

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09456

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫のゲノムメチル化からアプローチする悪性化機構と新規治療標的

研究課題名(英文) Genome methylation approach to search mechanisms of malignancy and new therapeutic targets in multiple myeloma

研究代表者

石田 禎夫 (ISHIDA, Tadao)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20305220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御機構の異常が、がんの発生や進展に重要であることが明らかとなり、近年ではエピジェネティック修飾を標的とする阻害剤も臨床応用されはじめている。そこで本研究では多発性骨髄腫(MM)に有効なヒストンメチル化阻害剤を探索し臨床への応用を目指した。その結果、薬剤感受性試験において、H3K79メチル化酵素のDOT1Lに対する阻害剤が、MMの細胞増殖を最も強く抑制することを同定し、新規治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylations and histone modifications are deeply involved in oncogenesis and inhibitors which target epigenetic modifications are used for cancer therapies. In this study, we aimed to clarify the histone methylation inhibitors which suppressed the survival of multiple myeloma (MM). As a result, we found that DOT1L inhibitors strongly repressed the proliferation of MM. Our results suggest DOT1L could be a therapeutic target in MM.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 エピジェネティクス

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30年 5月 18日現在

機関番号 : 20101
研究種目 : 基盤研究 (C)
研究期間 : 2015~2017
課題番号 : 15K09456
研究課題名 (和文) 多発性骨髄腫のゲノムメチル化からアプローチする悪性化機構と新規治療標的
研究課題名 (英文) Genome methylation approach to search mechanisms of malignancy and new therapeutic targets in multiple myeloma
研究代表者
石田 禎夫 (ISHIDA, Tadao)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号 : 20305220
交付決定額 (研究期間全体) (直接経費) : 3,700,000 円

研究成果の概要 (和文) :

これまでの研究から、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御機構の異常が、がんの発生や進展に重要であることが明らかとなり、近年ではエピジェネティック修飾を標的とする阻害剤も臨床応用されはじめている。そこで本研究では多発性骨髄腫 (MM) に有効なヒストンメチル化阻害剤を探索し臨床への応用を目指した。その結果、薬剤感受性試験において、H3K79 メチル化酵素の DOT1L に対する阻害剤が、MM の細胞増殖を最も強く抑制することを同定し、新規治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

DNA methylations and histone modifications are deeply involved in oncogenesis and inhibitors which target epigenetic modifications are used for cancer therapies. In this study, we aimed to clarify the histone methylation inhibitors which suppressed the survival of multiple myeloma (MM). As a result, we found that DOT1L inhibitors strongly repressed the proliferation of MM. Our results suggest DOT1L could be a therapeutic target in MM.

研究分野 :
血液内科学

キーワード :
多発性骨髄腫、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) は形質細胞腫瘍のひとつであり、プロテアソーム阻害薬や免疫調整薬 (IMiDs) など新規薬剤の登場にも関わらず、生存期間中央値は 2~10 年といまだに予後不良な血液疾患である。

近年、ヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな制御機構の異常ががんの発生や進展に重要であることが明らかとなり、それらは可逆的な変化であることから、有望な治療標的として期待されている。

ヒストン脱アセチル化阻害剤のパノピノスタットは多発性骨髄腫の治療に使用されているが、プロテアソーム阻害薬との併用にも関わらず、CR/nearCR 達成率は 27.6%と十分な治療成績とは言えない。

従ってヒストンアセチル化以外の新規治療標的となり得るエピジェネティクス修飾の探索が望まれている。

ヒストンメチル化はエピジェネティックな転写制御において中心的な役割を担い、様々ながんにおいてその異常が報告されているが、MM における知見はいまだ十分ではない。

MM ではこれまでに、ヒストン H3 リジン 27 (H3K27) メチル化酵素である EZH2 についての研究報告が散見されるが、それ以外のヒストンメチル化修飾に関する報告はごくわずかである¹⁾。

2. 研究の目的

本研究は MM の発生や進展にヒストンメチル化は関与するか、そしてヒストンメチル化は MM の治療標的たり得るかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

薬剤処理と Cell viability assay

MM 細胞株 (RPMI-8226, MM. 1S, KMS-5, KMS-12BM, KMS-12PE, U-266) を以下のヒストンメチル化修飾酵素に対する阻害剤で処理し、細胞増殖に与える影響を cell viability アッセイによって解析した。(ヒストン H3 リジン 4 (H3K4) メチル化酵素 LSD1 阻害剤、H3K9 メチル化酵素 G9a 阻害剤、H3K27 メチル化酵素 EZH2 阻害剤、H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3 阻害剤、H3K79 メチル化酵素 DOT1L 阻害剤。)

DOT1L の解析については、2 種類の阻害剤を使用し、解析対象に MM 臨床例から採取した CD138 陽性細胞を加えた。

マウス xenograft モデル

RPMI-8226 細胞を ex vivo で 1 μ M の DOT1L 阻害剤で 3 日間処理し、6 週の C. B-17 SCID マウスの大腿に皮下注射し、造腫瘍能を評価した。コントロールには DMSO で処理した細胞株

を用いた。

フローサイトメトリー解析

RPMI-8226 細胞、MM. 1S 細胞を 1 μ M の DOT1L 阻害剤で 6 日間処理し、細胞周期解析のために PI 染色、アポトーシス解析のために Annexin V / PI 染色を施行した。コントロールには DMSO で処理した細胞株を用いた。

マイクロアレイ解析

RPMI-8226 細胞、MM. 1S 細胞を 1 μ M の DOT1L 阻害剤で 6 日間処理、遺伝子発現を SurePrint G3 Human GE マイクロアレイにより解析した。アレイデータは Gene Spring GX ソフトウェアで解析し、Gene Ontology 解析、パスウェイ解析を行った。コントロールには DMSO で処理した細胞株を用いた。またアレイ結果を定量 RT-PCR 法、western blot 法で検証した。

クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)

RPMI-8226, MM. 1S を 3 日間、1 μ M の DOT1L 阻害剤で処理し、H3K79me2 抗体を用いて、免疫沈降を行った。コントロールには DMSO で処理した細胞株を用いた。精製した DNA を Ion Proton システムでシーケンスし、MACS2.0 ソフトウェアで H3K79 メチル化領域を抽出した。

臨床検体における発現解析

Gene Expression Omnibus で公開された、MM の臨床検体のマイクロアレイデータセット (GSE5900・GSE6477) を用いて、正常細胞・腫瘍細胞における遺伝子発現を t 検定により比較した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

ヒストン修飾酵素阻害剤の MM 細胞増殖抑制効果

MM 細胞株に対するヒストンメチル化修飾酵素阻害剤の抗腫瘍効果のスクリーニングを行った結果、G9a、EZH2、JMJD3、DOT1L に対する阻害剤が MM 細胞株の増殖を抑制した。

一方、LSD1 阻害剤に抗腫瘍効果は認められなかった。

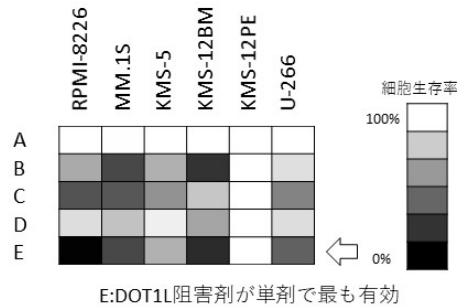
これらの中で、最も高い増殖抑制効果を示したのは DOT1L 阻害剤であった。

次に MM 臨床検体のマイクロアレイデータセットを用いて DOT1L の発現を解析したところ、正常形質細胞と比較して、MGUS・くすぶり型 MM では DOT1L 発現の上昇が認められ、DOT1L が MM の発生に関与している可能性が考えられた。

本研究で使用したヒストンメチル化修飾酵素阻害剤

ヒストン修飾酵素	働き	阻害剤
H3K4脱メチル化酵素(LSD1)	転写抑制	A:LSD1阻害剤
H3K9メチル化酵素(G9a)	転写抑制	B:G9a阻害剤
H3K27メチル化酵素(EZH2)	転写抑制	C:EZH2阻害剤
H3K27脱メチル化酵素(JMJD3)	転写活性化	D:JMJD3阻害剤
H3K79メチル化酵素(DOT1L)	転写活性化	E:DOT1L阻害剤

ヒストンメチル化修飾酵素阻害剤の抗腫瘍効果のスクリーニング



DOT1L 阻害剤による抗腫瘍効果の解析

上記の結果から DOT1L を対象としてさらに研究を進めた。

2 種類の DOT1L 阻害剤による MM 細胞株の増殖抑制ならびに、in vivo での腫瘍形成抑制効果を明らかにした。

さらに MM 臨床例より採取した CD138 陽性細胞に対する増殖抑制効果を確認した。

また DOT1L 阻害剤が、MM 細胞株の細胞周期停止およびアポトーシスを誘導することをフローサイトメトリー解析により明らかにした。

DOT1L 阻害剤による遺伝子発現変動

H3K79 メチル化は転写活性化標識として知られている。

我々は DOT1L が MM 細胞において重要な遺伝子の H3K79 メチル化を制御することで転写活性化を誘導しているという仮説を立てた。

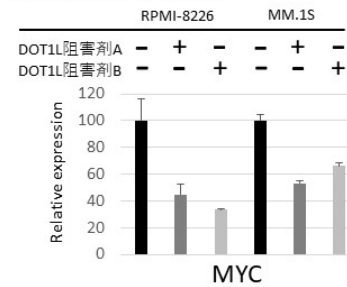
そこで我々は DOT1L 阻害剤が、MM 細胞株の H3K79 メチル化と遺伝子発現に与える影響を、ChIP-seq とマイクロアレイにより網羅的に解析した。

これらのデータを統合し、DOT1L 阻害剤処理によって H3K79 メチル化が減少し、かつ発現が低下した遺伝子を抽出した結果、MYC、IRF4 など一連の IRF4-MYC シグナルの遺伝子を見いだした。

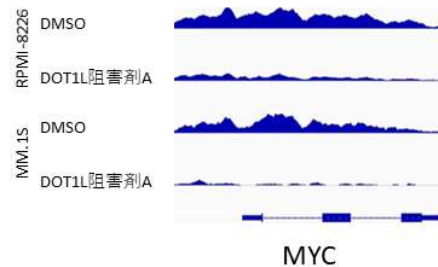
これらの結果を定量 RT-PCR 法、western blot 法で再確認した。

MM 細胞の生存は IRF4-MYC シグナルに強く依存していることが知られており、これらの発現抑制が抗腫瘍効果メカニズムの一つと考えられた。

定量RT-PCRでDOT1L阻害剤によるMYCの発現低下を確認



ChIP-seqでMYCのH3K79me2減少を確認



考察 (得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望)

本研究結果は、複数のヒストン修飾酵素が MM の治療標的候補となりうることを示した。これまでの研究から、EZH2 の阻害による MM 細胞の増殖抑制が報告されていたが、DOT1L が MM の治療標的となりうることを示したのは本研究が初である。

DOT1L は H3K79 をメチル化する唯一の酵素であり、MLL 関連白血病、DOT1L を高発現する肺がん・乳がん、MYCN 遺伝子の増幅を伴う神経芽細胞腫などで有望な治療標的となりうることを報告されている²⁾。

我々は DOT1L 阻害剤が MM 細胞の IRF4-MYC シグナルを抑制することを明らかにした。

MM 細胞の生存は IRF4-MYC に強く依存しており、さらに IRF4 と MYC はポジティブフィードバックで互いに発現調節している。DOT1L 阻害によるこれらの発現抑制が抗腫瘍効果につながったと考えられた。

本研究は、ヒストンメチル化酵素 DOT1L が MM の発生メカニズムに関わる可能性を示した。さらに DOT1L が MM の新たな治療標的となり得ることを明らかにした。

現在この研究成果を英文誌に投稿中である。今後の展望としては、DOT1L 阻害剤を Xenograft マウスに直接投与することにより、抗腫瘍効果を評価する。それが有効であれば、DOT1L 阻害剤の臨床応用に向けての第 1 相臨床研究など、さらに研究を進めていきたい。

参考文献

1: Dimopoulos K, Gimsing P, Gronbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. Blood Cancer J. 2014;4:e207.

2: Wong M, Tee AEL, Milazzo G et al. The Histone Methyltransferase DOT1L Promotes Neuroblastoma by Regulating Gene Transcription. Cancer Res. 2017;77(9):2522-2533.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

1: 石黒一也、ヒストンメチル化酵素 DOT1L は多発性骨髄腫の治療標的となりうる、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月29日、神奈川県横浜市

2: Kazuya Ishiguro、The histone methyltransferase DOT1L is a potential therapeutic target in multiple myeloma、Targeting DNA Methylation and Chromatin for Cancer Therapy、2018年3月2日、アトランタ (アメリカ)

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 禎夫 (ISHIDA, Tadao)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：20305220

(2) 研究分担者

池田 博 (IKEDA, Hiroshi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：60570132

石黒 一也 (ISHIGURO, Kazuya)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：90784439

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし