いた実験から得られる新たな知見は、高い臨床応用性・創造性が期待できる。移植 $Idh1^{R132};Npm1c$ AMLマウスに対する*in vivo*治療実験により、有意な生存延長効果等が確認できれば、臨床応用の可能性が広がる。

IACS-010759以外のミトコンドリア呼吸鎖複合体に対する阻害薬も、AMLに対する効果が期待できる。それらの中には、すでに他疾患の治療薬として広く使用されている薬剤もある（糖尿病に対するmetforminや、ニューモシスチス肺炎に対するatovaquoneなど）ため、もしAMLに対する良好な効果が確認できればドラッグリポジショニングにより速やかにAML治療薬として応用することも期待できる。IACS-010759と同様に、検証を進めてゆく価値が十分にあると考える。

AMLには様々なサブタイプがあり、その生物学的特徴も多様である。本研究では、1種類のAMLモデルに対する検証しか行えていないため、どれくらい広範囲のAMLサブタイプに抗ミトコンドリア薬が有効かは不明であり、それを知るには今後の多大な研究が必要である。しかし、ある一定のサブタイプのAMLだけであっても抗ミトコンドリア薬が臨床的に良好な効果を示すならば、AMLの治療において大きな恩恵をもたらすことが期待される。具体的には、①副作用が軽微な薬剤として高齢者にも比較的安全に適用可能な薬剤になり得る可能性があること、②他の治療薬との併用によって相乗的な効果をもたらす可能性があること、③既存の薬剤とは作用機序が明らかに異なることから、既存治療薬に対する治療抵抗性を解除したり治療抵抗性獲得を防いだりなど、難治性・治療抵抗性の症例にも効果を呈する可能性があることである。

要 約

AMLは加齢とともに発症頻度の上がる血液悪性疾患であるが、高齢者では強力な化学療法や造血幹細胞移植治療が適応とならない症例が多い。臓器機能の低下した高齢者にも安全に実施可能な治療方法を開発することが、臨床的に重要な課題の一つである。現在、そのような治療法の主役になっているのが、脱メチル化薬 (azacitidine) や抗アポトーシス分子Bcl2阻害薬 (venetoclax) などの分子標的薬である。Venetoclaxの実臨床での成功から、他の抗ミトコンドリア機能阻害薬もAMLに対する有望な治療薬とならないか研究が進んで

いる。本研究では、我々はマウス *Idh1*^{R132};*Npm1c* ダブルミュータント AML マウスモデルに対する抗ミトコンドリア機能阻害薬の効果を検証した。まず、*in vitro* の液体培地下でマウス *Idh1*^{R132};*Npm1c* ダブルミュータント細胞を一定期間維持できる実験系の確立に成功した。次に、この液体培地下でマウス *Idh1*^{R132};*Npm1c* ダブルミュータント細胞を、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害薬である IACS-010759 と、すでに IDH1 変異 AML に対する治療薬として FDA で認可されている変異 IDH1 阻害薬 AG-120 (ivosidenib) とで処理し、細胞増殖抑制効果を調べた。ミトコンドリア阻害剤 IACS-010759 は、既存薬である AG-120 と同程度に生細胞率の低下を認め細胞増殖抑制効果を示すことが示唆された。今後、移植 *Idh1*^{R132};*Npm1c* ダブルミュータント AML マウスに対する *in vivo* 治療実験を含めてより詳細な実験を重ね、AML の治療薬開発につながる基礎的データの蓄積を目指す。

文 献

学会発表未、論文発表未