

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461430

研究課題名(和文) ヒストンH3K27トリメチル化抑制を介した薬剤耐性獲得機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma.

研究代表者

菊池 次郎 (Kikuchi, Jiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60371035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫細胞の薬剤耐性獲得に鍵となるヒストンH3の27番目のリジンへのメチル化抑制を介した機構の解明を進めた。その結果、骨髄腫細胞ではストローマ細胞との接着時、PI3K/Akt/IGF-1R キナーゼ経路の活性化によりヒストンメチル化酵素EZH2がリン酸化されて不活性化、遺伝子発現抑制に働くヒストン修飾であるH3K27のメチル化が抑制された結果、抗アポトーシスに働くBcl-2、IGF-1などの発現が亢進することにより耐性を獲得する機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the epigenetic mechanisms underlying drug resistance may greatly contribute to the advancement of cancer therapies. We identified histone H3-lysine 27 (H3K27) as a critical residue for epigenetic modification associated with cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR), which is the most important form of drug resistance in multiple myeloma. Cell adhesion counteracted anticancer drug-induced hypermethylation of H3K27 via inactivating phosphorylation of EZH2, leading to the sustained expression of IGF1, BCL2 and HIF1A. Pharmacological and genetic inhibition of the IGF-1R/PI3K/Akt was able to reverse CAM-DR by promoting EZH2 dephosphorylation and H3K27 hypermethylation both in vitro and in refractory murine myeloma models. Our finding is the first demonstration of an epigenetic mechanism underlying CAM-DR and provides a rationale for the inclusion of kinase inhibitors counteracting EZH2 phosphorylation in combination chemotherapy to increase the therapeutic index.

研究分野：医歯薬学

キーワード：造血器腫瘍 薬剤耐性 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

白血病や悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などの造血器悪性腫瘍には、抗がん剤による化学療法に加え骨髄移植を併用した治療が行われている。しかしながら多くの症例で治療抵抗性・耐性の出現や再発が起り、現在も完治に至る治療法が未確立のままである。従って、薬剤耐性獲得機構の解明とその克服に向けた治療法の開発は重要な研究課題である。

近年、エピジェネティクスと呼ばれるゲノム DNA とヒストンタンパク等から構成されるクロマチンの化学的、構造的な修飾を介した遺伝子発現制御機構が着目されている。このうち、アセチル化やメチル化などのヒストン修飾はヒストンコードと呼ばれ、修飾されるリジン残基の位置を含め多種多様な修飾を受けると共に高い可塑性を持つことで、転写活性化のタイミングや部位を時空的に制御している。このうち、ヒストンのアセチル化は DNA とヒストンの結合を緩めて転写因子が結合しやすくなることで転写活性化に働く。一方、ヒストンからのアセチル基除去(脱アセチル化)は、クロマチンをコンパクトにし、転写因子の結合を阻害することで転写抑制的に働く。この脱アセチル化を担う酵素がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) であり、近年、この HDAC に対する阻害剤の抗腫瘍効果と薬剤耐性克服への有効性が示された (Cell, 141, 69, 2010, Cancer Cell, 17, 427, 2010)。これらの結果は、人為的なヒストンコードの改変が、腫瘍化および耐性化の原因となった転写異常の修正等を介して抗腫瘍効果増強や耐性の克服に有効なことを示唆している。しかしながら、多種多様なヒストンコードのうち、耐性化に鍵となるヒストンコード等その機序には未解明の点が多く残されている。

造血器悪性腫瘍の薬剤耐性獲得において、骨髄微小環境との相互作用は重要な役割を果たしている (J Clin Oncol, 10, 591, 2011)。私たちは、セルカルチャーインサートを用いて骨髄腫細胞株を骨髄ストローマ細胞と接着/非接着下で共培養し、抗がん剤 (cyclophosphamide; 4-OHCY) に対する接着耐性を再現する *in vitro* のシステムを構築した。そして、接着/非接着下間で抗がん剤処理時のヒストン修飾様式の変化を比較した結果、非接着下では抗がん剤処理によるアポトーシスの誘導に伴いヒストン H3 の 27 番目のリジン残基の顕著なトリメチル化 (H3K27me3) の誘導が観察されたが、接着下では H3K27 トリメチル化が抑制されていた。なお、H3K27 以外で転写抑制に働く H3K9、転写活性化に働く H3K4、H3K36 メチル化等、多くのヒストン修飾様式に接着/非接着下間で違いは無く、H3K27 のみがアポトーシス誘導と関連していた。この現象は、間質細胞の代わりに細胞間接着に重要な細胞外膜タンパク質 fibronectin を用いた際、抗がん剤に 4-OHCY の代わりにデキサメサゾンやアドリ

アマイシンを用いた際にも同様に観察された。一方、抗がん剤作用時に誘導される H3K27 のトリメチル化をメチル化阻害剤 (DZNeP) により抑制すると細胞死の誘導は有意に抑制された。以上より、多発性骨髄腫細胞の接着耐性獲得には、H3K27 のトリメチル化の抑制が重要な役割を担っている可能性が明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、
(1) 接着耐性獲得時の H3K27 トリメチル化抑制のメカニズム
(2) H3K27 トリメチル化により制御される遺伝子の中から耐性化の鍵分子の同定
(3) H3K27 トリメチル化やその下流にある鍵分子を標的とした低分子阻害剤の探索から、H3K27 トリメチル化を介した薬剤耐性獲得の分子機構を解明し、耐性を克服しうる新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

まず、本研究で検証を目指す薬剤耐性獲得機構の作業仮説を以下に示す。造血器腫瘍細胞では、骨髄間質細胞との接着を介した相互作用により種々の kinase が活性化、EZH2 のリン酸化が亢進して不活性化型となる。その結果、転写抑制に働くヒストン H3K27 のトリメチル化が抑制され、IRF4 や c-myc など腫瘍増殖やアポトーシス抑制に鍵となる遺伝子の転写が亢進し、接着耐性を誘導すると推測される。そこで、EZH2 ノックダウンや過剰発現、また kinase 阻害剤のライブラリーを作用させた時の H3K27 トリメチル化や EZH2 リン酸化、接着耐性等への作用を解析し、H3K27 トリメチル化抑制の機序を解明する。続いて、ChIP-seq 等による解析から、H3K27 トリメチル化の下流にあり接着耐性の鍵になる分子を同定し、接着耐性メカニズムの全貌を解明する。最後に、EZH2 リン酸化 kinase を含む接着耐性の鍵分子に対する阻害剤の有効性を、*in vitro* 接着耐性再現系とマウスモデルを用いて検証し、接着耐性克服に有効な治療法の開発を目指す。

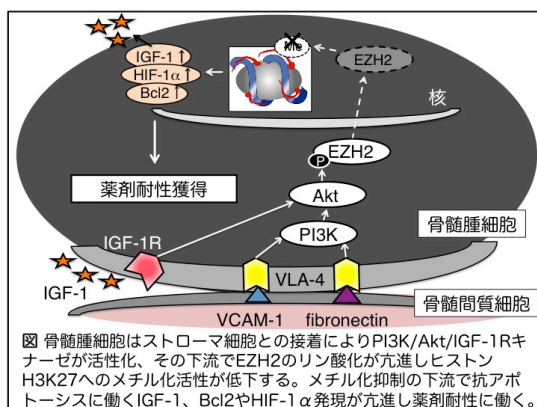
4. 研究成果

多発性骨髄腫細胞の薬剤耐性獲得に鍵となるヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) へのメチル化抑制機構の解明を進めた。その結果、メチル化酵素 EZH2 への PI3K/Akt/IGF-1R キナーゼ経路を介したリン酸化による活性抑制によることを明らかにした。また、マイクロアレイ解析と ChIP assay により、H3K27 メチル化抑制の下流で薬剤耐性に働く分子として Bcl-2 や IGF-1、HIF-1 α 等を同定した。続いて、PI3K/Akt/IGF-1R 経路に対するキナーゼ阻害剤の薬剤耐性克服への有効性の検証を進めた。まず *in vitro* において、これらのキナーゼ阻害剤は EZH2 リン酸化抑制を介して薬剤耐性の克服に有効であった。次に

*in vivo*における検証を進めた。モデルには、ヒト骨髄腫細胞株とストローマ細胞株を混合して免疫不全マウスの皮下に移植した xenograft モデルと、マウス骨髄内で増殖が可能な骨髄腫細胞株を移植した syngeneic モデルの両者を用いた。これらのマウスは従来の抗がん剤であるサイクロフォスファミドには耐性を示すが、IGF-1R 阻害剤である OSI-906 に対しては耐性を示さず、有意な腫瘍退縮効果が得られた。

また、short hairpin-RNA (sh-RNA) を用いた loss-of-function 解析を進めた。EZH2 のリン酸化を担う PI3K や AKT、IGF-1R、及び H3K27 メチル化抑制の下流で発現亢進する IGF-1 に対する sh-RNA 導入により、それぞれの発現をノックダウンさせた骨髄腫細胞株を樹立した。これらの細胞株をストローマ細胞との接着下において抗がん剤を作用させたが、有意な薬剤耐性は見られなかった。

以上の結果から、骨髄腫細胞ではストローマ細胞との接着時、PI3K/Akt/IGF-1R キナーゼ経路の活性化により EZH2 がリン酸化されて不活性化、遺伝子発現抑制に働くヒストン修飾である H3K27 のメチル化が抑制されて、抗アポトーシスに働く Bcl-2、IGF-1 などの発現が亢進し、耐性を獲得する機構を明らかにした。一方、この経路の阻害に働くキナーゼ阻害剤は骨髄腫細胞の薬剤耐性の克服に有効なことを明らかにした(図)。なお本研究は、多発性骨髄腫の薬剤耐性におけるエピジェネティック制御メカニズムを明らかにした初めての報告である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Furukawa Y. and **Kikuchi J.** Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. **Int. J. Hematol.** 104, 281-292, 2016. doi: 10.1007/s12185-016-2048-5.
2. Nemoto A, Saida S, Kato I, **Kikuchi J.**, Furukawa Y, Maeda Y, Akahane K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Kimura S, Sato Y, Okabe S, Niwa A,

Watanabe K, Nakahata T, Heike T, Sugita K, and Inukai T. Specific anti-leukemic activity of PD0332991, a CDK4/6 inhibitor, against Philadelphia-chromosome positive lymphoid leukemia.

Mol Cancer Ther. 15, 94-105, 2016. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1065.

3. **Kikuchi J.**, Koyama D, Wada T, Izumi T, Hofgaard PO, Bogen B, and Furukawa Y. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma.

J Clin Invest. 125, 4375-4390, 2015. doi: 10.1172/JCI80325.

4. Furukawa Y. and **Kikuchi J.** Molecular pathogenesis of multiple myeloma.

Int. J. Clin. Oncol. 20: 413-422, 2015. doi:10.1007/s10147-015-0837-0.

5. Wada T, Koyama D, **Kikuchi J.**, Honda H, and Furukawa Y. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem cells for malignant transformation.

Blood. 125, 3731-3746, 2015. doi: 10.1182/blood-2014-11-610907.

6. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, **Kikuchi J.**, Kato T, Suzuki K, and Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5.

Oncogene. 34, 314-322, 2015. doi: 10.1038/onc.2013.561.

7. **Kikuchi J.**, Koyama D, Mukai H, and Furukawa Y. Suitable drug combination with bortezomib for multiple myeloma under stroma-free conditions and in contact with fibronectin or bone marrow stromal cells.

Int J Hematol. 99, 726-736, 2014. doi: 10.1007/s12185-014-1573-3.

8. Koyama D, **Kikuchi J.**, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, and Furukawa Y. Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia. 28, 1216-1226, 2014. doi: 10.1038/leu.2013.366.

9. Hiraoka N, **Kikuchi J.**, Koyama D, Uesawa M, Akutsu M, Wada T, Abe M, Mori S, Nakamura Y, Kano Y, and Furukawa Y. Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies.

- PLoS One. 3, e90675, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0090675.
10. Sripayap P, Nagai T, Noborio-Hatano K, **Kikuchi J**, Furukawa Y, and Ozawa K. Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells. *Acta Hematol*, 132, 1-4, 2014. doi: 10.1159/000357213.

[学会発表] (計 20 件)

1. **菊池次郎**、林仲信、杉谷雅彦、長田直希、古川雄祐. 細胞膜透過性ペプチドによる体細胞の初期化. **第16回日本再生医療学会総会**、仙台、2017年3月9日。
2. 長田直希、**菊池次郎**、齋藤詩緒里、卜部匡司、林仲信、杉谷雅彦、古川雄祐. エピジェネティック機構の解明に基づく侵襲性の低い i P S 細胞腫瘍化抑制法の開発. **第16回日本再生医療学会総会**、仙台、2017年3月9日。
3. 和田妙子、小山大輔、**菊池次郎**、本田浩章、古川雄祐. ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による前白血病幹細胞形成. **第39回日本分子生物学会年会**、神戸、2016年12月3日。
4. Kazuya Takahashi, Takeshi Inukai, Meixian Huang, Itaru Kuroda, Kinuko Hirose, Atsushi Watanabe, Shinpei Somazu, Kumiko Goi, Keiko Kagami, Masako Abe, Kanji Sugita, Chihiro Tomoyasu, Mio Yano, Toshihiko Imamura, Hajime Hosoi, **Jiro Kikuchi**, Yusuke Furukawa. Anti-leukemic activity of Carfilzomib against B-cell precursor ALL. **第78回日本血液学会学術集会**、横浜、2016年10月13日。
5. Taeko Wada, Daisuke Koyama, **Jiro Kikuchi**, Hiroaki Honda, and Yusuke Furukawa. The shortest isoform of LSD1 act at the initial step to form pre-leukemic hematopoietic stem cells. **第78回日本血液学会学術集会**、横浜、2016年10月13日。
6. **Jiro Kikuchi**, Daisuke Koyama, Taeko Wada, Tohru Izumi, Peter O Hofgaard, Bjarne Bogen, and Yusuke Furukawa. IGF-1R/PI3K/Akt as a critical signal transduction pathway of CAM-DR in multiple myeloma. **第78回日本血液学会学術集会**、横浜、2016年10月13日。
7. 開俊樹、**菊池次郎**、喜多俊介、前仲勝美、古川雄祐、柴山修哉. カイコバキョロウイルス発現系による急性骨髄性白血病に特異的な FLT3/ITD タンパク質の効率的な生産. **日本農芸化学会 2016 年度大会**、札幌、2016年3月28日。
8. 和田妙子、小山大輔、**菊池次郎**、本田浩章、古川雄祐. ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による前白血病幹細胞形成. **第38回日本分子生物学会年会**、**第88回日本生化学会大会合同大会**、神戸、2015年12月1日。
9. Taeko Wada, Daisuke Koyama, **Jiro Kikuchi**, Hiroaki Honda, and Yusuke Furukawa. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. **ISEH-44th Annual Scientific meeting**, Kyoto, Sep16-19, 2015.
10. **Jiro Kikuchi**, Daisuke Koyama, Taeko Wada, Tohru Izumi, Peter O Hofgaard, Bjarne Bogen, and Yusuke Furukawa. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. **ISEH-44th Annual Scientific meeting**, Kyoto, Sep16-19, 2015.
11. Yusuke Furukawa and **Jiro Kikuchi**. Epigenetic mechanisms of cell adhesion mediated drug resistance in multiple myeloma. **第77回日本血液学会学術集会**、金沢、2015年10月17日。
12. **Jiro Kikuchi**, Daisuke Koyama, Taeko Wada, Tohru Izumi, Peter O Hofgaard, Bjarne Bogen, and Yusuke Furukawa. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. **第77回日本血液学会学術集会**、金沢、2015年10月16日。
13. Taeko Wada, Daisuke Koyama, **Jiro Kikuchi**, Hiroaki Honda, and Yusuke Furukawa. The shortest form of histone demethylase LSD1 is implicated in leukemogenesis. **第77回日本血液学会学術集会**、金沢、2015年10月16日。
14. Taeko Wada, Daisuke Koyama, **Jiro Kikuchi**, Hiroaki Honda, and Yusuke Furukawa. The shortest form of histone demethylase LSD1 is implicated in leukemogenesis. **第76回日本血液学会学術集会**、大阪、2014年11月2日。
15. **Jiro Kikuchi**, Daisuke Koyama, Taeko Wada, Tohru Izumi, Peter Hofgaard, Bjarne Bogen, and Yusuke Furukawa. EZH2 activation as a novel strategy to overcome cell adhesion mediated drug

- resistance in myeloma.
第76回日本血液学会学術集会、大阪、2014年11月1日。
16. Daisuke Koyama, **Jiro Kikuchi**, Nobuya Hiraoka, Taeko Wada, Hidemitsu Kurosawa, Shigeru Chiba, and Yusuke Furukawa. The Notch signaling pathway as a critical target of proteasome inhibitors in -T-ALL.
第76回日本血液学会学術集会、大阪、2014年10月31日。
17. Atsushi Nemoto, Takeshi Inukai, Satoshi Saida, Itaru Kato, Toshio Heike, Tatsutoshi, Nakahata, **Jiro Kikuchi**, Yusuke Furukawa, Seiichi Okabe, Yuko Sato, Yasuhiro Maeda, Kumiko Goi, Hiroko Honna-Ooshiro, Atsushi Watanabe, Shinpei Somazu, Keiko Kagami, and Kanji Sugita. Mechanisms of CDK4/6 inhibitor hypersensitivity in Ph⁺ lymphoid leukemia.
第76回日本血液学会学術集会、大阪、2014年10月31日。
18. Yusuke Furukawa, Nobuya Hiraoka, **Jiro Kikuchi**, Takahiro Yamauchi, Daisuke Koyama, Taeko Wada, Shigehisa Mori, Yuichi Nakamura, Takanori Ueda, and Yasuhiko Kano. Purine analog-like properties of bendamustine underlie its unique anti-tumor activity.
第76回日本血液学会学術集会、大阪、2014年10月31日。
19. **Jiro Kikuchi** and Yusuke Furukawa. Phosphorylation-mediated EZH2 Inactivation as a Principal Mechanism of Drug Resistance in Multiple Myeloma.
第10回日光国際シンポジウム、栃木、2014年10月30日。
20. **菊池次郎**、小山大輔、向井陽美、古川雄祐。多発性骨髄腫細胞に対するフィブロネクチン及び骨髄間質細胞との接着下におけるボルテゾミブ併用効果。
第39回日本骨髄腫学会学術集会、掛川、2014年5月17日。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページにて研究成果を発信した。

(1)自治医科大学ホームページ「難治性白血病に対する新規治療薬を発見しました」

<http://www.jichi.ac.jp/news/research/2014/20140409.html>

(2)自治医科大学ホームページ「白血病発症の初期に関与する新たな遺伝子異常を発見」

<http://www.jichi.ac.jp/news/research/2015/20150619.html>

(3)自治医科大学ホームページ「多発性骨髄腫の抗がん剤耐性に関する新たなメカニズムの発見」

http://www.jichi.ac.jp/news/research/2015/20151027_01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 次郎 (KIKUCHI Jiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：6037103