

核酸医薬を用いた新規白血病治療法の開発

吉見昭秀

国立研究開発法人 国立がん研究センター

【研究の背景】

SF 変異が様々ながんで高頻度に認められることから、発がんにおけるスプライシング異常の機能的役割の解明とその治療標的化は今後のがん治療において重要な位置を占める。一方で、SF 変異がんは高齢者に多く、ほとんどのがん種では有効な治療法がないことから、SF 変異を特異的に標的とする治療法の開発は喫緊の課題である。

申請者は留学して以来、SF 変異による発がんメカニズムと治療標的化について研究してきた¹⁻⁵⁾。これらの研究により SF 変異による白血病発症機構の一端が解明され、SF 変異はグローバルに MSE を誘導して発がんを誘導することがわかってきたが、単一の SF 変異が多数の MSE を誘導するため、どの MSE が病態形成に重要であるのかを同定することが難しい点が SF 変異がんの病態解明の障壁となっている。つまり、個々の MSE について詳細な解析を行う従来の研究スタイルには限界がある。

一方、申請者は新規臨床グレードスプライシング阻害剤 H3B-8800 の開発に関わった経験があるが⁴⁾、臨床試験においては毒性が強く出てしまい、十分な治療効果を得るには至っておらず、SF 変異がんに対しては従来とは全く異なる治療アプローチが必要とされている。

そこで、本提案では複数の MSE を同時に修正する ASO を用いることによって、SF 変異陽性がんに対する殺傷効果を検討し、proof-of-concept を獲得することを目標とする。

【目 的】

申請者は留学して以来、SF 変異ががんを引き起こすメカニズムと治療標的化について研究してきた¹⁻⁵⁾。これらの研究により SF 変異による白血病発症機構の一端が解明されたが、SF 変異はグローバルな mis-splicing を誘導する(同時に 500-1,500 の mis-splicing event を生じる)ことから、一つの SF 変異の下流で真に病態形成に重要な mis-splicing event を同定することは非常に困難である。これまでの当該分野の研究では、中でも重要な mis-splicing event を 1-2 個同定して生物学的・細胞生物学的にその重要性を検証した研究がほとんどであり、同様の研究手法を複数の mis-splicing event に応用するには指数関数的に労力・コスト・時間がかかる。さらに、申請者らは SF 変異による splicing 異常は臓器特異的・遺伝子変異アレール特異的に誘導されることを明らかにした²⁾。すなわち、SF 変異の下流で真に病態形成に重要な mis-splicing event は組織・臓器ごとに異なる可能性が高く、このことは臓器・腫瘍によって SF 変異の頻度が大きく異なることにも裏打ちされる。つまり従来の手法では SF 変異の下流にある真に重要な mis-splicing event を複数同定することはほぼ不可能である。

そこで、本提案では、複数の mis-splicing を修正する Antisense Oligonucleotide (ASO) の組み合わせを用いて SF 変異陽性がんの治療効果のあるパネルを先に同定し、同定した ASO パネルを即 SF 変異陽性がんの治療に応用すると同時に、パネルに含まれる ASO の組み合わせを検証することによって、SF 変異陽性がんの病態形成に真に重要な mis-splicing event を逆行的に同定し、病態解明への活用および ASO パネルの最適化を行うことを目的とした。上記の基礎的研究および前臨床試験を通じて、世界で毎年 40-60 万人が罹患する SF 変異がんに対する新規治療法を開発し、治療成績を向上させることを将来的な目標とした。

【方 法】

本研究は、次の3 STEP に分けて遂行した。

研究計画 1 ASO パネルに含める標的 mis-splicing event の選定

「 $|\Delta PSI| > 25\%$ 」(ΔPSI はスプライシング変化の強さを示す一つの指標)などの基準を満たす、強いスプライシング変化を持つ mis-splicing event を SRSF2 変異がんで選定した上で ASO パネルをそれぞれ設計・作製した。

研究計画 2 各 ASO の mis-splicing 修正効果の確認

研究計画 1 で作製された個々の ASO が、標的とする mis-splicing event を修正可能であるかを、SRSF2 変異を endogenous に発現する isogenic な細胞株(申請者が保有)で確認した。

研究計画 3 ASO パネルの mis-splicing 修正効果の評価

作製された個々の ASO を組み合わせることにより、SRSF2 変異陽性がんに対する ASO パネルを構築した。その上で治療効果の判定を行った。まずは in vitro で SF 変異を有する細胞株(白血病細胞株 K562 の使用)、と野生型の細胞株に ASO パネルを添加し、表現型の変化を観察した。

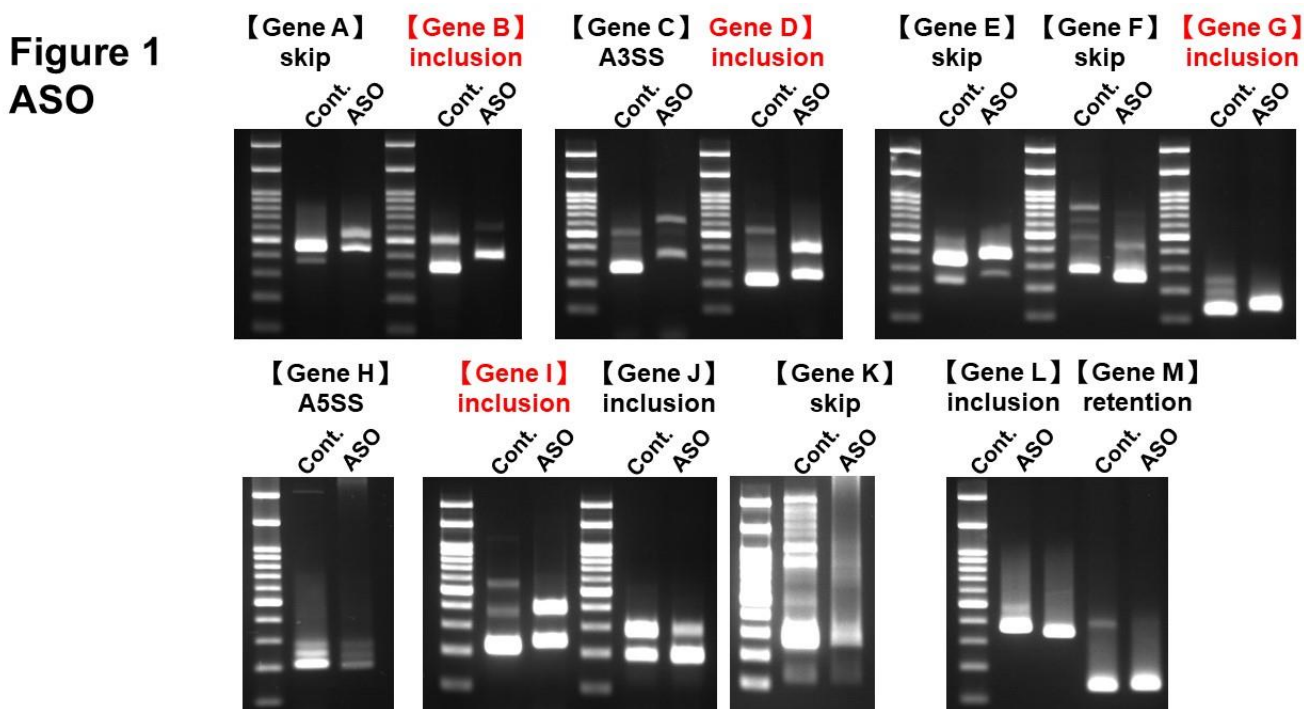
【結 果】

(1) ASO パネルに含める mis-splicing event の選定

ΔPSI の絶対値やそれぞれの mis-splicing gene の生物学的影響の可能性を加味して、ASO パネルに含める 13 個の event (Gene A~M) を選定し、独自のプログラムを用いて ASO をデザインし合成した。

(2) 各 ASO の mis-splicing 修正効果の確認

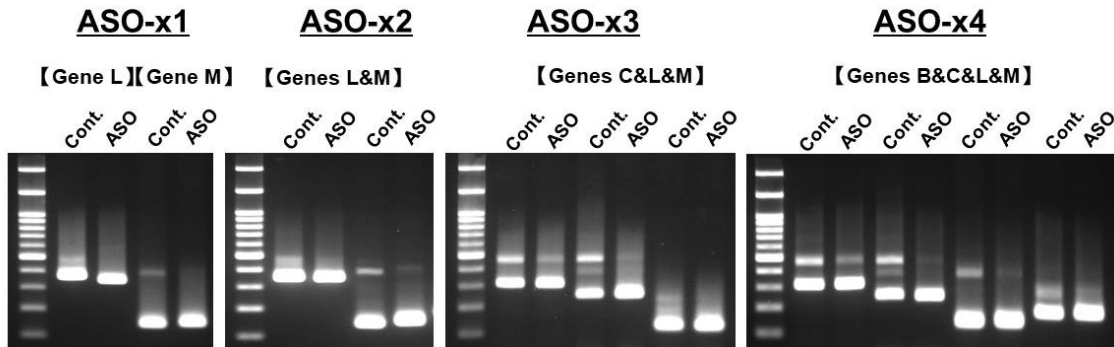
ASO パネルの mis-splicing 修正効果を確認する前に、まずは個々にデザインした ASO がそれぞれ標的とする mis-splicing event を修正可能か、SRSF2 変異を endogenous に発現する白血病細胞株で確認した。評価したところ、Figure 1 のように(赤字)、約半数の 6 つの mis-splicing event について目的とする修正が可能であった。一方、残りの 7 つの mis-splicing event については複数の ASO をデザインしたが、そのほとんどは修正が困難であった。



(3) ASO パネルの mis-splicing 修正効果の評価

(2)の検討で有望であった ASO を順次組み合わせることで 4 種類の混合 ASO による mis-splicing event 修正効果まで SRSF2 変異を endogenous に発現する白血球細胞株で確認したところ、それぞれ約 4 分の 1 の ASO 濃度で使用したにもかかわらず、同時修正効果が確認された (Figure 2)。

Figure 2 ASO mixture



【考 察】

本検討により、我々が保有する独自の ASO デザインプログラムが約半数の mis-splicing で効率よく修正効果を示すこと、また効率よく ASO が細胞内に導入され、通常よりも低濃度であっても mis-splicing event を修正可能なこと、さらに 4 種類まで混合した ASO パネルを用いても同時に 4 つの mis-splicing event を修正可能なことが示された。すなわち、今後の ASO パネルの開発に向けた基礎的な検討が予想以上に進捗したと考えられる。

今後は、より効率の良い ASO パネルの組み合わせを検討した後に、ASO パネルの前臨床試験に進む。具体的には、治療効果判定のために、臨床予測性の高い患者由来細胞を用いた異種移植 (PDX) モデルを活用し、SRSF2 変異を持つ白血病患者細胞を NSGS マウスに骨髄内輸注し⁵⁾、末梢血を flow cytometry で解析して生着を確認した後に、ASO パネルにより治療を行い、治療効果を判定する。同様に SF 変異のない AML 患者細胞を用いた PDX モデルにおいても ASO パネルの効果を観察する。ASO パネルで加療後のマウスから human CD45 陽性細胞を FACS-sorting して、目的の mis-splicing event の修正ができていないのかを確認する。

さらに、ASO パネルが有望であれば、実用化を兼ねて、構成する ASO を減らせないか検討すると同時に、絞り込まれた mis-splicing event の発がん誘導性について検討したい。また、他の SF 変異を有する発がんモデルや固形腫瘍モデルにおいても同様に ASO パネルの治療効果について評価し、有望であれば ASO パネルの最適化や各癌種における病態解析へ活用する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現状では予後不良な SF 変異がんに対する治療法は開発されていないが、本研究開発が順調に進めば、SF 変異を有するがんに対する特異的な治療法につながり、白血病に関して予後改善に寄与するだけでなく、同知見を他の固形腫瘍などに活用することにより、がん全体の臨床成績の向上に寄与する可能性がある。

【参考・引用文献】

1. Shiraiishi Y, Okada A, Omori I, Chiba K, Iida N, Yamauchi H, Kosaki K, Yoshimi A. Systematic identification of intron retention associated variants from massive publicly available transcriptome sequencing data. *Nat Commun.* 2022 Sep 29;13(1):5357. doi: 10.1038/s41467-022-32887-9. PMID: 36175409

2. Liu Z, Yoshimi A, Wang J, Cho H, Chun-Wei Lee S, Ki M, Bitner L, Chu T, Shah H, Liu B, Mato AR, Ruvolo P, Fabbri G, Pasqualucci L, Abdel-Wahab O, Rabadan R[#]. Mutations in the RNA Splicing Factor SF3B1 Promote Tumorigenesis through MYC Stabilization. *Cancer Discov.* 2020 Jun;10(6):806-821. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1330. PMID: 32188705
3. Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, Rahman MA, Pastore A, Wang B, Lee SC, Micol JB, Zhang XJ, de Botton S, Penard-Lacronique V, Stein EM, Cho H, Miles RE, Inoue D, Albrecht TR, Somerville TCP, Batta K, Amaral F, Simeoni F, Wilks DP, Cargo C, Intlekofer AM, Levine RL, Dvinge H, Bradley RK, Wagner EJ, Krainer AR, Abdel-Wahab O. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature.* 2019 Oct;574(7777):273-277. doi: 10.1038/s41586-019-1618-0. PMID: 31578525.
4. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, Chan B, Keaney G, Thomas M, Agrawal AA, Caleb B, Csibi A, Sean E, Fekkes P, Karr C, Klimek V, Lai G, Lee L, Kumar P, Lee SC, Liu X, Mackenzie C, Meeske C, Mizui Y, Padron E, Park E, Pazolli E, Peng S, Prajapati S, Taylor J, Teng T, Wang J, Warmuth M, Yao H, Yu L, Zhu P, Abdel-Wahab O, Smith PG, Buonamici S. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med.* 2018 May;24(4):497-504. doi: 10.1038/nm.4493. PMID: 29457796.
5. Yoshimi A, Balasis ME, Vedder A, Feldman K, Ma Y, Zhang H, Lee SC, Letson C, Niyongere S, Lu SX, Ball M, Taylor J, Zhang Q, Zhao Y, Youssef S, Chung YR, Zhang XJ, Durham BH, Yang W, List AF, Loh ML, Klimek V, Berger MF, Stieglitz E, Padron E, Abdel-Wahab O. Robust patient-derived xenografts of MDS/MPN overlap syndromes capture the unique characteristics of CMML and JMML. *Blood.* 2017 Jul 27;130(4):397-407. doi: 10.1182/blood-2017-01-763219. PMID: 28576879.