Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

NANOG Expression as a Responsive Biomarker during Treatment with Hedgehog Signal Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia

Kakiuchi, Seiji

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2017-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6970号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006970

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

NANOG Expression as a Responsive Biomarker during Treatment with Hedgehog Signal Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia

急性骨髄性白血病に対するヘッジホッグ阻害薬投与の治療反応性バイオマーカーとしてのNANOG発現

垣内　誠司，南　陽介，宮田　吉晴，水谷　優，後藤　秀彰，
川本　晋一郎，薬師神　公和，倉田　啓史，松岡　広，南　博信

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腫瘍・血液内科学
指導教員：南　博信教授

垣内　誠司

Hedgehog (Hh) シグナルは胎生期の臓器形成において重要な機能を担うとして研究が進められてきたが、近年、癌における当該シグナル分子のアベラントな活性化や癌幹細胞への関わりが見出されている。Hh シグナル伝達経路上の Smoothened (SMO) を標的とする阻害剤は、基底細胞癌などに対して治療効果を示し、AML を含めた造血器腫瘍に対しても治験が進行中であり近年第 I 相試験で SMO 阻害薬のひとつである PF-04449913 の安全性が報告されたものの、その治療の詳細な作用機序や治療効果を裏付けるバイオマーカー等については明らかにされていない。白血病細胞はヘテロな細胞集団から形成され、さらにその分化段階においても多様性を示し、既存の化学療法に対して白血病幹細胞 (LSC) は治療抵抗性を持ち残存することにより、腫瘍の難治性や再発へとつながることが知られていることから、LSC に対して効果的に奏効する薬剤の到来が望まれており、SMO 阻害薬に対する期待は大きい。

当研究では骨髄異形成症候群より白血化した難治性急性骨髄性白血病の治験患者に対して PF-04449913 を投与し、治験期間中に採取した骨髄検体を用いて治療前および治療 2 週間後の骨髄検体を用いて遺伝子プロファイル解析を行ったところ、同薬剤が細胞周期の制御および自己複製能のシグネチャーに影響を与えることを示した。以前に我々のグループが行った実験で、急性骨髄性白血病の細胞を移植し生着させた免疫不全の NOG マウスに対して同薬剤を投与した in vivo での研究でも、同じ２つのシグネチャーに共通して有意に変化が表れていることを発見した。

細胞周期の制御に関するシグネチャーにともに変化がみられたことから、治験患者の骨髄検体を用いて Ki-67 で免疫染色を施したところ、薬剤投与早期である 5 日目の骨髄検体では染色が一時的に増強するものの、2 週間後および 4 週間後には染色領域は減少していることを確認した。以上より仮説ではあるが、同薬剤の投与により静止期にあった白血病幹細胞を細胞周期へと入れる効果が認められた可能性があると考えられる。さらに治療前と治療 2 週間後の骨髄検体を用いた遺伝子プロファイル解析の結果より、治療後に全患者において細胞周期と関連する複数の分子の発現が低下していることも示された。

また、NOG マウスのモデルと治験患者の骨髄検体において上皮癌幹細胞の自己複製能にかかわるシグネチャーに影響を及ぼすことが示されたことから、我々は特に自己複製能を示す分子である NANOG の発現に着目した。NANOG は ES 細胞や髄芽腫のような脳腫瘍で自己複製能を示す転写因子として注目されており、Hh シグナルの主要なコンポーネントとなる分子である glioma-associated oncogene homolog (GLI) が NANOG のプロモーターに結合し、NANOG の発現を活性化することが報告されている。そのため、我々は治験患者骨髄検体を用いて、経時的に Hh シグナルの GLI 標的遺伝子や NANOG の変動を経時的に real-time qPCR を用いて解析したところ、GLI 標的遺伝子と NANOG の変動に相関が認められており、NANOG の転写は治療中の反応性のバイオマーカーに有用な可能性が示唆された。さらには、治験患者での治療前後で骨髄の抗 NANOG 抗体により免疫染色を施したところ、経時的に染色領域の減少が認められた。

これまでに NOG マウスを用いた in vivo モデルおよび治験患者の骨髄検体にて PF-04449913 投与により自己複製能にともに影響すること、そして治験患者の骨髄検体で NANOG の発現の低下がみられており PF-04449913 の投与により NANOG を介して自己複製能に影響を自己複製能に影響を及ぼす可能性が示唆された。そのため、我々は前臨床モデルとして sonic Hedgehog ligand を強制発現させたストローマの HS-5 と白血病細胞株である THP-1 を共培養した in vitro の系を用いて PF-04449913 の投与を行い経時的に解析したところ、real-time qPCR で NANOG の転写レベルの低下がみられ、western blot も施行したところタンパクレベルでも低下がみられることが確認された。PF-04449913 のみならず同様の共培養の系において 3 種類の siRNA を用いて SMO を遺伝学的にノックダウンさせたモデルにおいても、やはり western blot にて NANOG のタンパクが減少していることが判明した。以上より、当薬剤が AML の治療において Hh シグナルの下流に位置すると考えられる NANOG を速やかに抑制することで自己複製能を標的する作用を持ち、NANOG の転写レベルが治療反応性のバイオマーカーになり得ることを我々は初めて報告した。

従来の化学療法では増殖傾向にある腫瘍に対して殺細胞効果を得ることができる一方で、休止状態にある白血病幹細胞は化学療法に抵抗性を示し再発へとつながるという問題点があったため、白血病幹細胞を標的とした治療が求められてきた。本薬剤は白血病幹細胞の自己複製能を阻害することで化学療法に対する耐性を克服する新規治療となり得る。しかし、近年難治性 AML を対象とした第 I 相試験では単剤では腫瘍を抑制する作用は不十分であることも示されている。それゆえに、今後は本薬剤と従来の化学療法や分子標的薬および免疫チェックポイント阻害薬などの新規治療を併用することが有望な治療戦略となる可能性があり、どのような薬剤と組み合わせることで高度な治療効果を得られるかを検討することが今後求められる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2699号	氏　名	垣内 誠司
論文題目 Title of Dissertation	急性骨髄性白血病に対するヘッジホッグ阻害薬投与の治療反応性バイオマーカーとしてのNANOG発現 NANOG Expression as a Responsive Biomarker during Treatment with Hedgehog Signal Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	鈴木 聡 錦織 千佳子 吉田 優	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Hedgehog（Hh）シグナルは胎生期の臓器形成において重要な機能を担うとして研究が進められてきたが、近年、癌における当該シグナル分子のアベラントな活性化や癌幹細胞への関わりが見出されている。Hhシグナル伝達経路上のSmoothened（SMO）を標的とする阻害剤は、基底細胞癌などに対して治療効果を示し、AMLを含めた造血器腫瘍に対しても治験が進行中であり近年第I相試験でSMO阻害薬のひとつであるPF-04449913の安全性が報告されたものの、その治療の詳細な作用機序や治療効果を裏付けるバイオマーカー等については明らかにされていない。白血病細胞はヘテロな細胞集団から形成され、さらにその分化段階においても多様性を示し、既存の化学療法に対して白血病幹細胞（LSC）は治療抵抗性を持ち残存することにより、腫瘍の難治性や再発へとつながることが知られていることから、LSCに対して効果的に奏効する薬剤の到来が望まれており、SMO阻害薬に対する期待は大きい。

当研究では骨髄異形成症候群より白血化した難治性急性骨髄性白血病の治験患者に対してPF-04449913を投与し、治験期間中に採取した骨髄検体を用いて治療前および治療2週間後の骨髄検体を用いて遺伝子プロファイル解析を行ったところ、同薬剤が細胞周期の制御および自己複製能のシグネチャーに影響を与えることを示した。また以前に申請者のグループが行った実験で、急性骨髄性白血病の細胞を移植し生着させた免疫不全のNOGマウスに対して同薬剤を投与したin vivoでの研究でも、同じ２つのシグネチャーに共通して有意に変化が表れていることを見出した。

細胞周期の制御に関するシグネチャーにともに変化がみられたことから、治験患者の骨髄検体を用いてKi-67で免疫染色を施したところ、薬剤投与早期である5日目の骨髄検体では染色が一時的に増強するものの、2週間後および4週間後には染色領域は減少していることを確認した。以上より仮説ではあるが、同薬剤の投与により静止期にあった白血病幹細胞を細胞周期へと入れる効果が認められた可能性があると考えられる。さらに治療前と治療2週間後の骨髄検体を用いた遺伝子プロファイル解析の結果より、治療後に全患者において細胞周期と関連する複数の分子の発現が低下していることも示された。

また、NOGマウスのモデルと治験患者の骨髄検体において上皮癌幹細胞の自己複製能にかかわるシグネチャーに影響を及ぼすことが示されたことから、申請者は特に自己複製能を示す分子であるNANOGの発現に着目した。NANOGはES細胞や髄芽腫のような脳腫瘍で自己複製能を示す転写因子として注目されており、Hhシグナルの主要なコンポーネントとなる分子であるglioma-associated oncogene homolog（GLI）がNANOGのプロモーターに結合し、NANOGの発現を活性化することが報告されている。そのため、申請者は治験患者骨髄検体を用いて、経時的にHhシグナルのGLI標的遺伝子やNANOGの変動を経時的にreal-timeqPCRを用いて解析したところ、GLI標的遺伝子とNANOGの変動に相関が認められており、NANOGの転写は治療中の反応性のバイオマーカーに有用な可能性が示唆された。さらには、治験患者での治療前後で骨髄の抗NANOG抗体により免疫染色を施したところ、経時的に染色領域の減少が認められた。

これまでにNOGマウスを用いたin vivoモデルおよび治験患者の骨髄検体にてPF-04449913投与により自己複製能にともに影響すること、そして治験患者の骨髄検体でNANOGの発現の低下がみられており PF-04449913の投与によりNANOGを介して自己複製能に影響を自己複製能に影響を及ぼす可能性が示唆された。そのため、申請者は前臨床モデルとしてsonic Hedgehog ligandを強制発現させたストローマのHS-5と白血病細胞株であるTHP-1を共培養したin vitroの系を用いてPF-04449913の投与を行い経時的に解析したところ、real-time qPCRでNANOGの転写レベルの低下がみられ、western blotも施行したところタンパクレベルでも低下がみられることを確認した。

さらにPF-04449913のみならず同様の共培養の系において3種類のsiRNAを用いてSMOを遺伝学的にノックダウンさせたモデルにおいても、やはりwestern blotにてNANOGのタンパクが減少していることが判明した。

以上より、当薬剤がAMLの治療においてHhシグナルの下流に位置すると考えられるNANOGを速やかに抑制することで自己複製能を標的する作用を持ち、NANOGの転写レベルが治療反応性のバイオマーカーになり得ることを我々は初めて報告した。

従来の化学療法では増殖傾向にある腫瘍に対して殺細胞効果を得ることができる一方で、休止状態にある白血病幹細胞は化学療法に抵抗性を示し再発へとつながるという問題点があったため、白血病幹細胞を標的とした治療が求められてきた。本薬剤は白血病幹細胞の自己複製能を阻害することで化学療法に対する耐性を克服する新規治療となり得る。しかし、近年難治性AMLを対象とした第Ⅰ相試験では単剤では腫瘍を抑制する作用は不十分であることも示されている。それゆえ、今後は本薬剤と従来の化学療法や分子標的薬および免疫チェックポイント阻害薬などの新規治療を併用することが有望な治療戦略となる可能性があり、どのような薬剤と組み合わせることで高度な治療効果を得られるかを検討することが今後求められる。

このようなことから、本研究者は、博士の学位を得る資格があると認める。