

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) ヒストンメチル化酵素 EZH1/2 の二重阻害による革新的がん根治療法の開発
(英語) Development of a novel cancer stem cell-targeting therapy by inhibition of histone methyltransferases EZH1/EZH2

研究開発実施期間：2015年10月21日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 北林 一生
(英語) Issay Kitabayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立がん研究センター研究所造血器腫瘍研究分野・分野長
(英語) Chief, Division of Hematological Malignancy, National Cancer Center Research Institute

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：2ページ以上

ヒストンメチル化酵素 EZH1 及び EZH2 が成人 T 細胞白血病リンパ腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、マントル細胞リンパ腫の腫瘍の増殖に必須であることを明らかにし、これらの分子メカニズムを解明した。特に急性骨髄性白血病や多発性骨髄腫において、がん幹細胞の維持に EZH1 及び EZH2 が必須であることを見出した。また、研究分担者の第一三共株式会社が創製したヒストンメチル化酵素 EZH1 及び EZH2 の二重阻害剤がこれら腫瘍の増殖を抑制し、治療に有効であることを患者由来細胞及び移植モデルを用いて示した。これらの結果を基盤として、成人 T 細胞白血病リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫及び急性骨髄性白血病に対する第 1 相臨床試験が開始された。*Ezh1* 遺伝子欠損、条件的 *Ezh2* 遺伝子欠損マウス (*Ezh1*^{-/-} *Ezh2*^{f/f} ERT2-Cre) の造血幹前駆細胞にヒト白血病で見られる MOZ-TIF2 遺伝子を導入して同種野生型マウスに骨髄移植することによりマウス AML モデルを作製し、この AML マウスにタモキシフェン投与することにより *Ezh1/2* 遺伝子を欠損させると 2 週間後に AML 細胞が消失し、AML が治癒することが明らかとなった。この際、AML 幹細胞を含む L-GMP 分画が先行して顕著に減少していた。また、*Ezh1* 遺伝子欠損、条件的 *Ezh2* 遺伝子欠損マウス (*Ezh1*^{-/-} *Ezh2*^{f/f} ERT2-Cre) の造血幹前駆細胞に様々ながん遺伝子 (MLL-AF10, MLL-ENL, MOZ-TIF2, AML1-ETO, PML-RARα, CALM-AF10, NUP98-HOXA9) を導入して AML 細胞を作製し、これらに 4H-タモキシフェン処理により *Ezh1/2* 遺伝子を欠損させると、いずれの場合も細胞が分化し、増殖が停止した。一方、野生型のマウス造血幹前駆細胞に上記の様々な融合遺伝子を導入することによりこれらの AML 細胞を EZH1/2 二

重阻害剤で処理すると、NUP98-HOXA9 を発現する細胞を除いて EZH1/2 二重遺伝子欠損と同様に細胞が分化し、増殖が停止したが、NUP98-HOXA9 を発現する細胞には大きな影響がなかった。また、MOZ-TIF2 融合遺伝子を導入したマウス造血幹前駆細胞を同種野生型マウスに骨髄移植することにより作製したマウス AML モデルに EZH1/2 二重阻害剤を 2 週間及び 4 週間連続投与すると著明に生存期間の延長が見られた。AML 患者から採取した骨髄液からフィコールにより単核球を分離し、 10^6 - 10^7 の細胞を NOG マウスの骨髄に移植し、3 回以上移植継代可能な AML PDX モデルを 5 株作製した。このうち 3 つに EZH1/2 二重阻害剤 (200mg/kg/day) を投与してその効果を検討した。その結果、EZH1/2 二重阻害剤は骨髄中の AML 細胞をマクロファージ様細胞へと分化を誘導し、増殖を抑制した。また、EZH1/2 二重阻害剤は AML 細胞の脾臓への浸潤を抑制した。網羅的な発現解析により EZH1/2 が Cyclin D1/D2 の発現を抑制していることを同定し、この発現抑制が静止期白血病幹細胞の維持に必須であることを見出した。さらに、EZH1/2 二重阻害剤により Cyclin D1/D2 の発現抑制が解除され、静止期白血病幹細胞の維持ができなくなることを明らかにした。

多発性骨髄腫に関しては、9 種類の多発性骨髄腫細胞株を様々な濃度の EZH1/2 阻害剤 (OR-S1) 存在下で培養し、その効果を検討したところ 8 種類の細胞株の増殖が非常に強く阻害され ($IC_{50}=0.9$ - 13 nM)、残りの 1 種類も他より弱いながら感受性を示した ($IC_{50}=100$ nM)。また、多発性骨髄腫の患者組織を NOG マウスに移植することにより PDX モデルを新たに作製し、EZH1/2 二重阻害剤に対する感受性を検討したところ、EZH1/2 二重阻害剤により腫瘍から産生されるヒト IgG が著明に低下し、腫瘍の増殖が強く抑制されることが示された。また、ヘキストにて染色しフローサイトメータによる SP 分画の解析を行ったところ、がん幹細胞性を示す SP 細胞が OR-S1 により減少することを明らかにした。mRNA の発現解析を行い OR-S1 により顕著に WNT/ β カテニン経路が活性化することが確認された。

マンツル細胞リンパ腫については、3 種類のマンツル細胞リンパ腫細胞株を様々な濃度の EZH1/2 阻害剤 (OR-S1) 存在下で培養し、その効果を検討したところ、それらの増殖が非常に強く阻害された。また、既存の治療薬である Ibrutinib 治療後に再発したマンツル細胞リンパ腫の患者組織を NOG マウスに移植することにより PDX モデルを新たに作製し、Ibrutinib 及び EZH1/2 二重阻害剤に対する感受性を検討したところ、Ibrutinib には耐性であったが EZH1/2 二重阻害剤により腫瘍の増殖が強く抑制されることが示された。また、mRNA の発現解析では OR-S1 により顕著に p57 の発現が上昇することが確認された。

ATL に対する EZH1/2 阻害薬有効性の POC を得るため、急性型 ATL のエピジェネティック異常及び EZH2 の分布をゲノムワイドに検討した。ATL 細胞は正常 T 細胞と比較して 7 割以上のゲノム領域で H3K27me3 の異常な蓄積が見られ、さらに EZH1 もしくは EZH2 が結合していることがわかった。EZH1 でのみ H3K27me3 が蓄積している領域が 29.1% 存在し、H3K27me3 を制御するためには EZH2 だけでなく EZH1 を同時に阻害する必要性が示された。さらに遺伝子発現プロファイルと統合解析し、EZH1/2 依存的なメチル化異常が遺伝子発現抑制に大きく関わることを示された。各種細胞及び組織における EZH1, EZH2 などの関連遺伝子の発現レベルについてデータベースを利用して解析した結果、ATL などの T 細胞リンパ腫の由来となる T リンパ球は EZH1 を最も高発現する細胞種であることがわかった。ATL 細胞は高い EZH1 の発現を維持したまま EZH2 が高発現し、PRC2-EZH1 と PRC2-EZH2 の二つの複合体が共存する異常な状態となっており、細胞全体の H3K27me3 が異常に蓄積してしまうことがわかった。4 種の ATL 由来細胞株、及び 15 症例の ATL 患者由来腫瘍細胞に対して EZH1/2 二重阻害薬の有効性を検討したところ、全症例において数百 pM~数十 nM の低濃度域での細胞増殖抑制が認められた。さらに既存の EZH2 単独阻害薬と比較したところ、EZH1/2 二重阻害薬は 100 倍以上の強い活性を示したことから、ATL のエピゲノム異常を分子標的とする際の、EZH1/2 二重阻害の必要性が示された。本研究で新たに作成した ATL Xenograft モデルを用いて薬剤の有効性を評価したところ、EZH1/2 二重阻害薬は ATL 細胞の生着を完全に遮断し、また生着後に投薬した場合でも腫瘍性増殖をほぼ完璧に抑制することがわかった。また阻害薬は腫瘍細胞の多臓器への浸潤や末梢血への流入も効果的に抑制した。腫瘍細胞を抑制する濃度域による体重減少は軽微であったことから、特異性の高い治療法であると考えられた。ゲノムワ

イドなクロマチン免疫沈降法を用いて分子動態を詳細に検討した結果、従来の EZH2 単独阻害薬による EZH1 の強力な補償効果が明らかとなった。EZH1/2 阻害薬は、ゲノムワイドなクロマチン再構築を効果的に引き起こすことが示されたため、ゲノム全体に蓄積したメチル化を抑制するために EZH1 及び EZH2 を同時に阻害する必要性が強く支持された。EZH1 は、ATL を始めとする悪性リンパ腫の細胞起源である成熟リンパ球において発現が高いことがデータベースの解析からわかった。そこでびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫の細胞株を用いて検討したところ、ATL と同様に EZH2 単独阻害薬と比較して EZH1/2 二重阻害薬が強い増殖抑効果を示すことがわかった。また遺伝子発現データベースを用いた解析から、これらの悪性リンパ腫における EZH1 及び EZH2 依存的なエピジェネティック異常の蓄積を明らかにした。有効性と安全性の根拠となる分子メカニズムの解析を行った。EZH1/2 阻害薬投与前後のエピゲノムデータを比較検討した結果、EZH1/2 阻害によって H3K27me3 が減少した遺伝子座において、遺伝子抑制に関わる H2AK119ub が減少し、逆に遺伝子発現誘導に関わる H3K27ac 及び H3K4me3 の上昇が起こることがわかった。さらにクロマチン制御因子である ARID1A がリクルートされ、結果的に RNA ポリメラーゼ II のリクルートによって強い転写誘導が起こることがわかった。投薬によってエピゲノムが正常化した遺伝子座では効率的な転写が誘導され、また機能的に重要な microRNA 抑制も解除されることがわかった。さらに間接的に活性化されていた NF- κ B 経路の活性化も阻害剤投与によって抑制されることが示された。既存の EZH2 単独阻害剤はこれらの効果が限定的で、二重阻害剤の重要性も確認された。以上のデータから、新規 EZH1/2 阻害薬は効果的にエピゲノム異常を正常化することで ATL 細胞の増殖を抑制すること、またエピゲノムに変化を与える他の薬剤との併用による相乗効果も期待された。臨床検体及び細胞モデルを用いて EZH1/2 阻害剤によって変動する遺伝子発現パターンを明らかにし、感受性細胞の特徴が示されつつある。また同様の検討から、ATL だけでなく他の T 及び B 細胞由来悪性リンパ腫も高感受性であることが示され、臨床試験におけるバイオマーカー探索の基礎データを取得した。EZH1/2 阻害剤投薬後のダイナミックなエピゲノム変化反応の詳細な解析から、エピゲノム異常に関わる新たな因子を複数同定した。特にクロマチンの構造変化に関わる SWI/SNF 複合体や他のヒストン修飾酵素が深く関わっており、EZH1/2 阻害剤は効果的にエピゲノム異常を正常化させる働きをもつことがわかった。さらに、様々ながん種で高頻度に起こる上記のエピゲノム制御因子の遺伝子変異が、EZH1/2 によるエピゲノム異常を引き起こし細胞の悪性化に深く関わること、EZH1/2 阻害剤はこのようなエピゲノム因子の遺伝子変異を持つ細胞に対して非常に高い効果を示すことが基礎データから強く示唆された。全遺伝子発現データおよびエピゲノムデータから、ATL の前がん状態である HTLV-1 感染不死化細胞に対して EZH1/2 阻害剤が有効である根拠を示し、実際に HTLV-1 キャリアの感染細胞を試験管内で選択的に死滅させることを実験的に示した。また関連疾患である HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における H3K27me3 のゲノムワイドな異常も明らかにし、メカニズムに基づいた EZH1/2 阻害剤の適応拡大の可能性が示唆されている。発症リスクが高いと考えられる感染細胞が多い症例では、エピゲノム異常も顕著であり、リスク予知に基づいた新たな発症予防法としての活用も将来的に期待される。EZH1/2 阻害剤の至適濃度の検討では、HTLV-1 感染細胞は低濃度域で感受性を示すことが明らかとなり、安全な長期投与試験に向けた基礎データを得た。

非ホジキンリンパ腫および急性骨髄性白血病の新たな治療法を確立するため、EZH1/2 二重阻害剤 (DS-3201、OR-S1 の誘導体) の製造法を確立し、非ホジキンリンパ腫を対象とした第 1 相試験 (DS3201-A-J101 試験) を準備した。第 59 回米国血液学会 (ASH) 年次総会で発表された本試験の中間結果によれば、予備の有効性については、評価可能な患者 17 名中 10 名において完全寛解 (CR) または部分寛解 (PR) が認められ、全奏効率は 58.8%であった。全奏効率の内訳は、B 細胞リンパ腫の患者 11 名中 5 名 (45.5%) において PR が認められ、T 細胞リンパ腫の患者 6 名中 5 名 (83.3%) において CR (1 名) または PR (4 名) が認められた。安全性については、評価可能な患者 18 名において 200 mg または 300 mg を投与された 3 名に 4 件の用量制限毒性が認められ、その内訳は、グレード 4 の血小板数減少 3 名 (投与量 200 mg で 1 名、300mg で 2 名) とグレ

ード3の貧血1名（投与量300 mg）がみられたが、それ以外は概ね良好な安全性プロファイルを示し、1日1回200 mg投与は安全で且つ長期間の病勢コントロールにも寄与できる可能性が示唆されている。また、DS3201-A-J101試験に参加した被験者における皮膚と末梢血顆粒球のヒストン H3、27 位リジン基のメチル化状態を評価したところ、両者特に末梢血顆粒球でのメチル化阻害効果が確認された。これは本剤投与による薬効発現の作用機序を合理的に説明するものと考えられる（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02732275）。米国にて実施中の再発難治性 AML および急性リンパ球性白血病患者を対象とした DS3201-A-U102 試験については、上述の非ホジキンリンパ腫のデータを参考として試験デザインとプロトコルを確立し、2016 年末までに FDA に治験届けを提出、2017 年 4 月に当該試験の最初の被験者への投与が開始された。現在、臨床試験施設数を拡大し、被験者の安全性確保を第一義として、PD マーカーの精査やバイオプシー生検を通じて有効性指標の確立に努めている（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03110354）。

英文：1 ページ程度

Acute myeloid leukemia (AML) is an aggressive and lethal blood cancer originating from rare populations of leukemia stem cells (LSCs). AML relapse after conventional chemotherapy is caused by a remaining population of drug-resistant LSCs. Selective targeting of the chemo-resistant population is a promising strategy for preventing and treating AML relapse. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) trimethylates histone H3 at lysine 27 to maintain the stemness of LSCs. In this study, we show that quiescent LSCs expressed the highest levels of enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2, the PRC2 catalytic subunits, in the AML hierarchy, and that dual inactivation of EZH1/2 eradicated quiescent LSCs to cure AML. Genetic deletion of *Ezh1/2* in a mouse AML model induced cell cycle progression of quiescent LSCs and differentiation to LSCs, eventually eradicating AML LSCs. Quiescent LSCs showed PRC2-mediated suppression of *Cyclin D*, and Cyclin D-overexpressing AML was more sensitive to chemotherapy. We have developed a novel EZH1/2 dual inhibitor with potent inhibitory activity against both EZH1/2. In AML mouse models and patient-derived xenograft models, the inhibitor reduced the number of LSCs, impaired leukemia progression, and prolonged survival. Taken together, these results show that dual inhibition of EZH1/2 is an effective strategy for eliminating AML LSCs.

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy caused by accumulation of abnormal clonal plasma cells. Despite the recent development of novel therapies, relapse of MM eventually occurs due to a remaining population of drug-resistant myeloma stem cells. Side population (SP) cells exhibit cancer stem cell-like characteristics in MM; thus targeting these cells is a promising strategy to completely cure this malignancy. In this study, we showed that SP cells expressed higher levels of *EZH1* and *EZH2* than non-SP cells, suggesting that EZH1/2 are both potential therapeutic targets to eradicate myeloma stem cells. A novel EZH1/2 dual inhibitor, OR-S1, effectively eradicated SP cells and had a greater antitumor effect than a selective EZH2 inhibitor *in vitro* and *in vivo*, including in a patient-derived xenograft model. Moreover, long-term continuous administration of OR-S1 completely cured mice bearing orthotopic xenografts. Additionally, PRC2 directly regulated WNT signaling, and over-activation of this signaling induced by dual inhibition of EZH1/2 eradicated myeloma stem cells. Our results demonstrate that dual inhibition of EZH1/2 is a promising therapeutic approach to eradicate myeloma stem cells, leading to significant advances in the treatment of MM.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare subtype of non-Hodgkin's lymphoma, which is characterized by overexpression of cyclin D1. Although novel drugs, such as ibrutinib, show promising clinical outcomes, relapsed MCL often acquires drug resistance. Therefore, alternative approaches for refractory MCL are needed. In this study, we examined whether a novel inhibitor of EZH1/2, OR-S1, had an antitumor effect on MCL cells. In an ibrutinib-resistant MCL patient-derived xenograft (PDX) mouse model, OR-S1 treatment by oral administration significantly inhibited MCL tumor growth, whereas ibrutinib did not. *In vitro* growth assays showed that compared to an established EZH2-specific inhibitor GSK126, OR-S1 had a marked antitumor effect on MCL cell lines. Furthermore, comprehensive gene expression analysis was performed using OR-S1-sensitive or insensitive MCL cell lines and showed that OR-S1 treatment modulated B-cell activation, differentiation, and cell cycle. In addition, we identified CDKN1C (p57, KIP2), which contributes to cell cycle arrest, as a direct target of EZH1/2 and showed that its expression influenced MCL cell proliferation. These results suggest that EZH1/2 may be a potential novel target for the treatment of aggressive ibrutinib-resistant MCL via CDKN1C-mediated cell cycle arrest.

Adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) shows global gene expression alterations that confer cellular characteristics and unfavorable prognosis. We analyzed epigenome and transcriptome to decipher ATL-specific epigenetic-code. H3K27me3 was significantly and frequently reprogrammed at half of genes in ATL, the pattern of which appears distinct from other cell types. The global H3K27me3 alterations occurred at an early stage of disease progression and were involved in determination of a broad spectrum of gene categories (*Blood*, 2016). The H3K27me3 landscape was explained by two epigenetic writers EZH1 and EZH2 co-occupancy. Indeed, simultaneous depletion of EZH1/2 significantly diminished H3K27me3 and dramatically inhibited ATL and HTLV-1 infected cell growth compared with single depletion, suggesting the compensatory actions of EZH1/2. The new EZH1/2 inhibitors successfully inhibited genome-wide EZH1/2 occupancies without compensation, resulting in effective H3K27me3 reduction and gene reactivation compared with the single inhibitor. The dual-inhibitor significantly blocked primary ATL cell survival and *in vivo* tumor growth. Transcriptome and epigenome dataset also demonstrated EZH1/2-mediated epigenetic abnormalities in various lymphomas including ATL, DLBCL, BL, AITL, ALCL, and PTCL-NOS, all of which showed higher sensitivity against the EZH1/2 inhibitor *in vitro* and *in vivo* (5.2~200-fold). These integrated analyses provide a novel concept "EZH1+EZH2 dual-targeting" and demonstrate the preclinical validity. Based on our results, a first-in-human phase 1 clinical trial against T- and B-cell non-Hodgkin lymphomas is now underway and clinical safety and promising activity against lymphomas have been suggested.