

公益財団法人
薬理研究会

助 成 研 究 報 告

第 59 集

2021 年度

序

本財団では、平成 11 年度から、「薬物治療に関する基礎的研究並びに実地応用上の研究」をテーマに研究助成者を公募してきました。

2021 年度には 49 件の応募をいただき、本財団の選考委員会において厳正に審査を行った結果、次の 7 名の研究者に研究助成金を支給しました。

東北大学 加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野	家村 顕自	助 教
順天堂大学 医学部 薬理学講座	上 窪 裕 二	准教授
広島大学 大学院医系科学研究科 分子細胞情報学	齋 藤 敦	准教授
名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野	鈴 木 良 明	講 師
北海道大学 大学院医学研究院	乗 本 裕 明	准教授
東京大学 保健・健康推進本部	平 池 勇 雄	助 教
国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究ユニット	吉 見 昭 秀	独立ユニット長

ここに、上記 2021 年度に研究助成を受けられた方々による研究成果を、助成研究報告第 59 集として刊行するものです。

本財団の研究助成によって、薬理学、薬学に係わる基礎的研究が着実に進められていることは、誠に悦ばしいことであります。

研究助成を受けられた方々におかれては、本財団の設立の趣旨を体し一層のご精進を期待しております。

2022 年 12 月

公益財団法人 薬 理 研 究 会
理事長 遠 藤 實

目 次

1	染色体不安定性がん細胞の増殖優位性獲得機構を抑制する薬理活性化合物の探索	家村 顕自	東北大学 加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野	p.1
2	異種の受容体間相互作用を操作することによる神経伝達の制御	上窪 裕二	順天堂大学 医学部 薬理学講座	p.4
3	小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の誘導を介した p53 非依存的な癌治療薬の開発	齋 藤 敦	広島大学 大学院医系科学研究科 分子細胞情報学	p.8
4	興奮転写連関を標的とした血管リモデリング疾患の新規治療法の確立	鈴木 良明	名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野	p.11
5	レム・ノンレム睡眠時脳波の発生源の同定とその生成機構の解明	乗本 裕明	北海道大学 大学院医学研究院	p.14
6	褐色脂肪組織の活性化による肥満症治療へ向けた転写因子 NFIA の機能解析	平池 勇雄	東京大学 保健・健康推進本部	p.18
7	IDH 阻害剤抵抗性白血病に対する新規標的治療法の確立	吉見 昭秀	国立がん研究センター研究所 がん RNA 研究ユニット	p.21

1. 染色体不安定性がん細胞の増殖優位性獲得機構を抑制する薬理活性化合物の探索

家村 顕自

(東北大学 加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野)

【背景・目的】

がん細胞は、多様な生育環境に適応するために、様々な形質や異なる遺伝情報をもつ細胞集団から増殖優位性をもつ細胞クローンを選択増殖させる生存戦略を有している。細胞分裂を経るごとに染色体の数や構造が変動する染色体不安定性は、多くのがん細胞でみられる主たる表現型であり、がん細胞の多様性を構築する素因となる。がん細胞の多様性は、生体内の多様な環境やがん治療環境下に適応し、増殖する細胞の発生頻度を高めることから、悪性進展や治療抵抗性につながる。このことから、がん細胞の多様性によってもたらされる増殖優位性獲得機構を抑制できる薬理活性化合物は、抗がん剤耐性やがんの再発を抑止する創薬となり得る。しかしながら、染色体不安定性を介したがん細胞の増殖優位性獲得過程を特異的かつ効果的に抑制する化合物は見いだされていない。

これまでに、がん細胞株より染色体不安定性の発生頻度が異なる亜種を単離培養することに成功し、染色体不安定性を高頻度に有するがん細胞亜種株を三次元環境下で培養することで、がん細胞の増殖優位性獲得過程を *in vitro* で再現できることを明らかにした。本研究では、染色体不安定性の発生頻度が異なるがん細胞亜種株について、生細胞イメージング及び次世代シーケンサーを用いた全染色体コピー数解析を行い、その表現型を詳細に解析するとともに、二次元培養もしくは三次元培養を行った各々の亜種株に対し遺伝子発現解析 (RNA-seq 解析) を実施することで、増殖優位性獲得の抑制/亢進に必要な遺伝子群を明らかにし、染色体不安定性がん細胞の増殖優位性獲得過程を効果的に抑制する化合物を同定する。

【結果・考察】

(1) 染色体不安定性を高頻度に誘発する細胞集団では細胞周期が遅延している

染色体不安定がん細胞の増殖優位性獲得過程を詳細に解析するために、染色体不安定性がん細胞 (HeLa 細胞) の増殖過程を 3 日間生細胞観察し、全細胞の増殖過程を追跡することで染色体不安定性が細胞増殖の系譜に与える影響を検証した (図 1A)。まず、親株について増殖回数を測定したらところ、増殖抑制が抑制されている細胞が観察した細胞全体の約 30% を占めていることがわかった。一方で、観察した細胞全体の約 30% は、観察中に 8 回以上分裂 (細胞周期 3 周以上) していた。この結果から、HeLa 細胞は増殖速度が多様な細胞集団で構成されていることが示唆された (図 1B)。次に、染色体不安定性細胞の発生頻度が異なる HeLa 亜種株を用いて同様の解析を行なった。その結果、染色体不安定性の発生頻度が低い亜種株 (Low-CIN) では、3 日間のうち 1 回分裂もしくは分裂しなかった細胞が約

20%染色体不安定性の発生頻度が高い亜種株（High-CIN）では約 40%存在していることがわかった（図 1C）。以上の結果から、染色体不安定性は細胞周期遅延を引き起こす可能性が示唆された。

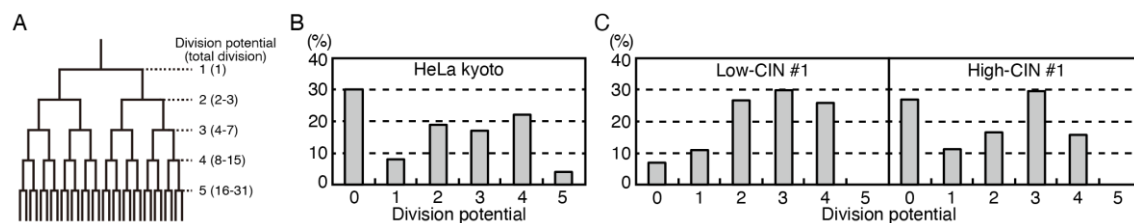


図 1. 生細胞観察時間中の細胞分裂回数

(2) 染色体不安定性が惹起する染色体コピー数の多様性はバルクシーケンスでは検出できない

これまでに実施していた一細胞コピー数解析の結果を平均化し、Low-CIN 株と High-CIN 株、二次元培養と三次元培養それぞれにおける染色体コピー数の変化を比較すると、一部の染色体領域において特徴的なコピー数変動がみられることを確認している。この染色体領域のコピー数変動は、一細胞解析結果の平均値より推定できることから、全ゲノムバルクシーケンスによる染色体コピー数の推定によっても同様に検出可能であるか検証した。これまでの実験で取得していた Low-CIN 株と High-CIN 株に加え、更に 1 株ずつ新たに Low-CIN 株 (#2) と High-CIN 株 (#2) を単離し、全ゲノムシーケンスを実施した後、染色体コピー数を推定した。その結果、染色体不安定性の発生頻度の違いより、単離した時期（クローン間）の違いの方が染色体コピー数に大きな変化をもたらすことがわかった（図 2）。一方で、一細胞解析結果の平均値から算出した染色体コピー数の変動はバルクシーケンスによっても一部確認することができた。この結果から、染色体不安定性によってもたらされる染色体コピー数の多様性は、バルクシーケンスによる解析では検出不可能ではあるが、特徴的なコピー数の変動については、バルクシーケンスでも検出可能であることが示唆された。

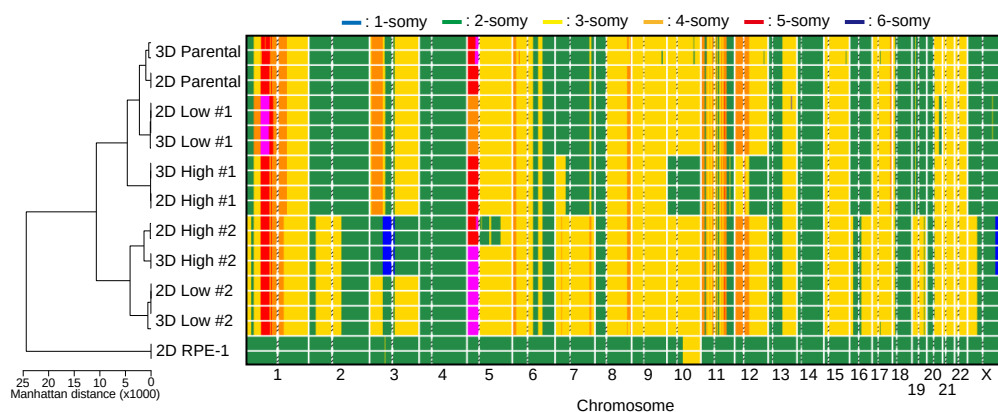


図 2. 全ゲノムバルクシーケンスにより推定した染色体コピー数

(3) 染色体不安定性細胞における増殖優位性の獲得にはKRAS経路の活性化とUPRの減弱が寄与する

三次元培養環境下における増殖優位性獲得に必要な分子機構を明らかにするために、これまで取得していた染色体不安定性の発生頻度が異なる HeLa 亜種株に加え、(2)において新たに単離した株について、それぞれ二次元培養及び三次元培養し、遺伝子発現 (RNA-seq) 解析を行なった。各々の条件における RNA-seq 解析結果より、gene set enrichment analysis (GSEA)を実施しその結果を比較解析したところ、High-CIN 細胞の三次元培養で特異的に変化した分子経路として、KRAS 経路の活性化と、unfolded protein response (UPR) の抑制が同定できた (図 3A)。そこで、KRAS 経路阻害剤及び、UPR 亢進薬を用いた細胞の増殖感受性試験を行なった。その結果、二次元培養条件下においては、両薬剤とも High-CIN 株、Low-CIN 株同程度に増殖を抑制することがわかった。一方、三次元培養条件下では、High-CIN 株において KRAS 経路阻害剤への感受性が亢進しており、UPR 亢進薬に対して抵抗性を示すことがわかった (図 3B)。KRAS 経路の活性化は折りたたみ不全タンパク質のクリアリングを促進することから、High-CIN 株の三次元培養における増殖亢進には、KRAS 経路活性による折りたたみ不全タンパク質の解消が寄与している可能性が示唆された。

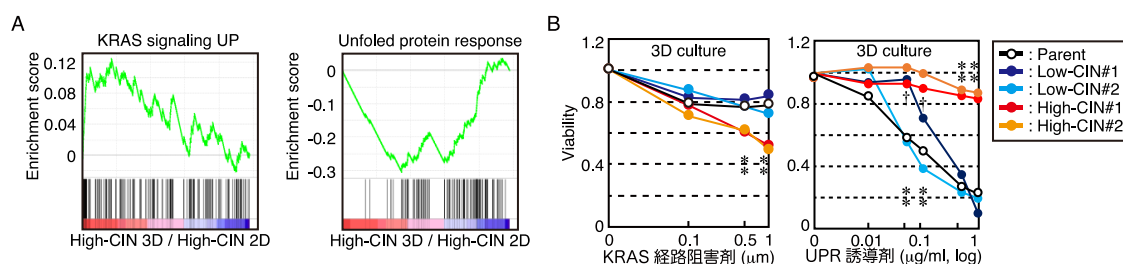


図 3. GSEA 解析で同定できた分子経路 (A) と薬剤を用いた増殖感受性試験 (B)

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

Iemura K., Anzawa H., Funayama R., Iwakami R., Nakayaa K., Kinoshita K., Tanaka K., High levels of chromosomal instability facilitate the tumor growth and sphere formation, *Cancer Sci.*, 2022, 113(8):2727-2737

2. 異種の受容体間相互作用を操作することによる神経伝達の制御

上窪 裕二

(順天堂大学 医学部 薬理学講座)

研究の背景と目的

細胞膜上には多種多様な膜タンパク質が発現し、様々な機能を果たしている。イオンチャネルなど複数の膜タンパク質が複合体を形成して 1 つの機能分子を形成することも多いが、G タンパク質共役型受容体(GPCR)は個々の分子が単独で機能し、細胞内で共役する三量体 G タンパク質を介してシグナル伝達を行っているという考えに基づき研究が進められてきた。しかしながら、近年の膜タンパク質の構造と機能解析技術の進歩に伴い、同種または異種の GPCR 同士が複合体を形成したり、他の膜タンパク質と相互作用したりすることで単量体では実現できないような細胞機能の制御を行っている可能性が示唆されている(1, 2)。近年の膜タンパク質研究や著者らの未発表の研究結果などから、GPCR はより巨大な複合体(超複合体)を形成し、複雑な膜輸送やシグナル伝達の制御を行うことが明らかにされつつある(3)(図 1)。一方、生体内での超複合体機能を解析する実験系の確立は困難であり、その生理的な役割はほとんど謎のままである。多種多様な膜分子の複合体の集合である超分子の解析には単純化したモデルをもちいて、「多様膜分子が単独で機能する場合」と「超複合体を形成し機能している場合」が夾雑する生体内で超複合体のみを選択的に操作し、解析する研究手法の開発が不可欠である。著者らは、異種の GPCR 同士が形成する複合体を超複合体の単純化モデルとし、cDNA ディスプレイ法とシングルドメイン抗体を用いた人工抗体や核酸アプタマーを用いて超複合体の操作・解析ツールの作成を推進してきた。本研究では、DNA アプタマーを用いて GPCR が形成する超複合体を分子レベルで解析し、薬理的に操作を目指し研究を実施した。DNA アプタマーは遺伝子工学的な改変や、構造解析が容易であるための膜タンパク質研究への波及効果が期待できる。さらに、GPCR 超複合体を解析することはより巨大な膜タンパク質超複合体解析の嚆矢となり得る。

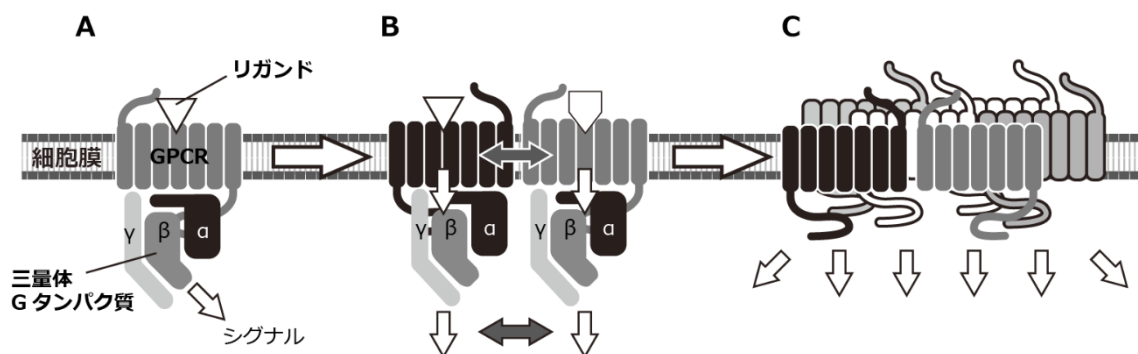


図 1. G タンパク質共役型受容体(GPCR)の巨大複合体形成
(A)GPCR が単独で機能する場合、(B)ヘテロ二量体を形成する場合、(C)超複合体を形成する場合の模式図

方法と結果

本研究では細胞膜上で形成される GPCR を中心とした超複合体の分子動態と生理機能に注目する。GPCR 超複合体の解析し、会合様式や受容体機能を操作するために DNA アプタマーなどを用いる。

GPCR 超複合体を形成し、操作・解析ツールの作製を行うため、複数の標的 GPCR をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株を作成し、クローニングを行った。著者らは複数の手法を組み合わせることで複数種類の標的 GPCR を誘導発現する細胞株の作製を可能とした(1, 4)(図 2)。GPCR のシグナル伝達を解析するために VSVG-バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を確立し、細胞内カルシウムインジケーターと cAMP インジケーターを発現させることを可能とした(3)。さらにバキュロウイルスベクターの精製法を確立し、初代培養神経細胞への遺伝子導入を可能とした。これらを用いて、標的 GPCR のシグナル伝達の定量的な解析を行い、GPCR 複合体形成による機能的な相互作用の定量的な解析を実施している(図 3)。

作成した細胞株クローンを用いて、GPCR ヘテロ複合体を認識する DNA アプタマーの作製を行った。細胞膜上の標的因子に結合する DNA アプタマーを PCR 法により増幅・回収する探索法 (Cell SELEX 法(5, 6)) ではターゲット分子に特異性の高い DNA アプタマーが作出しにくいという欠点があった。著者らは、生理活性を利用して DNA アプタマーライブラリ($10^{12} \sim 10^{14}$)から選別を行う次世代 Cell SELEX 法を用いることで上記の欠点を克服し、機能的な相互作用と生理的な意義が明らかにしてきた代謝型グルタミン酸受容体を中心とする膜タンパク質超複合体を認識する DNA アプタマーライブラリ(10^{12})を構築した。さらに、作製した DNA アプタマーの評価を行い、細胞内の GPCR ヘテロ複合体の標識や活性化の誘導が可能となった。

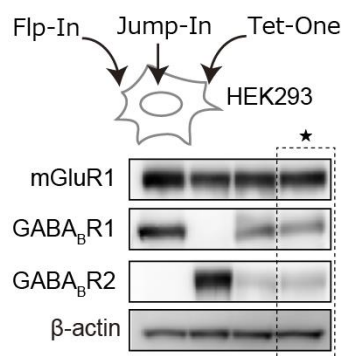


図 2. 3 種類の GPCR の誘導発現化

IRES 配列などとの組合せで 6 種類以上の GPCR を安定発現できる。

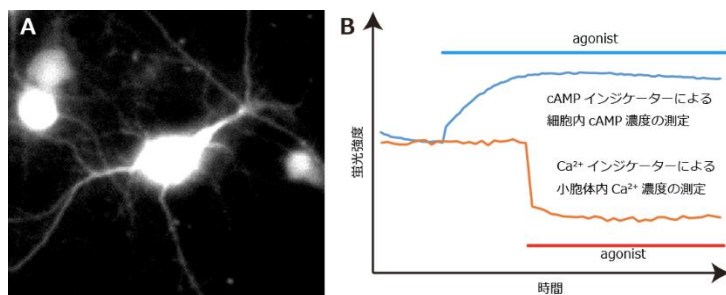


図 3. (A) バキュロウイルスベクターによる神経細胞への cAMP インジケーターの発現。
(B) Ca²⁺インジケーターと cAMP インジケーターによる GPCR シグナルの測定

考察

標的 GPCR 複合体をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株と次世代 Cell SELEX 法を組み合わせることで、GPCR 複合体を標的とする DNA アプタマーを作成することができた。DNA アプタマーを直接蛍光色素でラベルすることで GPCR 複合体のライブセル・イメージングが可能となる。複数種類のアプタマーを連結することによってさらに巨大な複合体を特異的に認識する分子ツールの開発につながることが期待される。今後は、ナノボディや共有結合リガンドなど複数の手法を組み合わせることで膜タンパク質超複合体の解析を実施する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。DNA アプタマーの作製および評価については、産業技術総合研究所の池本光志博士、富山大学工学部の田端俊英博士に多大なご協力を賜りました。またバキュロウイルスベクターについては、順天堂大学医学部の村山尚博士の指導と協力のもと実施いたしました。

文献

1. H. Sakairi, Y. Kamikubo, M. Abe, K. Ikeda, A. Ichiki, T. Tabata, M. Kano and T. Sakurai: G Protein-Coupled Glutamate and GABA Receptors Form Complexes and Mutually Modulate Their Signals. *ACS Chem Neurosci*, 11(4), 567-578 (2020) doi:10.1021/acscchemneuro.9b00599
2. D. Masukawa, M. Koga, A. Sezaki, Y. Nakao, Y. Kamikubo, T. Hashimoto, Y. Okuyama-Okii, A. C. Aladeokin, F. Nakamura, U. Yokoyama, H. Wakui, H. Ichinose, T. Sakurai, S. Umemura, K. Tamura, Y. Ishikawa and Y. Goshima: L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha1-adrenergic receptor. *JCI Insight*, 2(18) (2017) doi:10.1172/jci.insight.90903
3. Y. Kuroda, M. Nonaka, Y. Kamikubo, H. Ogawa, T. Murayama, N. Kurebayashi, H.

- Sakairi, K. Miyano, A. Komatsu, T. Dodo, K. Nakano-Ito, K. Yamaguchi, T. Sakurai, M. Iseki, M. Hayashida and Y. Uezono: Inhibition of endothelin A receptor by a novel, selective receptor antagonist enhances morphine-induced analgesia: Possible functional interaction of dimerized endothelin A and mu-opioid receptors. *Biomed Pharmacother*, 141, 111800 (2021) doi:10.1016/j.biopha.2021.111800
4. E. Komiya, M. Tominaga, R. Hatano, Y. Kamikubo, S. Toyama, H. Sakairi, K. Honda, T. Itoh, Y. Kamata, M. Tsurumachi, R. Kishi, K. Ohnuma, T. Sakurai, C. Morimoto and K. Takamori: Peripheral endomorphins drive mechanical allodynia under the enzymatic control of CD26/DPPIV. *J Allergy Clin Immunol*, 149(3), 1085-1096 (2022) doi:10.1016/j.jaci.2021.08.003
5. C. Tuerk and L. Gold: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), 505-10 (1990) doi:10.1126/science.2200121
6. A. D. Ellington and J. W. Szostak: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818-22 (1990) doi:10.1038/346818a0

3. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の誘導を介した p53 非依存的な癌治療薬の開発

齋藤 敦

(広島大学大学院 医系科学研究科 分子細胞情報学)

[背景および目的]

DNA 損傷に応答して活性化した小胞体膜局在転写因子 OASIS は膜内切断を受け、DNA 結合領域を含む N 末端断片が核内に移行して転写因子として機能する。研究代表者は DNA 損傷依存的に活性化した OASIS が細胞周期抑制因子群の発現を誘導し、癌抑制機構として働く細胞老化を引き起こすことを見出している。また、複数の癌細胞および腫瘍において OASIS プロモーターが高度にメチル化されており、その発現が抑制されていることを発見している^{(1),(2)}。このことから、OASIS の発現低下による細胞老化の抑制が、腫瘍の発達に繋がる可能性が示唆される。本研究では研究代表者が見出した OASIS による細胞老化誘導機構の全貌を解明することを目的とする。さらに癌で多く見られる p53 変異型の癌にフォーカスし、エピゲノム編集技術を応用した OASIS プロモーターの人工的な特異的脱メチル化とその発現誘導法による p53 活性非依存的な癌化抑制を試みる。

[方法と結果]

1. 細胞老化における OASIS の役割解明

マウスより採取した初代培養アストロサイトを抗癌剤の一種ドキソルビシンで処理して 24 時間後にウェスタンブロッティングを行うと、OASIS の全長型と切断された N 末端断片のタンパク量および癌抑制遺伝子であり、細胞老化のマーカーとしても知られる p21 の発現レベルが上昇した。一方で OASIS 欠損アストロサイトではドキソルビシンによって誘導される p21 の発現上昇が有意に抑制された。

p21 は p53 によってその発現が誘導されることが知られている⁽³⁾。そこで OASIS が誘導する p21 の経路と p53 が誘導する p21 の経路のクロストークが成立するの否かを OASIS 欠損細胞および p53 に対する siRNA を用いて調べた。p53 のタンパク量および活性化フォーム（リン酸化 p53）の量は OASIS 野生型および欠損アストロサイトで大きな差がなかった。一方で p53 をノックダウンしてもドキソルビシン処理による OASIS 全長型および N 末端断片の量は変化しなかった。このことから両経路にクロストークは存在せず、OASIS は p53 非依存的に p21 の発現と細胞老化を誘導できることがわかった。

2. 癌細胞における OASIS プロモーター脱メチル化法の確立

p53 変異型ヒト glioblastoma U251MG 細胞では OASIS の発現レベルが極めて低い。DNA メチル化レベルを検出する bisulfite sequencing 解析を実施すると、この細胞では OASIS プロモーターが高度にメチル化されていた。エピゲノム編集技術を駆

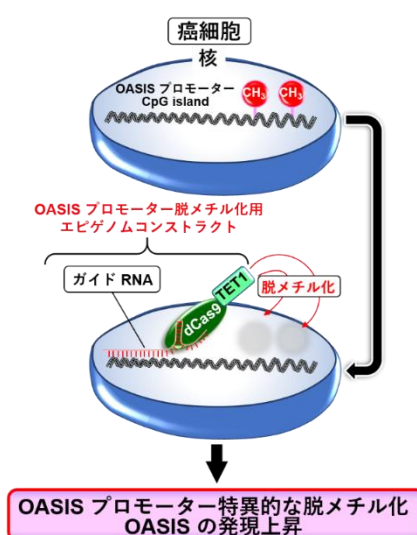


図 1. エピゲノム編集技術：OASIS プロモーターを標的とするガイド RNA (g RNA) を含む dCas9 (DNA 切断活性をもたない変異 Cas9) と TET1 との融合タンパク質を癌細胞に発現させ、TET1 を OASIS プロモーターに集積させる。

使し、DNA 切断活性を欠損した変異 Cas9 に脱メチル化酵素 TET1 を連結したタンパクと、OASIS プロモーターを特異的に認識する gRNA を同時に発現する all-in-one コンストラクト (OASIS-gRNA) を作成して (図 1) U251MG 細胞に導入すると、OASIS プロモーターが特異的に脱メチル化されるとともに OASIS と p21 の発現レベルが誘導され、細胞老化が誘導された (図 2)。

3. 腫瘍組織における OASIS プロモーター脱メチル化法の確立

異種間移植実験によってヌードマウスに移植した U251MG 由来の腫瘍に対し、OASIS-gRNA を in vivo transfection 試薬を用いて投与した。OASIS-gRNA を投与した腫瘍ではその成長が抑制された (図 3)。OASIS-gRNA を投与した腫瘍では OASIS プロモーター領域が特異的に脱メチル化されており、OASIS 全長型とその N 末端断片および p21 の発現レベルが上昇していた。この腫瘍では増殖細胞のマーカーである ki67 陽性細胞数の減少と p21 および senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 陽性の老化細胞増加も観察された。

以上の研究成果は現在学術論文としてまとめ、投稿中である。

[今後の展望]

多くの癌細胞において、癌抑制遺伝子のプロモーター領域は OASIS と同様に高メチル化状態となっており、その発現が抑制されていることが報告されている⁽⁴⁾。本研究成果は、腫瘍における特定プロモーター領域の脱メチル化法を確立するための足掛かりとなる。すなわち OASIS と同様にプロモーターが高メチル化状態にある癌抑制遺伝子の特異的脱メチル化とその発現誘導の実現に発展する可能性を秘めており、新たな癌治療法の選択肢となることが期待される。また、[背景および目的]にも記載した通り OASIS プロモーターは U251MG 細胞以外にも乳癌細胞や膀胱癌組織をはじめとする様々な癌細胞および腫瘍組織で高度にメチル化されている。このことから本研究成果が glioblastoma に留まらず様々な腫瘍に対する新規治療戦略の構築へと波及することが期待できる。

[成果発表]

1) 齋藤 敦. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS による細胞老化と癌化制御. 第 4 回徳島大学統合的がん創薬研究クラスター合同ミーティング, Web 開催, 3/8, 2021.

2) 齋藤 敦. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS を介した核膜ストレス応答シグナルによる細胞老化と癌化制御. 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会, Web 開催, 3/28-3/30, 2021.

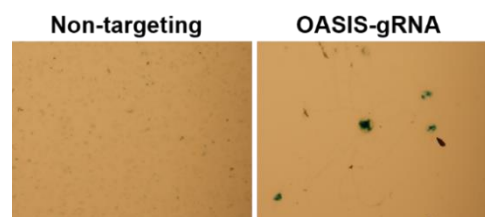


図 2. U251MG 細胞を用いた senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 染色。OASIS プロモーターを認識しない gRNA を発現するコンストラクト (Non-targeting) を発現させた細胞と比較して、OASIS-gRNA を発現させた細胞では SA- β -gal 陽性の老化細胞が増加する。

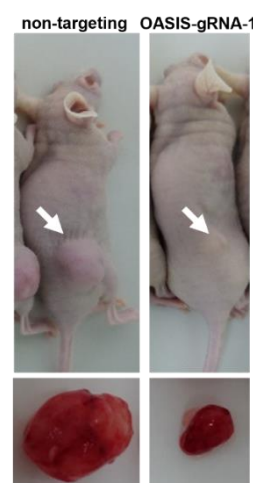


図 3. U251MG 細胞を用いた異種間移植実験。OASIS-gRNA (右) を移植した U251MG 細胞 (白矢印) に投与すると、non-targeting gRNA を組み込んだコンストラクトを投与した腫瘍 (左) よりその成長が抑制される (下図)。

3) **Atsushi Saito**, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi: Regulations of cellular senescence in glioblastoma mediated by ER-resident transcription factor OASIS. 第 64 回日本神経化学学会大会, web 開催, 9/30, 2021.

4) **Atsushi Saito**, Yasunao Kamikawa, Kazunori Imaizumi: p53-independent regulation of astrocyte proliferation mediated by ER-resident transcription factor OASIS activated by DNA damage. NEURO2022, 沖縄, 7/1, 2022.

5) **齋藤 敦**, 上川 泰直, 伊藤 泰智, 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 片桐 豊雅, 今泉 和則: 小胞体膜局在分子 OASIS による核膜ストレス応答を介した細胞増殖と癌化制御. 第 15 回小胞体ストレス研究会, 京都, 7/31, 2022.

【謝辞】

本研究遂行のために多大なるご助力を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Rose M., Schubert C., Dierichs L., Gaisa N. T., Heer M., Heidenreich A., Knüchel R., Dahl E.: OASIS/CREB3L1 is epigenetically silenced in human bladder cancer facilitating tumor cell spreading and migration in vitro. *Epigenetics*, **9**, 1626-1640, 2014.
- 2) Ward A. K., Mellor P., Smith S. E., Kendall S., Just N. A., Vizeacoumar F. S., Sarker S., Phillips Z., Alvi R., Saxena A. *et al.*: Epigenetic silencing of CREB3L1 by DNA methylation is associated with high-grade metastatic breast cancers with poor prognosis and is prevalent in triple negative breast cancers. *Breast Cancer Research*, **18**, 12, 2016.
- 3) el-Deiry W. S.: Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in Cancer Biology*, **8**, 345-357, 1998.
- 4) Herman J. G.: Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **9**, 359-367, 1999.

4. 興奮転写連関を標的とした血管リモデリング疾患の新規治療法の確立

鈴木 良明

(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

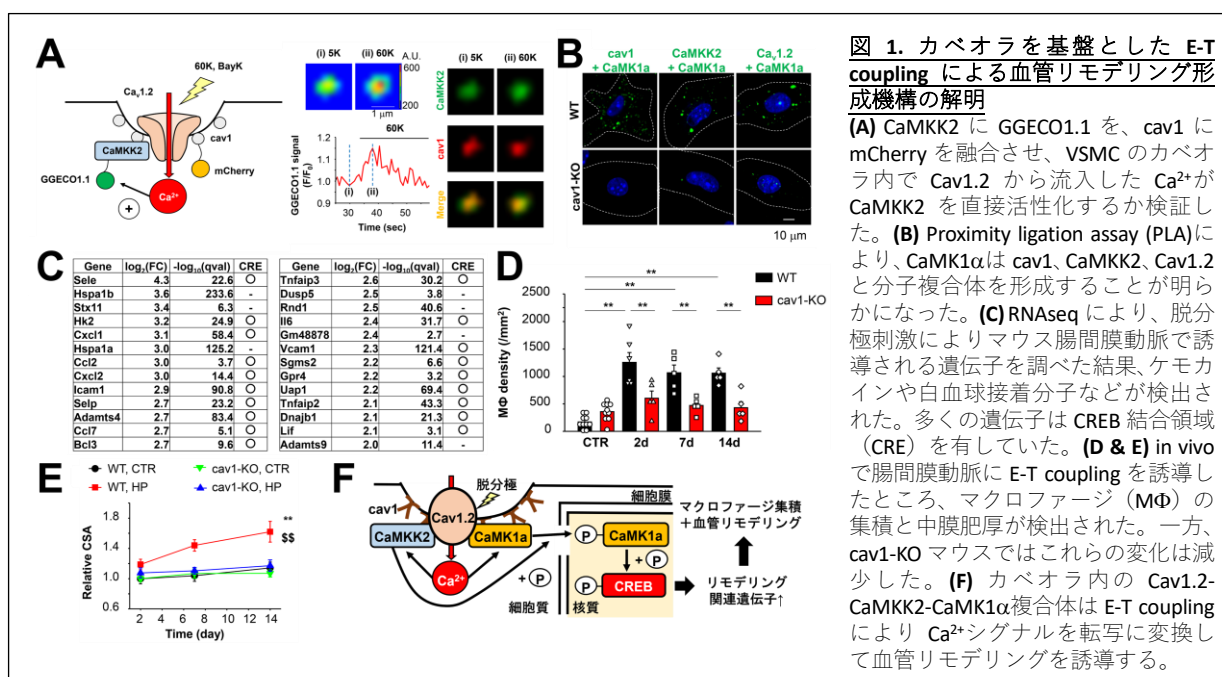
【背景・目的】

Ca²⁺シグナルは、セカンドメッセンジャーとしてシナプス間情報伝達や筋収縮など非常に多様な生体応答に関与する。また、電位依存性 Ca²⁺チャネルを起点とした Ca²⁺シグナルは、Ca²⁺/CaM dependent kinase (CaMK)などの Ca²⁺活性化因子を介して、遺伝子転写を引き起こす。この現象は興奮-転写連関 (E-T coupling) と呼ばれ、シナプスの可塑性や記憶の分子機構の 1 つに位置付けられる(1)。血管平滑筋でも E-T coupling の存在が知られていたが、具体的な分子機構・誘導される遺伝子・生理的な意義などについては不明な点が多いのが現状である(2, 3)。

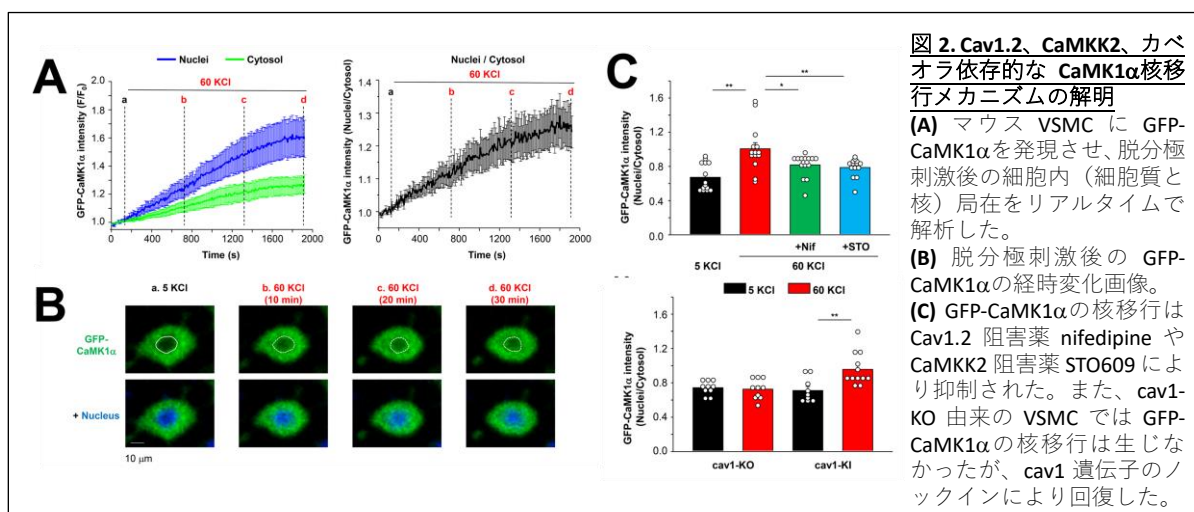
我々は、血管平滑筋細胞 (VSMC) では、細胞膜上の窪み構造「カベオラ」の構成分子であるカベオリン (cav) -1 が電位依存性 Ca²⁺チャネル (Cav1.2) とその下流分子を集積させて平滑筋張力を制御することを明らかにしてきた(4, 5)。本研究では、VSMC において E-T coupling に関連する分子群がカベオラに集積すると仮定して、VSMC における E-T coupling の生理的意義を解明することを目的とした。

【結果・考察】

マウス腸間膜動脈および大動脈由来の血管平滑筋細胞 (VSMC) において、カベオラ内に Cav1.2-Ca²⁺/CaM-dependent kinase kinase (CaMKK)-2-CaMK1α分子複合体が形成されることを発見した (図 1A, B) (6)。カベオラ内では、①Cav1.2 から流入した Ca²⁺が CaMKK2 と CaMK1αを活性化し、さらに②CaMK1αは CaMKK2 により直接活性化され、核に移行した



(図 2) (7)。核内で CaMK1 α は転写因子 CREB をリン酸化して、ケモカインや白血球接着分子など免疫細胞の遊走・浸潤を引き起こす遺伝子群を誘導した。血管壁へのマクロファージなどの免疫細胞の集積は、血管リモデリングを引き起こすことが知られている。そこで、in vivo で動脈に圧負荷を加えて VSMC を脱分極させて E-T coupling を誘導すると、血管壁へのマクロファージ集積と血管リモデリング (中膜肥厚) が観察された (図 1C~E)。一方、これらの反応は cav1-KO マウスの組織や CaMKK2 阻害薬 STO609 の投与により減弱した。以上より、カベオラを足場とした E-T coupling は、力学的負荷による持続的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇を炎症促進遺伝子群の転写へ変換することで、血管リモデリングを引き起こすと考えられた。



【まとめ・展望】

これまでに、アテローム性動脈硬化症をはじめとした血管リモデリング形成には、マクロファージの遊走が必要であるという「炎症説」が提唱されている(8, 9)。従来の炎症説では、免疫細胞の遊走を引き起こす具体的な機構は不明であったが、本研究により血管障害後のマクロファージ集積機構の1つが明らかになった (図 1F)。また、本研究で得られた知見は虚血性心疾患や脳血管障害など血管リモデリングを基礎とする重篤疾患や、肺高血圧症のようなアンメットメディカルニーズの高い平滑筋リモデリング疾患の新規治療標的の創出にもつながると期待できる。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人薬理学会の皆様に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Bading H (2013) Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature reviews. Neuroscience* 14(9):593-608.

2. Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Navedo MF, Molkentin JD, & Santana LF (2008) The control of Ca^{2+} influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(40):15623-15628.
3. Cartin L, Lounsbury KM, & Nelson MT (2000) Coupling of Ca^{2+} to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse : roles of ryanodine receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Circ Res* 86(7):760-767.
4. Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, & Imaizumi Y (2013) Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) and $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes. *J Biol Chem* 288(51):36750-36761.
5. Saeki T, Suzuki Y, Yamamura H, Takeshima H, & Imaizumi Y (2019) A junctophilin-caveolin interaction enables efficient coupling between ryanodine receptors and BK_{Ca} channels in the Ca^{2+} microdomain of vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 294(35):13093-13105.
6. Suzuki Y, *et al.* (2022) A molecular complex of $\text{Ca}_v1.2/\text{CaMKK2}/\text{CaMK1}\alpha$ in caveolae is responsible for vascular remodeling via excitation-transcription coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(16):e2117435119.
7. Suzuki Y, *et al.* (2022) Local Ca^{2+} Signals within Caveolae Cause Nuclear Translocation of $\text{CaMK1}\alpha$ in Mouse Vascular Smooth Muscle Cells. *Biol Pharm Bull* 45(9):1354-1363.
8. Ross R (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):115-126.
9. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917):868-874.

5. レム・ノンレム睡眠時脳波の発生源の同定とその生成機構の解明

乗本 裕明

(北海道大学 大学院医学研究院)

<背景・目的>

本研究の目的はレム睡眠・ノンレム睡眠の神経メカニズムと役割の解明である。脳は睡眠時などの休息状態においても絶え間なくリズムを刻む。このリズムは多数のニューロンが織りなす神経回路によって生み出される。代表的な休息状態の例として、レム睡眠やノンレム睡眠が挙げられる。レム睡眠・ノンレム睡眠時には特有の神経活動パターンが生じ、それらは外界からの刺激なしに何度も自発的に切替わる。しかしこれらの睡眠時における神経活動の役割は不明である。これを明らかにするために、本研究ではオーストラリアドラゴン (*Pogona vitticeps*, 以下ドラゴン) を用いる。なぜならば、ドラゴンも哺乳類と同様、レム睡眠およびノンレム睡眠をとる・摘出した全脳を”培養”することが可能であるといった長所を有するためである。本研究においては、この動物の *ex vivo* 標本を用い、脳の多領域から同時に局所場電位を記録することで睡眠・覚醒時脳波の発生源の候補を同定することを目指し、研究を行った。その結果、セロトニンを適用することにより脳の状態が覚醒(またはレム睡眠)様にダイナミックに切り替わることを発見した。

<結果>

申請者のこれまでの研究において、ドラゴンから全脳を摘出し、生きたまま”培養”することに成功している (Norimoto et al., *Nature*, 2020)。しかし、摘出したドラゴンの脳は神経活動的には睡眠状態であったため、薬理的に覚醒状態を誘導することを試みた。覚醒時には 8-30Hz の周波数成分のパワーが増加することが知られているため、これを脳状態変化の指標とした。

全脳標本へのセロトニンの適用

睡眠時に脳内濃度が低く、覚醒時に高いことが知られており、さらには覚醒誘導作用があることの知られるセロトニン (5-HT) を還流適用したところ、一過的ではあったが覚醒様の脳波を観察することに成功した。(図1)。

一過的ではあるが覚醒時脳波が観察されたため、その発生源となる神経回路を同定すれば安定した覚醒誘導を行うためのヒントが得られるのではと考え、以下の実験を行った。

DVR 標本から発生する覚醒様脳波

次に、このセロトニンによる覚醒様脳波の誘導作用がどの脳領域への影響の結果生まれたものであるかを調べるために、摘出全脳標本を各脳領域に切り分け、多電極アレイの上に配置することで神経活動のスクリーニングを行った。その結果、背側脳室隆起 (dorsal ventricular ridge, DVR) と呼ばれる脳領域がセロトニンの適用によって 20Hz 振動を発することを発見した(図2)。DVR は爬虫類の前脳の大部分を占める脳領域である。

覚醒様脳波を生み出す DVR の亜領域の特定

DVR はいくつかの亜領域に分けられる。例えば、前内側の DVR は哺乳類の前障

(claustrum、Cla) のホモログであることが知られており、また、ここから徐波睡眠時脳波が生まれることが分かっている。一方で、後背側の DVR の役割についてはまだ明確になっていない。申請者はこの DVR 内のどこから覚醒時脳波が生まれるかを検証した(図3)。

DVR から 700 μ m 厚の水平方向切片を作成し、多電極アレイの上に配置した。すると、前内側 DVR から徐波睡眠が発生し、後方へと伝播する様子が確認できた。次に、セロトニンを適用したところ、前内側 DVR で徐波睡眠様脳波が抑制され、後背側 DVR から 20hz 振動が生まれる様子を観察することに成功した。この 20Hz 脳波は前方まで伝播していた。後背側 DVR が起源となる脳波が観察されるのはこれが初である。後背側 DVR は哺乳類の扁桃体という脳部位と相同性が高いことが知られている。

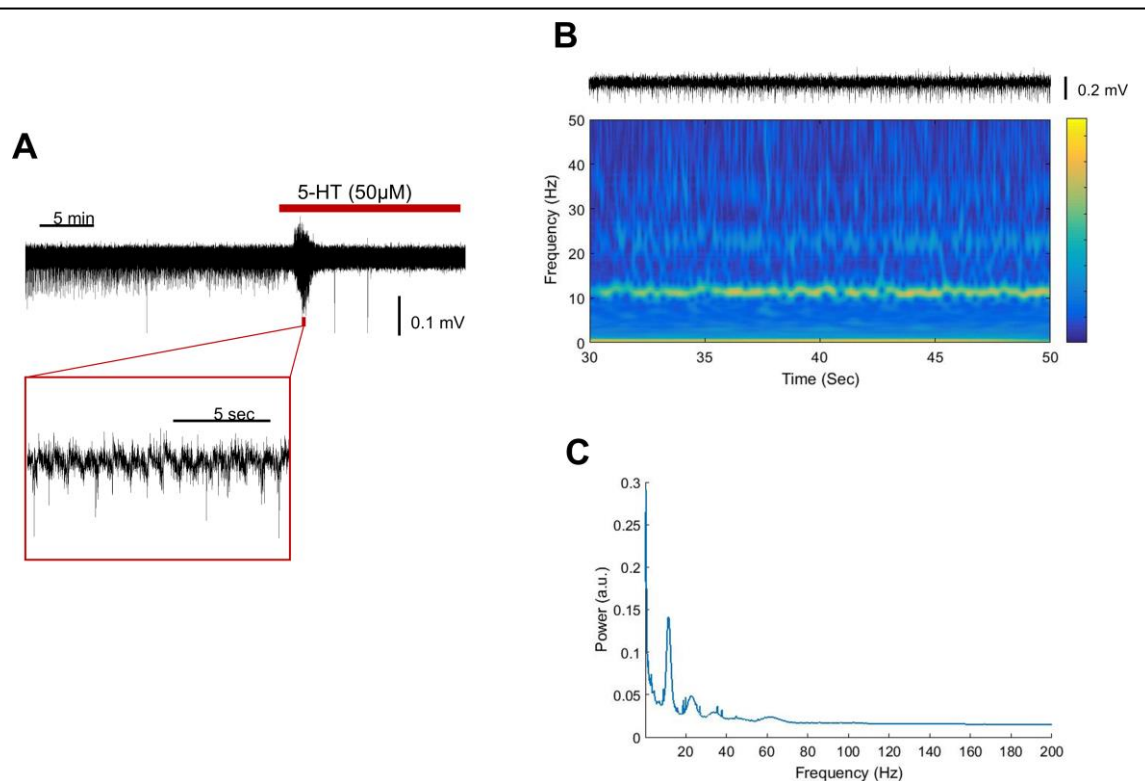


図1 全脳摘出標本で誘導された覚醒様脳波

- A. 脳表に配置したガラス電極から記録した脳波。セロトニン（5-HT）の適用により覚醒様脳波が誘導された。
- B, C. セロトニン適用時の脳波に対しウェーブレット変換を行った。10-30hz の周波数帯域の活動が増強していることがわかる。

前内側 DVR は必要ではない

前内側 DVR が必要であるかどうかを確かめるために、DVR 標本から前内側 DVR のみを切除し、再度局所場電位の記録を行った。すると、標本から徐波睡眠様の脳波が消えた一方で、セロトニン誘導性の覚醒様脳波は観察された。この結果は、前内側 DVR がセロトニンによる覚醒様脳波に必要なことを意味している。

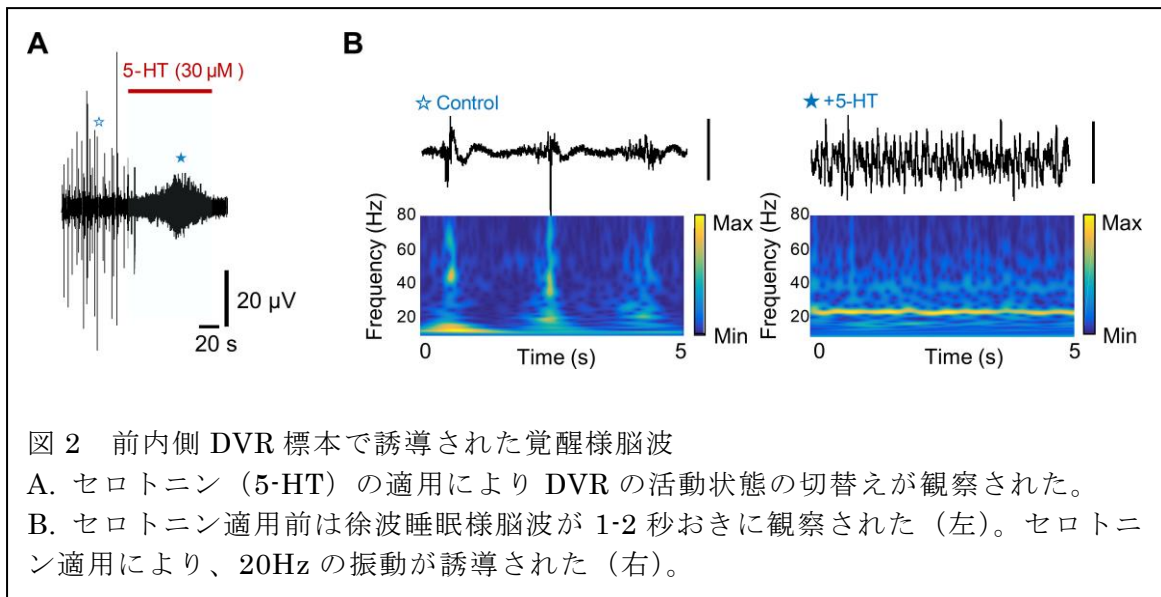


図 2 前内側 DVR 標本で誘導された覚醒様脳波

A. セロトニン (5-HT) の適用により DVR の活動状態の切替えが観察された。

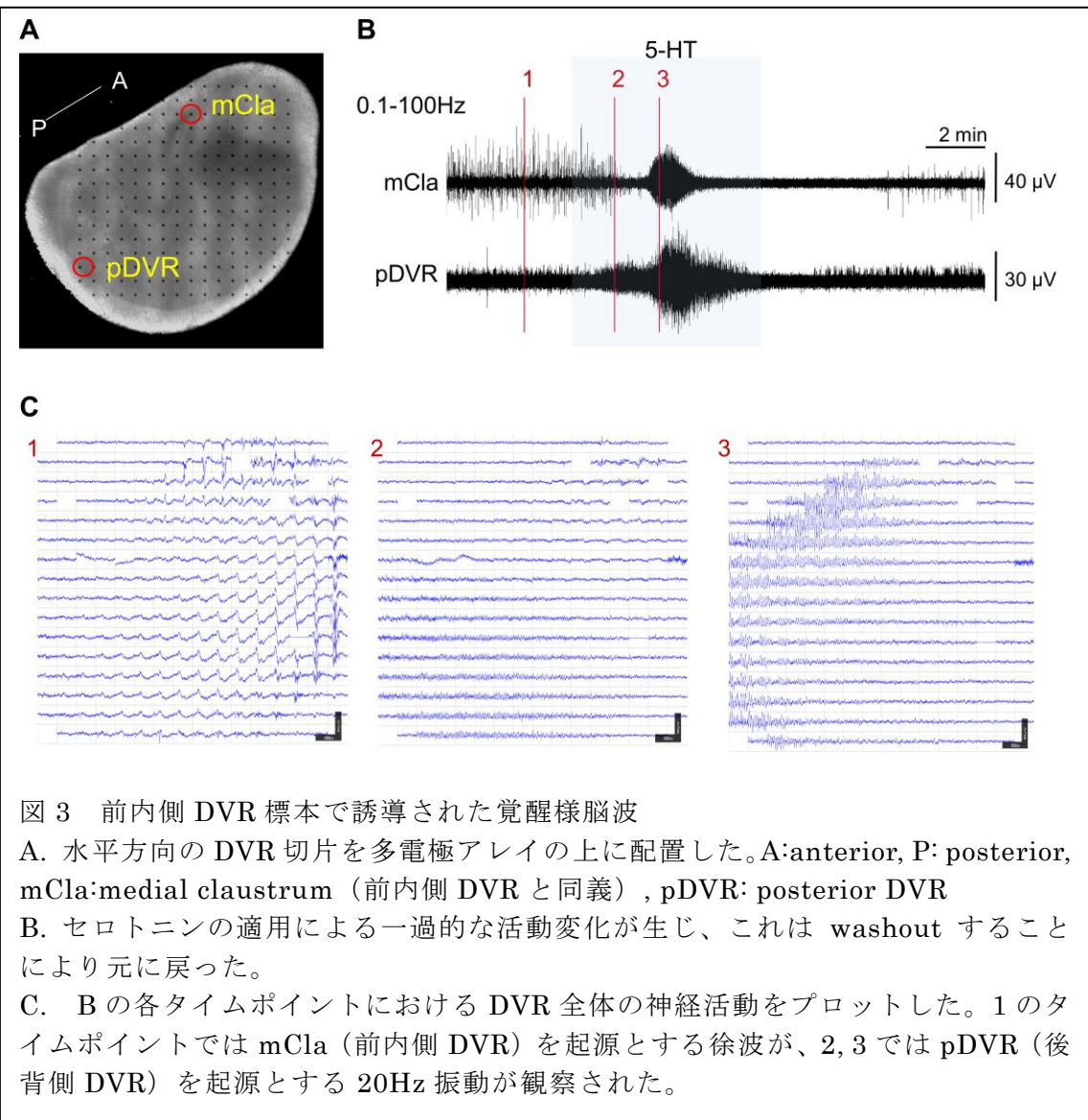
B. セロトニン適用前は徐波睡眠様脳波が 1-2 秒おきに観察された (左)。セロトニン適用により、20Hz の振動が誘導された (右)。

後背側 DVR がセロトニンの作用点である

最後に、後背側 DVR のみからなる小さな切片を作成した。この欠片にセロトニンを適用したところ、覚醒様脳波が観察された。つまり、セロトニン誘導脳波の発生源が後背側 DVR であることが明らかになった。

<今後の展望>

本研究を通じて覚醒時やレム睡眠時に観察される 20Hz 脳波の発生源を突き止めることができた。今後の課題は一過的ではなく、継続して摘出脳に覚醒状態を観察できるような条件の確立である。それを実現するためには後背側 DVR の活動操作および上流ネットワークからの投射を精査する必要がある。これらを調べるための準備はすでにできているので、継続して進めていきたい。



<謝辞>

本研究をご支援くださった公益財団法人薬理研究会に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

6. 褐色脂肪組織の活性化による肥満症治療へ向けた転写因子 NFIA の機能解析

平池 勇雄

(東京大学保健・健康推進本部 助教、東京大学卓越研究員)

【背景】

肥満や 2 型糖尿病などの生活習慣病は全世界に蔓延しており、とくに肥満は **polygenic risk score** を用いた **biobank** の大規模解析において高血圧と並んで寿命に最も強い負の影響を与える因子であると報告された(Sakaue S. et al. *Nature Medicine* 2020)。しかし本邦で承認されてきた肥満の治療薬は副作用等に関する懸念から実際には殆ど使用されておらず、高度肥満例に対する外科治療の有効性は確立されているものの手術適応となる患者数は多くない。また現存する肥満の薬物治療、外科治療は全て「エネルギー摂取の抑制」を意図しているが、エネルギー収支を平衡させるためには「エネルギー消費の促進」というアプローチも考えられる。

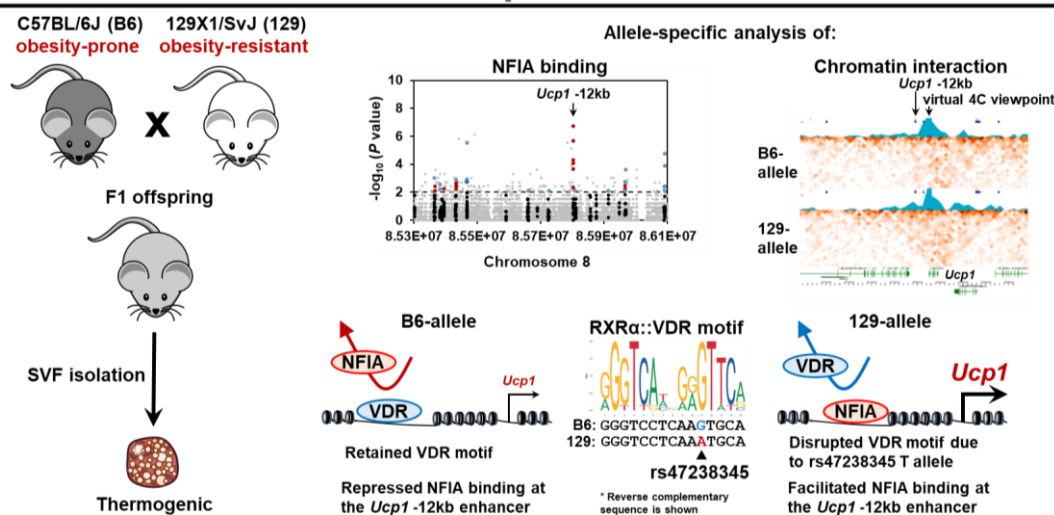
褐色脂肪細胞はミトコンドリアにおける **uncoupling protein-1(Ucp1)**の機能を介して熱を産生しエネルギーを消費する機能を有し、既に **BMI** と褐色脂肪細胞の活性が負に相関すること、加齢に伴い褐色脂肪細胞の活性が低下することが報告されている。申請者らは褐色脂肪細胞の分化を制御する鍵因子である転写因子 **nuclear factor I-A (NFIA)**をゲノムワイドなオープンクロマチン解析で同定し解析してきた(Hiraike Y. et al. *Nature Cell Biology* 2017)。また中胚葉系の前駆細胞が褐色脂肪細胞に分化するためには褐色脂肪細胞の遺伝子プログラムの活性化に加えて骨格筋細胞の遺伝子プログラムの不活性化が必要だが、**NFIA**はその褐色脂肪細胞分化促進作用とは独立に骨格筋細胞分化のマスター転写因子 **MyoD** の転写を抑制することで褐色脂肪細胞分化を担保する(Hiraike Y., et al. *PLoS Genetics* 2020)。**NFIA**を標的として褐色脂肪細胞の数や働きを高めることは「エネルギー消費の促進」に基づく生活習慣病の治療に結実する可能性が期待される。

【結果】

ヒト褐色脂肪細胞の活性は **BMI** と負に相関し加齢とともに低下するが、若年者においてもその活性には 10 倍以上の個人差が存在し、マウス近交系においても褐色脂肪細胞活性には大きな差を認めることからゲノム多型の関与が想定される。本研究において我々はマウス近交系のうち太りやすく褐色化能が低く **Ucp1** 発現が低い **C57BL/6J (B6)** と太りにくく褐色化能が高く **Ucp1** 発現が高い **129X1/SvJ (129)** およびこれらを交配させた **F1** を用いて、ゲノム多型が脂肪細胞の褐色化能を規定するメカニズムを解明するための網羅的なゲノム-エピゲノム連関解析を遂行した。**B6** と **129** それぞれのマウスから採取した褐色脂肪細胞は脂肪細胞分化の程度に差が無いにも関わらず、**Ucp1** は **129** において顕著に高発現していた。**F1** マウス由来の褐色脂肪細胞において **Ucp1** mRNA には **129** 由来のゲノムから優先して転写される **allelic imbalance** を認め、**NFIA** の ChIP-seq においても **Ucp1** 遺伝子エンハン

サーへの結合に 129 優位の imbalance を認めた。実際、F1 細胞において Hi-C を用いてエンハンサー-プロモーター間の allele-specific なクロマチン相互作用を網羅的に解析したところ *Ucp1* -12kb エンハンサーには 129 由来の allele 優位なクロマチン相互作用を認めた。NFIA の ChIP-seq に allelic imbalance を認める領域のモチーフ解析から、*Ucp1* -12kb エンハンサーに存在する rs47238345 が転写因子 VDR (vitamin D receptor) のモチーフを崩すことで VDR 自身及び競合する NFIA のゲノムへの結合に影響し褐色化能を規定することを同定した。更に rs47238345 を B6 の allele から 129 の allele へ置換したマウスにおいては *Ucp1* 発現が上昇することを示した。また 129 において B6 と比較して高発現している転写因子のスクリーニングから *Ucp1* の正の制御因子として Lim homeobox protein 8 (Lhx8) を同定した(Hiraike Y. et al. *iScience* 2022、図 1)。

NFIAはcis regulatory variantに対する作用を介してマウス近交系におけるUcp1発現の差を規定する



Hiraike Y.* et al. *iScience* 2022より引用改変
*corresponding author

図1

【今後の展望】

褐色脂肪細胞における NFIA が全身代謝に及ぼす影響及び作用メカニズムの全貌が明らかになれば、「エネルギー消費の促進」に基づく新たな生活習慣病の治療法の開発に結実することが期待される。また申請者らは大血管周囲の脂肪細胞の褐色化がマウスの wire injury モデルにおける血管障害後の炎症反応と血管の病的リモデリングを負に制御すること、NFIA がこの系に対して保護的に作用することを同定した (Adachi Y, Ueda K, Hiraike Y. et al. *Nature Communications* 2022)。すなわち褐色脂肪細胞の NFIA は肥満症のみならず、動脈硬化性疾患に対しても保護的に作用する。申請者は脂肪細胞特異的な NFIA トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスの解析から NFIA の抗肥満作用ならびに抗糖尿病作用を見出しており、近い将来、褐色脂肪細胞を活性化させるための標的因子としての NFIA の位置付けが更に確立されるものと考えている。また申請者は台湾 biobank の約 2 万

人のデータを用いて、もっともよく知られた肥満感受性 SNP であり褐色脂肪細胞を介して作用する *FTO*rs1421085 と定期的な運動習慣(なし、 ≤ 20 METs/週、 >20 METs/週の 3 群)の間に体重や BMI の増加に対する gene-environment interaction が存在することを明らかにした。Risk allele を有する被験者であっても、定期的な運動習慣によって追跡期間中の体重増加が抑制された。更に baseline で定期的な運動習慣がないと回答した被験者に注目したサブグループ解析を実施し、baseline で定期的な運動習慣がなかったとしても、追跡期間中に運動習慣を獲得することで risk allele 保有者の体重増加が抑制されることを明らかにした (Hiraïke Y. et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021)。動物モデルおよび培養細胞を用いた実験的な解析と大規模バイオバンクを用いた統計解析を統合することで、臨床への還元を目指した研究を加速させることを目指している。

【参考文献】

1. Adachi Y, Ueda K, Nomura S, Ito K, Katoh M, Katagiri M, Yamada S, Hashimoto M, Zahi B, Numata G, Otani A, Hinata M, Hiraïke Y, Waki H, Takeda N, Morita H, Ushiku T, Yamauchi T, Takimoto E and Komuro I. Beiging of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nature Communications* 2022; 13(1): 5117.
2. Hiraïke Y*, Tsutsumi S, Wada T, Oguchi M, Saito K, Nakamura M, Ota S, Koebis M, Nakao H, Aibta A, Nagano G, Ohno H, Oki K, Yoneda M, Kadowaki T, Aburatani H, Waki H and Yamauchi T. NFIA determines the cis-effect of genetic variation on Ucp1 expression in murine thermogenic adipocytes. *iScience* 2022; 25(8): 104729.
- * Corresponding author
3. Hiraïke Y*, Yang CT, Liu WJ, Yamada T and Lee CL. FTO obesity variant-exercise interaction on changes in body weight and BMI: The Taiwan Biobank study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021; 106(9): e3673-e3681.
- * Corresponding author
4. Hiraïke Y, Waki H, Miyake K, Wada T, Oguchi M, Saito K, Tsutsumi S, Aburatani H, Yamauchi T and Kadowaki T. NFIA differentially controls adipogenic and myogenic gene program through distinct pathways to ensure adipocyte differentiation. *PLoS Genetics* 2020; 16(9): e1009044.
5. Hiraïke Y, Waki H, Yu J, Nakamura M, Miyake K, Nagano G, Nakaki R, Suzuki K, Kobayashi H, Yamamoto S, Sun W, Aoyama T, Hirota Y, Ohno H, Oki K, Yoneda M, White AP, Tseng YH, Cypess AM, Larsen TJ, Jespersen NZ, Scheele S, Tsutsumi S, Aburatani H, Yamauchi T and Kadowaki T. NFIA co-localizes with PPAR γ and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nature Cell Biology* 2017; 19 (9): 1081-1092.

7. IDH 阻害剤抵抗性白血病に対する新規標的治療法の確立

吉見 昭秀

(国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究ユニット*独立ユニット長)

(2022 年 10 月現在、国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究分野 分野長)

はじめに

RNA スプライシングとは、mRNA 前駆体から intron を除去して成熟 mRNA を産生するプロセスのことを指す。スプライシング因子をコードする遺伝子群の変異(以下 SF 変異)が造血器腫瘍に高頻度に認められることが 2011 年にはじめて報告されて以来^{1,2}、SF 変異がスプライシング異常をきたす機序や、SF 変異を治療標的としたがん治療の可能性について、精力的に研究が進められてきた。SF 変異は、骨髄異形成症候群(MDS; 30-75%)¹⁻³、慢性骨髄単球性白血病(CMML; ~50%)⁴、二次性急性骨髄性白血病(AML; ~55%)⁵などの骨髄系腫瘍だけでなく、慢性リンパ性白血病(CLL; ~20%)^{6,7}などのリンパ系腫瘍や、乳癌、肺癌、膵癌などの固形腫瘍にも比較的高頻度(~10%)に認められることがその後の研究で明らかになり⁸⁻¹²、その治療標的化は今後のがん治療において一つの重要な位置を占めると考えられる。多くの造血器腫瘍、特に MDS や CMML に対する治療成績は現状では満足できるものではなく、SF 変異を標的とした治療法が確立されれば、様々な造血器腫瘍、あるいはさらに固形腫瘍の治療成績向上に寄与すると考えられる。

研究の対象と背景

申請者は SRSF2、SF3B1、U2AF1 などの RNA スプライシング因子をコードする遺伝子群の変異(以下 SF 変異)が造血器腫瘍に高頻度に認められることに注目し、AML において SRSF2 変異が IDH2 変異と高頻度に共存し、SRSF2 変異によるグローバルなスプライシング異常と IDH2 変異による DNA メチル化が協調して白血病発症を誘導するメカニズムや¹³、SF3B1 変異が MYC/BCL2 を活性化して慢性リンパ性白血病発症に関わることを報告した¹⁴。特に、前者の研究では、AML において SF 変異と IDH2 遺伝子などのエピジェネティクス制御因子の変異が、従来報告されていたよりもはるかに高頻度に共存し、一つの疾患クラスターを形成することを示した。また一方で、前臨床試験に活用可能な世界初の患者由来細胞異種移植(Patient-derived xenograft)モデルの開発¹⁵を通じて、新規臨床グレードスプライシング阻害剤の開発を行った¹⁶。上記の研究により、IDH2/SRSF2 両変異を持つ AML はそうでない AML と比較して高齢者に多くみられ、予後が悪い(図 1)ことが新たに判明した。

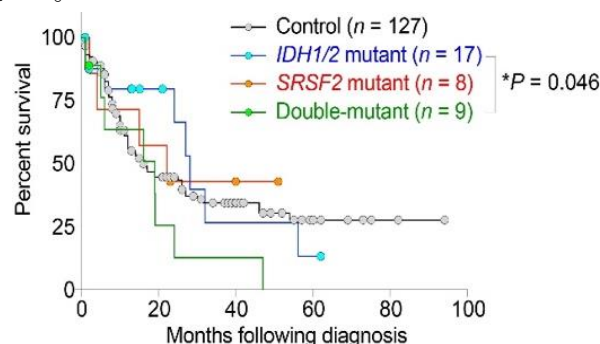


図 1: IDH2/SRSF2 変異の有無による AML 全生存率

また IDH2 変異特異的阻害剤 AG-221 の臨床試験において、両変異を持つ AML は IDH2 阻害剤に治療抵抗性を示すことがわかった¹⁷。また、申請者は *IDH2/SRSF2* 両変異を持つ AML においては、*SRSF2* 変異によるグローバルなスプライシング異常と *IDH2* 変異による DNA メチル化が相互に影響し合うことによって病態形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。つまり、スプライシング異常と DNA メチル化の密接なリンクをそれぞれの阻害剤によって分断することによって、*IDH2/SRSF2* 両変異を持つ AML 細胞を効率的に駆逐できる可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、同疾患クラスターに対する新規治療法開発を通じて、治療成績の改善を目指すことを目標とした。

研究方法と結果

本研究では、上述の仮説に基づいて、スプライシング阻害剤 H3B-8800 と IDH2 変異特異的阻害剤 AG-221 (enasidenib) を組み合わせることによる治療効果を比較し、*IDH2/SRSF2* 両変異を持つ AML に対する新規治療法の確立を目指す。すなわち、治療抵抗性の *Idh2/Srsf2* 両変異を持つマウスモデルを作製し、H3B-8800 + AG-221 による combination の薬効を評価し、両変異を持つ造血器腫瘍に対する最適な治療法を確定する。具体的には、図 2 に示すデザインで研究を進めた。

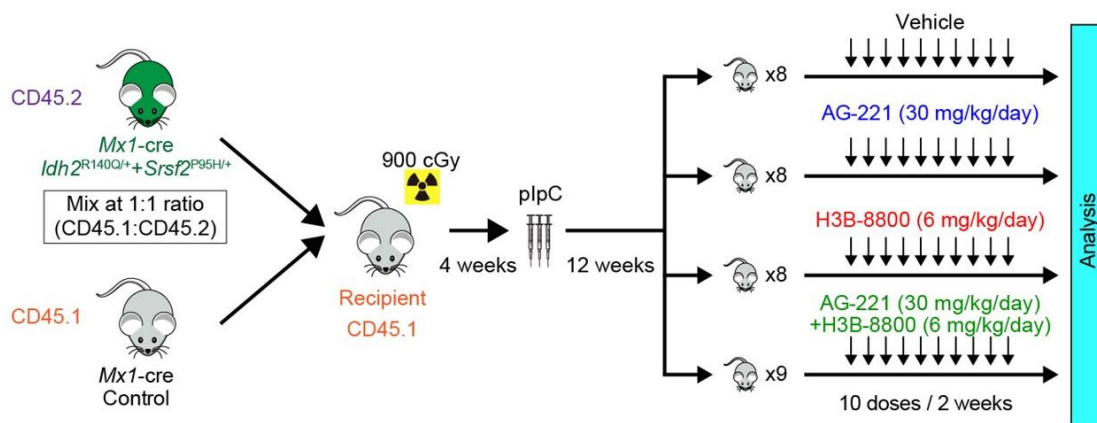


図 2: 実験デザイン

結果:

樹立したマウスモデルを 33 匹準備し、至適投与量を用いて、H3B-8800 + AG-221 の combination の効果を検討した。その結果、*Idh2R140Q + Srsf2P95H* 遺伝子改変マウスモデルにおいては、IDH2 阻害に抵抗性を示すのに対してスプライシング阻害剤が奏効し、特に AG-221 と H3B-8800 を併用した際に相乗効果が得られることが判明した(図 3)。

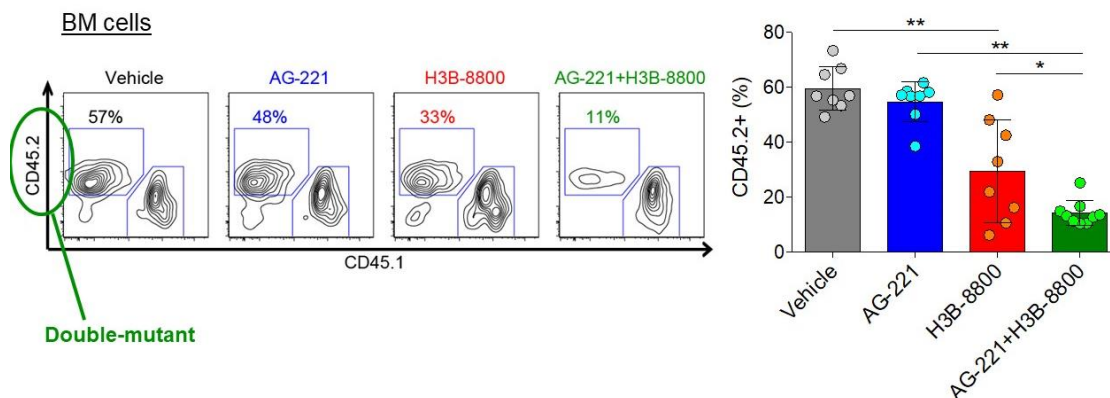


図 3: 実験結果 (左: 代表的な flow cytometry の結果、右: 定量結果; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

考察

上記の研究では、*SRSF2* 変異と *IDH2* 変異が白血病において、相互に DNA メチル化と RNA スプライシングに影響し合うことで悪化させていることが病態の鍵となっていることから、両者のリンクを断ち切るべく、両者を標的とした治療法の開発に取り組んだ。結果として、変異型 *IDH2* 阻害およびスプライシング阻害の併用が、*IDH2/SRSF2* 両変異を有する造血器細胞の治療に有望であることが判明した。この観察結果は、*IDH2/SRSF2* 両変異を有する AML が変異型 *IDH2* 阻害薬単独に抵抗性であるという臨床試験の観察結果ともよく合致しており、*IDH2* 阻害薬に薬理的スプライシング阻害を併用することにより、*SRSF2* 変異が *IDH2* 阻害剤に対する脆弱性を付与するとも解釈できる。すなわち、*IDH2/SRSF2* 両変異を有する AML はスプライシング異常とエピゲノム異常が相互に影響し合うメカニズムに依存して AML を維持している可能性が高いと考えられ、*IDH2* 阻害に抵抗性を示す *IDH2/SRSF2* 変異 AML の予後を改善する治療戦略の一つとして、今後臨床試験による検討を進めるべきであると考えられた。

謝辞

最後になりましたが、本研究は公益財団法人薬理研究会の2021年度研究助成によるご支援を頂き、実施することができました。この場をお借りして深謝いたします。

参考文献

- 1 Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* **365**, 1384-1395 (2011). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103283>
- 2 Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10496>
- 3 Graubert, T. A. *et al.* Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **44**, 53-57 (2011). <https://doi.org/10.1038/ng.1031>
- 4 Meggendorfer, M. *et al.* *SRSF2* mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic

- leukemia (CMML). *Blood* **120**, 3080-3088 (2012). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404863>
- 5 Lindsley, R. C. *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* **125**, 1367-1376 (2015). <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-610543>
- 6 Quesada, V. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **44**, 47-52 (2012). <https://doi.org/10.1038/ng.1032>
- 7 Wang, L. *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **365**, 2497-2506 (2011). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109016>
- 8 Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47-52 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature16965>
- 9 Imielinski, M. *et al.* Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* **150**, 1107-1120 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
- 10 Martin, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet* **45**, 933-936 (2013). <https://doi.org/10.1038/ng.2674>
- 11 Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47-54 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature17676>
- 12 Seiler, M. *et al.* Somatic Mutational Landscape of Splicing Factor Genes and Their Functional Consequences across 33 Cancer Types. *Cell Rep* **23**, 282-296 e284 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.088>
- 13 Yoshimi, A. *et al.* Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature* **574**, 273-277 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1618-0>
- 14 Liu, Z. *et al.* Mutations in the RNA Splicing Factor SF3B1 Promote Tumorigenesis through MYC Stabilization. *Cancer Discov* **10**, 806-821 (2020). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1330>
- 15 Yoshimi, A. *et al.* Robust patient-derived xenografts of MDS/MPN overlap syndromes capture the unique characteristics of CMML and JMML. *Blood* **130**, 397-407 (2017). <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-763219>
- 16 Seiler, M. *et al.* H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med* **24**, 497-504 (2018). <https://doi.org/10.1038/nm.4493>
- 17 Stein, E. M. *et al.* Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood* **133**, 676-687 (2019). <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869008>

2022 年 12 月 6 日発行

編集発行 公益財団法人 薬 理 研 究 会

〒113-0033

東京都文京区本郷 2-40-14 山崎ビル 202C

電話 FAX : 03-5842-6308

E-mail : zaiyakuriken@woody.ocn.ne.jp

<http://www.dislo-koeki.org/08a/00994/index.html>
