

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

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) MENIN-MLL 結合阻害による新規がん分子標的療法の開発  
(英語) Development of novel molecularly-targeted therapy for cancer by MENIN-MLL interaction inhibitor

研究開発実施期間: 令和2年9月2日～令和5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) 国立研究開発法人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

急性白血病の治療は現在でも化学療法が主体である中で、治癒が期待できない予後不良群が存在する事から副作用の少ない革新的な分子標的療法の開発が切望されている。特に染色体 11q23 に座位する MLL 遺伝子を切断点とする相互転座を有する患者群の5年生存率は20%以下と極めて予後不良である。研究分担者の横山は以前の研究において、11q23 転座型急性白血病では、MLL 遺伝子転座の結果生み出される MLL 融合タンパク質が MENIN と結合し HOXA 遺伝子や MEIS1 の発現を誘導することを発見し、MENIN と MLL 融合タンパク質の結合が急性白血病の発症及び維持に必須であることを明らかにしている。また、予後中間群の約半数を占める NPM1 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病でも HOXA 遺伝子群及び MEIS1 の発現亢進が見られ、内在性 MLL と MENIN の複合体形成を介した HOXA 遺伝子発現機構が報告されている。これら知見を踏まえ、研究分担者である住友ファーマ株式会社が創生した MENIN-MLL 結合阻害薬(YKD-5062)が MLL 融合タンパク質を発現する白血病細胞の増殖を阻害し、分化を誘導することを確認した。本化合物は野生型 MLL と MENIN との結合も阻害することから、HOXA 遺伝子群の発現亢進が見られる白血病全般に対して有効であることが期待される。さらには HOX 遺伝子群を高発現する非白血病がん種にも有効である可能性がある。本研究ではこれまでに国立がん研究センターが蓄積してきた臨床検体や様々な疾患マウスモデルを活用し YKD-5062 の有効性を立証すると共に本剤に対する感受性を規定する遺伝子変異を明確化することで、難治性の急性白血病に対する副作用の少ない革新的な治療法を確立する事を目的に取り組んだ。

YKD-5062 は、*in vitro* 蛋白相互作用阻害試験において極めて強い MENIN-MLL 蛋白相互作用阻害活性を示した (IC50 < 2 nM)。またヒト白血病細胞株を用いた *in vitro* 細胞増殖抑制試験において、MLL 遺伝子転座を有する白血病細胞株 (MV4;11, MOLM-13, KOPN-8) 及び NPM 変異を有する白血病細胞株 (OCI-AML3) に対し顕著な増殖抑制効果を示した (IC50=10-35 nM)。この一方で、MLL 転座及び NPM 変異を有さない白血病細胞株 (HL-60, MOLT-4, Reh) に対しては増殖抑制効果を示さなかった (IC50>10 $\mu$ M)。本結果から、YKD-5062 は MLL 転座および NPM 変異を有する白血病細胞 (MENIN-MLL 蛋白結合に依存している白血病細胞) に対し選択的に薬理作用を示していることが示唆された。続いて MV4;11 細胞 (MLL-AF4 転座を有するヒト急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株) において、YKD-5062 濃度依存的に MENIN-MLL 相互作用に伴い発現する HOXA9、MEIS-1 などの未分化マーカー遺伝子の発現量が減少し、骨髄球系細胞における終末分化マーカーである ITGAM 発現量が増加することを確認した。MV4;11 細胞をヌードマウスに皮下移植することで作製した担癌モデルにおいて YKD-5062 の経口投与を 20 日間行い、毒性所見の観察されない投与量 (25 mg/kg/BID (p. o.)) において有意な腫瘍縮退効果を確認した。また、本モデル腫瘍組織における遺伝子発現解析を行い *in vitro* 同様に有意な PD マーカー変動 (HOXA9, MEIS-1 発現量減少及び ITGAM 発現量増加) を確認した。更に MLL 融合遺伝子 (MLL-ENL, MLL-AF10 など) をマウス骨髄から採取した造血幹・前駆細胞にレトロウイルスを使って導入し骨髄移植を行うことで作製した AML モデルマウスにおいて、YKD-5062 投与による致死性の AML 病態 (末梢血における白血病芽球、肝脾腫など) の改善と、それに伴う有意な生存延長を確認した。更に、現行の標準治療である化学療法剤 (シタラビン+ダウノルビシン) 治療と比して有意な生存延長効果を確認した。

国立がん研究センターが保有する急性白血病臨床検体を用い *ex vivo* 薬効評価系 (Colony formation アッセイ及び Blast アッセイ) を構築し、YKD-5062 の薬効評価を行った。RNA シーケンスにより MLL-AF6 融合遺伝子を有することが確認された AML 患者検体を用いた *ex vivo* 薬効試験において、YKD-5062 処理により白血病細胞特徴的な未分化細胞より構成される大型コロニー形成が消失し、分化した顆粒球細胞から構成される小型コロニーへ変化することを確認した。この際、PD マーカーとなる HOXA9, MEIS1 の発現低下と単球・顆粒球系細胞における分化マーカー (ITGAM) の発現上昇が観察された。加えてフローサイトメトリーを用いた表面抗原解析においても CD33, CD11b といった分化マーカーの発現上昇が確認された。NPM 遺伝子変異を有する AML 患者検体を免疫不全マウスに骨髄移植することで作製した PDX (Patient derived xenograft) モデルにおいては、コントロール群は末梢血における白血病芽球 (ヒト CD45 陽性細胞) の異常増殖を伴う致死性の AML 病態を呈したが、YKD-5062 投与群 (25, 50, 100 mg/kg/BID, 28 days) では血液学的完全寛解 (末梢血における白血病芽球 (ヒト CD45 陽性細胞) の消失) を伴う有意な生存延長が確認された。また、MLL-AF4 融合遺伝子を有する AML 患者検体より作製した PDX モデルにおいても同等の薬理効果を確認した。国立がん研究センターが保有する急性白血病臨床検体ライブラリーを用い、*ex vivo* 薬効試験及び遺伝子変異解析を行うことで YKD-5062 に対し感受性を規定する遺伝子変異探索を行った。その結果、MLL 融合遺伝子、NPM 変異に加え、NUP98 融合遺伝子など複数の融合遺伝子及び複数の遺伝子変異が新たに同定された。新たに同定された YKD-5062 感受性を規定する遺伝子変異に関しては、遺伝子変異体をマウス造血幹・前駆細胞にレトロウイルスを使って導入することで白血病幹・前駆細胞を作製し YKD-5062 の薬理効果を確認した。今回新たに同定された YKD-5062 感受性を規定する遺伝子変異は、MENIN-MLL 結合阻害剤の急性白血病における対象患者セグメント拡大に貢献する成果となった。

MENIN-MLL 結合阻害剤の非白血病がん種への適応の可能性を検討した。細胞株パネルや様々ながん種のモデル実験系による網羅的解析から、YKD-5062 感受性を示すがん種が複数同定された。特に 2 つのがん種においては、当該がん種の複数の細胞株において顕著な薬理効果が確認された。YKD-5062 感受性を規定するバイオマーカー候補も幾つか同定されており、他がん種への適応へ向けた重要な成果となった。

本研究課題は、MENIN-MLL 結合阻害剤による副作用の少ない革新的な分子標的療法を確立する事を目的に取り組まれてきた。本研究班が構築してきた様々なマウス疾患モデルや白血病臨床検体を活用し MLL 融合遺伝子を有する急性白血病に対する YKD-5062 の有用性を明確化することに成功した。また、YKD-5062 が MLL 融合遺

伝子を有さない急性白血病の一部にも有効であることを発見し、薬剤感受性を規定する遺伝子変異を複数同定することにも成功した。本研究成果を活かし、研究分担者である住友ファーマ株式会社主導の下、MENIN-MLL 結合阻害剤による MLL 白血病を含む急性白血病を対象とした臨床試験の開始に大きく貢献した。更に、MENIN-MLL 結合阻害剤が非白血病がん種の一部に対しても有効であることを発見し適応拡大の可能性を示すに至った。以上の研究成果は、予後不良の急性白血病に対する革新的な分子標的療法を確立し、MENIN-MLL 結合阻害剤の価値最大化にも貢献する内容と考える。

The 11q23 abnormalities involving mixed lineage leukemia (MLL) gene are frequently found in adult and pediatric patients with acute leukemia. MLL rearrangements (MLL-r) are often associated with a poor prognosis and show poor response to currently available therapies, thus developing more effective therapy is urgently required. We have reported that leukemogenic activity of MLL fusion proteins, the products of the chimeric genes of MLL and its fusion partners generated by MLL-r, is critically dependent on direct interaction with MENIN, the product of the MEN1 gene (Yokoyama et.al. Cancer Cell, 2008). Interaction of MLL fusion proteins with MENIN plays an important role to enhance the proliferation and to block the differentiation of hematopoietic cells by maintaining high expression of hematopoietic stem cell program genes, such as HOXA9 and MEIS1. It has also been reported that the MENIN interaction with wild-type MLL, is required to induce HOXA9 and MEIS1 expression and also crucial for the development of acute leukemia with nucleophosmin (NPM1) mutations. Therefore, the MENIN-MLL interaction inhibitor is expected to have anti-leukemogenic activity against acute leukemia with MLL-r or NPM1 mutation by suppressing the expression of HOXA9 and MEIS1 and inducing terminal differentiation. Additionally, MENIN-MLL interaction inhibitor could be effective against other types of leukemia with HOX gene overexpression and other cancer types with HOX gene overexpression. In this grant, we have evaluated efficacy of MENIN-MLL interaction inhibitor and have explored additional target segments in acute leukemia and additional indications.

We generated YKD-5062, a potent, and orally bioavailable MENIN-MLL interaction inhibitor for the treatment of acute leukemia patients with MLL-r or NPM1 mutation. YKD-5062 directly bound to the MENIN protein and inhibited the MENIN-MLL interaction ( $IC_{50} < 2nM$ ). YKD-5062 selectively inhibited the cell growth of human leukemia cell lines including MV-4-11, MOLM-13, KOPN-8, and OCI-AML3 ( $IC_{50} = 10-35 nM$ ). These YKD-5062-sensitive cell lines possess a MLL-r or NPM1 mutation. On the other hand, YKD-5062 did not affect the cell growth of human leukemia cell lines such as HL-60, MOLT-4, and Reh ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ), which do not have MLL-r or NPM1 mutations. In a mouse xenograft model using MV-4-11 cells, which express MLL-AF4, YKD-5062 exhibited a significant antitumor activity at the doses of 25 mg/kg administered twice daily (BID) for 20 days. There were no dose related changes in general condition or body weight. The effects of YKD-5062 on the expression of MENIN-MLL-regulated genes and differentiation marker genes were evaluated using MV-4-11 cells as pharmacodynamics markers in vitro and in vivo. In both cases, YKD-5062 significantly reduced the gene expression of MEIS1 and HOXA9, representative leukemic genes regulated by the MENIN-MLL complex. On the contrary, YKD-5062 significantly increased the gene expression level of ITGAM, a terminal differentiation marker.

The efficacy of YKD-5062 was further assessed in acute leukemia patient samples and in mouse AML models. YKD-5062 strongly inhibited blast colony formation and changed the gene expression of the pharmacodynamics markers (HOXA9, MEIS1 and ITGAM) in an AML patient sample carrying the MLL-AF6

fusion. In patient-derived xenograft (PDX) model with NPM1 mutation, human CD45 positive cells in peripheral blood progressively decreased during and beyond the 28 day period of YKD-5062 administration at doses of 25, 50, and 100 mg/kg BID and achieved a complete remission with no relapse at the doses of 50 and 100 mg/kg BID. At these three dose levels, YKD-5062 also induced a significant prolongation of survival compared to the vehicle control. Similarly, in a PDX model with MLL-AF4, YKD-5062 induced complete remission and significant prolongation of survival at the doses of 100 mg/kg BID compared to the vehicle control. In mouse AML models wherein MLL-ENL- or MLL-AF10-transduced bone marrow cells are transplanted in syngeneic mice, YKD-5062 showed improvement of AML phenotype (leukemia blast frequency in peripheral blood, hepatosplenomegaly) and induced a significant prolongation of survival at the doses of 200 mg/kg once daily (QD) compared to the vehicle control and the standard chemo therapy (cytarabine+daunorubicin) group.

To explore additional target segments in acute leukemia, YKD-5062 sensitivity was tested on leukemia patient samples in National Cancer Center Research Institute. Some gene translocations and mutations, including MLL-r, NUP98-r and NPM1 mutation, were identified which could confer YKD-5062 sensitivity. Efficacy of YKD-5062 was also confirmed on mouse leukemic stem/progenitor cells which were generated by retroviral transduction of the newly-identified gene into mouse bone marrow cells. YKD-5062 sensitivity was also comprehensively tested on cancer cell line panel, which is containing more than 300 cancer cell lines, and on various types of cancer models. YKD-5062 sensitivity was observed on some cancer cell lines and two specific cancer types showed trend of high frequency of YKD-5062 sensitivity. Some cancer cell lines of the two specific cancer types clearly showed growth inhibition by YKD-5062 in a dose dependent manner and candidates of biomarkers were identified.

In summary, we showed that YKD-5062 has a potential as an antitumor drug that provides survival advantages in acute leukemia patients with MLL rearrangement or NPM1 mutation. Based on our results, a Phase 1/2 clinical study of MENIN-MLL interaction inhibitor was initiated in AML patients. Additionally, we successfully identified novel gene mutations which could confer YKD-5062 sensitivity in leukemia cells, it would contribute to expand the target segment in AML patients. We also found out YKD-5062 sensitivity on non-hematopoietic cancer cells, which could contribute to expand disease indication.

### III 事後評価総合所見

YKD-5062 は MENIN-MLL 結合阻害に対する特異性が高く、また非特異的な細胞障害活性を有していないことを見出し、マウス白血病モデルやヒト急性白血病 PDX モデルで著効を確認したことは高く評価できる。また、臨床試験に向けた非臨床試験と治験薬製造を産学連携で着実に進め、日米カナダで臨床試験の開始に至った点も高く評価できる。

さらに、MENIN-MLL 結合による HOXA9 高発現誘導に着目して、白血病以外のがん種にも YKD-5062 が有効である可能性を見出している。その作用機序の解明による適応拡大が期待される。

なお、今後の本剤の適応拡大に関する研究開発については、公的資金に頼ることなく、企業が中心となってアカデミアと共同で推進することを期待する。