

令和元年6月4日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09839

研究課題名(和文) エピジェネティクスから迫る多発性骨髄腫の発症機構の解明と薬剤耐性化の克服

研究課題名(英文) Epigenetic pathogenesis of multiple myeloma related to drug resistance

研究代表者

三村 尚也 (Naoya, Mimura)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00422220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は難治性の血液腫瘍であり、新たな治療戦略が求められている。本研究においては、ヒストンH3リジン27番のトリメチル化(H3K27me3)の誘導酵素であるEZH2とEZH1の共阻害剤UNC1999の抗骨髄腫効果と、プロテアソーム阻害剤との併用療法の分子メカニズムを明らかにした。また、EZH2の過剰発現が骨髄腫細胞の薬剤耐性化に関与していることを示した。更に、成熟B細胞にてH3K27me3の脱メチル化酵素UTXの欠損とBRAF活性化変異が起きるコンパウンドマウスを作製し、一定数が髄外病変を伴う多発性骨髄腫を発症することを見出した。発症機構の解明と治療モデルとしての確立を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は、いまだ治療できない難治性悪性腫瘍であり、新たなアプローチを介した治療法の開発が待たれている。本研究により、EZH2/EZH1共阻害剤が新たな治療選択肢となるための分子基盤が示された。またプロテアソーム阻害剤は現在骨髄腫の第一選択薬として広く用いられているが、不応例や、長期投与による耐性化や有害事象が問題となっている。EZH2/EZH1共阻害剤との併用により、骨髄腫患者の予後向上に寄与できると期待される。更に、ヒト多発性骨髄腫の病態を模倣した骨髄腫モデルマウスの開発により、骨髄腫の分子病態メカニズムの解明や新規治療薬の創出に大いに貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have shown that a dual EZH2/EZH1 inhibitor UNC1999 is effective alone and in combination with proteasome inhibitors in our preclinical multiple myeloma (MM) models. We have also shown that EZH2 overexpression is related to drug resistance in MM. Moreover, we have created a conditional mouse model of post-germinal center malignancies with a concurrent Utx loss and Braf V600E mutation. A significant number of compound mice developed plasma cell neoplasms with extramedullary disease. Our mouse model could be a useful tool for understanding the role of epigenetic dysfunction in MM and studying novel therapeutic agents.

研究分野：血液内科学、腫瘍内科学

キーワード：多発性骨髄腫 ヒストンメチル化異常 EZH2/EZH1共阻害剤 プロテアソーム阻害剤 骨髄腫モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は癌化した形質細胞の増殖により骨破壊を来す血液悪性疾患であるが、社会の高齢化に伴い患者の増加が注目されている。新規治療薬であるボルテゾミブ、サリドマイド、レナリドミドの登場により多発性骨髄腫患者の予後は改善しつつあるが、薬剤耐性化により依然として治療困難であり、新たな治療戦略が求められている(Laubach et al. Annu Rev Med. 2011, Palumbo et al. N Engl J Med. 2011)。申請者はこれまでに、多発性骨髄腫の新規分子標的療法の研究を行ってきた。小胞体ストレス応答における IRE1 α -XBP1 経路を阻害する新規低分子化合物 MKC-3946 がプロテアソーム阻害剤や HSP90 阻害剤との併用療法により、骨髄腫細胞に致死的小胞体ストレスを増強して細胞死に導くことを *in vitro* または *in vivo* の骨髄腫モデルで証明した (Mimura et al. Blood. 2012)。また、新規選択的 Akt 阻害剤である TAS-117 が *in vitro* または *in vivo* で強力な抗骨髄腫効果を示すことを明らかにした (Mimura et al. Cancer Res. 2014)。これらの研究成果を踏まえて、骨髄腫の新規治療標的に関する総説を最近発表し (Mimura et al. Exp. Hematol. 2015)、この分野の研究を更に発展させつつある。近年、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に加え、エピジェネティック異常ががんの発生や進展に重要な役割を果たしている事が明らかになりつつある。多発性骨髄腫においても、DNA メチル化異常 (Walker et al. Blood. 2011) や、t(4;14)転座により誘導される MMSET によるヒストンメチル化異常 (Marango et al. Blood. 2008)、ヒストン脱メチル化酵素 UTX の変異 (Haaften et al. Nat Genet. 2009) などが報告され、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤は抗骨髄腫薬として使用可能となった。

申請者は、これら骨髄腫におけるエピジェネティック異常の中でも、ヒストン H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) の異常に着目し研究を進めている。ポリコーム群複合体は PRC1 と PRC2 に大別され、H3K27me3 のメチル化転移酵素である EZH2 は、EED、SUZ12 と共に PRC2 complex を形成して機能する。EZH2 のホモログである EZH1 が EZH2 の機能を補完している事も知られている。骨髄腫細胞では EZH2、EED、SUZ12 の遺伝子がいずれも高発現している事 (Kalushkova et al. Plos One. 2010) や、前述の H3K27me3 の脱メチル化酵素 UTX の不活性型変異が骨髄腫患者の 10%に報告されている事などから、H3K27me3 の亢進が骨髄腫の発症または進展に関わっている可能性が示唆される。しかし、骨髄腫細胞における H3K27me3 の標的遺伝子を詳細に解析した報告は無く、EZH2/UTX の骨髄腫における生物学的意義ははまだ明らかにはなっていない。

申請者はこれまで、EZH2/EZH1 阻害剤 (dual inhibitor) である UNC1999 の抗骨髄腫効果を明らかにしてきた。UNC1999 は骨髄腫細胞株の H3K27me3 レベルの低下を伴って、細胞増殖を時間・濃度依存的に抑制した (2014 年アメリカ血液学会発表)。また UNC1999 とプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブとの併用療法が *in vitro* にて相乗効果を示す事、更には免疫不全マウスにヒト骨髄腫細胞株を皮下移植した xenograft モデルにおいて、UNC1999 はボルテゾミブとの併用療法で有意な腫瘍増殖抑制効果を示す事を見出した (2015 年日本骨髄腫学会発表・日本血液学会で発表)。

これらの知見から、EZH2/EZH1 阻害が骨髄腫の新たな治療戦略になりうる事、更にプロテアソーム阻害剤との相乗的な併用効果により、現在臨床で問題になっているボルテゾミブ耐性化を解除できる可能性が示唆された。更に我々は、ボルテゾミブに限らずあらゆるプロテアソーム阻害剤が EZH2 を転写レベルで著明に抑制する事を見出しており、プロテアソーム阻害剤の新たな抗骨髄腫機構として注目している。

また我々は、骨髄腫患者にて不活性型変異のある H3K27me3 の脱メチル化酵素 UTX のコンディショナルノックアウトマウスを広島大学との共同研究で入手し、活性型 BRAF 変異のコンディショナルノックアウトマウスと交配する事で、形質細胞腫瘍を発症する可能性のある事を見出した。このマウスを詳細に解析する事で、エピジェネティックな骨髄腫の発症機構を解明できる可能性があると期待される。

2. 研究の目的 (申請時)

上記の背景と申請者の知見を元に、本研究においては、H3K27me3 の制御異常が骨髄腫の発症や薬剤耐性に与える影響を明らかにする事を目的とする。そのために H3K27 脱メチル化酵素 UTX のコンディショナルノックアウトマウスと BRAF 変異マウスとのコンパウンドマウスの解析を行う。更に、H3K27me3 メチル化酵素であるポリコーム群遺伝子 EZH2 およびそのホモログ EZH1 の骨髄腫細胞における生物学的意義を詳細に解析し、特にプロテアソーム阻害剤との併用療法における抗骨髄腫効果の分子メカニズムを明らかにし、薬剤耐性の克服に向けた分子基盤構築を目指す。研究期間内に以下の点を明らかにする。

- (1) UTX ノックアウトマウス、BRAF 活性型変異マウスのコンパウンドマウスの解析を行い、形質細胞腫瘍の発症機構を解明する。
- (2) 上記マウスを用いて、EZH2 阻害剤やボルテゾミブとの併用療法を行い、臨床応用に向けた前臨床的検討を行う。
- (3) EZH2/EZH1 阻害剤である UNC1999 の骨髄腫細胞における標的遺伝子を、ChIP シークエンスと RNA シークエンスを用いて明らかにする。
- (4) ボルテゾミブによる EZH2 発現調節機構を詳細に明らかにする。
- (5) UNC1999 とボルテゾミブの併用療法の分子メカニズムを、特に UNC1999 による EZH1

阻害作用に着目して明らかにする。

(6) 実際の臨床における EZH2 および EZH1 のボルテゾミブ耐性化への関与を、患者サンプルを用いて解析する。UNC1999 による EZH2/EZH1 阻害作用によるボルテゾミブ耐性化の解除機構を、ボルテゾミブ耐性の骨髓腫細胞や EZH2 過剰発現細胞などを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

・ UTX コンディショナルノックアウトと BRAF 変異のコンパウンドマウスの解析

UTX^{fl/fl} マウス(広島大より提供)と Cy1-Cre マウス(熊本大より提供)の交配により、UTX を形質細胞でのみ欠損させたマウスを作製した(Cy1-Cre; UTX^{fl/fl})。また、骨髓腫患者の一部に活性型変異を認め病勢との関連が報告されている BRAF V600E mutation (Andrulis et al. Cancer Discov. 2013) を持つマウス (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center より提供) も入手し、両者の変異を持つコンパウンドマウスも作製した (Cy1-Cre; UTX^{fl/fl} + BRAFV600E)。我々はコンパウンドマウスの一部が貧血を発症し、骨髓・脾臓・肝臓などに著明な形質細胞 (CD138+) の浸潤を認める事を見出した。これらがモノクローナルな腫瘍性の形質細胞であるか、細胞表面形質、M 蛋白解析、IgH 遺伝子再構成解析などで明らかにし、また腫瘍細胞の *in vitro* での培養や免疫不全マウスへの 2 次移植を行う。更に腫瘍細胞の RNA シークエンスや ChIP シークエンスなどの網羅的遺伝子解析により、その発症機構を明らかにする。

・ 形質細胞腫瘍マウスに対する UNC1999 とボルテゾミブの併用療法

形質細胞腫瘍マウスに対して、EZH2/EZH1 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用療法の治療効果を検証する (現在進行中)。

・ UNC1999 の骨髓腫細胞における標的遺伝子の探索

EZH2/EZH1 阻害剤である UNC1999 を *in vitro* で骨髓腫細胞株に作用させ、発現変化する遺伝子を RNA シークエンスで解析すると同時に、ChIP シークエンスでヒストンメチル化の網羅的解析を行い、UNC1999 の骨髓腫細胞における標的遺伝子を明らかにする。

・ プロテアソーム阻害剤による EZH2 発現調節機構の解析

ボルテゾミブは骨髓腫細胞における EZH2 を減少させる事が報告されているが (Nara M, et al. Plos One. 2013)、興味深いことに、我々はボルテゾミブのみならずあらゆるプロテアソーム阻害剤が EZH2 の mRNA と蛋白レベルを有意に低下させる事を見出した。この知見は、EZH2 阻害剤によって骨髓腫がよりプロテアソーム阻害による EZH2 低下に反応しやすい状態にプライミングされていることを示唆しているものと考えられ、併用療法の有効性の分子基盤の一つと考えられる。この機構を明らかにするため、プロテアソーム阻害によって制御されるどのようなシグナル経路が EZH2 遺伝子の転写抑制に関わるのかを検証する。

・ UNC1999 とボルテゾミブの併用療法の分子メカニズム解析

前述のようにボルテゾミブは骨髓腫細胞の EZH2 を低下させるものの、そのホモログである EZH1 は残存する。EZH1 の残存機能について細胞株を用いて検証する。

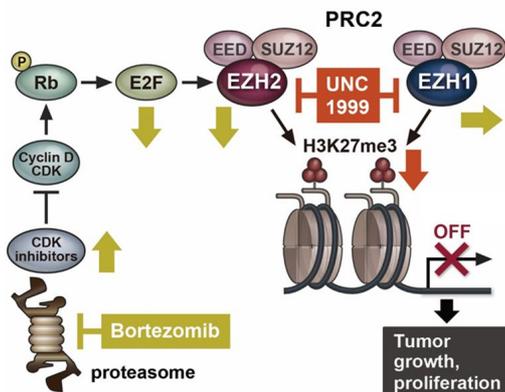
・ ボルテゾミブ耐性化における EZH2 の関与の検証と UNC1999 による耐性解除

EZH2 をレトロウイルスによって過剰発現させた骨髓腫細胞株を用いて、ボルテゾミブ耐性化を来すかを検証し、その分子メカニズムを解析する。また UNC1999 によって耐性化が解除されるかを明らかにする。

4. 研究成果

UNC1999 単剤あるいはプロテアソーム阻害剤との併用療法の分子メカニズム

まず我々は、EZH2/EZH1 共阻害剤である UNC1999 の骨髓腫細胞における標的遺伝子を同定した。ChIP シークエンスと RNA シークエンスによる網羅的遺伝子解析により、UNC1999 の骨髓腫細胞における標的遺伝子 (UNC1999 治療により H3K27me3 が抑制され、かつ発現が有意に上昇する遺伝子) を抽出し、その中でもがん抑制遺伝子 NR4A1 に着目した。NR4A1 を骨髓腫細胞株に強制発現すると、下流分子である Myc の発現低下を伴って細胞増殖が抑制された。UNC1999 治療によって NR4A1 の発現上昇と Myc の低下が認められ、この Myc の抑制効果はボルテゾミブとの併用療法でより強調された。我々は、ボルテゾミブが p21 や p27 などの CDK インヒビターのプロテアソームでの分解を阻害することで、その下流にある RB-E2F 経路を抑制し、転写因子 E2F の EZH2 プロモーターへの結合を阻害するため、EZH2 の転写抑制を来すことを明らかにした。しかしながらボルテゾミブ治療によって EZH2 発現が低下するにも関わらず、そのホモログである EZH1 レベルが保たれているため、H3K27me3 の抑制を来すことはなく、PRC2 の標的遺伝子群の発現上昇は認められなかった。UNC1999 は EZH2 と EZH1 の共阻害剤であるが、我々は



EZH2 単独阻害剤よりも EZH2/EZH1 共阻害剤の方がよりボルテゾミブとの併用効果が高いことを示し、ボルテゾミブ投与によって残存する EZH1 の機能を抑制することが良好な相乗効果に重要であることを示した (右シェーマ)。以上の結果より、EZH2/EZH1 共阻害薬は骨髄腫治療の新たな治療戦略になりうると考えられ、特にプロテアソーム阻害剤との併用療法が有望であることが示された (Rizq and Mimura, et al. Clin Cancer Res. 2017)。

EZH2 過剰発現によるボルテゾミブ耐性化

我々は、APEX 039 臨床試験 (Mulligan, et al. Blood 2007) のデータから、EZH2 高発現の骨髄腫症例がボルテゾミブへの反応が不良であることを見出した。実際に、EZH2 を骨髄腫細胞株に過剰発現させるとボルテゾミブ耐性化を来し、UNC1999 との併用療法でこの耐性化を解除出来ることを示した。このことは臨床で問題となるプロテアソーム阻害剤耐性化に EZH2 が関与していること、そして EZH2/EZH1 共阻害剤がこの耐性化を克服できる可能性を示している (Rizq and Mimura, et al. Clin Cancer Res. 2017)。

UTX コンディショナルノックアウトと BRAF 変異のコンパウンドマウスの解析

我々は、胚中心 B 細胞特異的に活性化する *Cy1-Cre* マウスを用いて *Utx* のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、さらに *Braf V600E* 変異のコンディショナルノックインマウスとのコンパウンドマウスを作製した。マウスに免疫刺激を行うことで胚中心形成が活性化されて、IgG クラススイッチ以降の成熟 B 細胞のみに *Cre* が発現してリコンビナントが起こる。つまり、このコンパウンドマウスにおいては、胚中心以降の成熟 B 細胞のみで *Utx* が欠損かつ活性型 *Braf-V600E* 変異が生じることとなる。*Utx* は X 染色体上に存在するため、コンパウンドマウスの遺伝子型は *Utx* /Y *Braf V600E* (♂), *Utx* /+ *Braf V600E* (♀), *Utx* /- *Braf V600E* (♀) のいずれかとなる。このコンパウンドマウスは B 細胞性リンパ腫、リンパ増殖性疾患、そして多発性骨髄腫を発症し、野生型あるいはそれぞれの単独変異マウスと比較して有意に生存率が低下した。特に、一定数の *Utx* /Y *Braf V600E* マウス (♂) と、一部の *Utx* /+ *Braf V600E* (♀) や *Utx* /- *Braf V600E* (♀) マウスにおいては、形質細胞の著明な増生が骨髄・脾臓・リンパ節などに認められ、髄外病変を伴う多発性骨髄腫を発症して死亡した。マウス骨髄腫細胞の一部は *in vitro* で培養可能であり、更に NOG マウスへの 2 次移植によって骨髄腫様の病態を来した。腫瘍細胞の RNA シークエンスから gene set enrichment analysis を行うと MYC の標的遺伝子群が enrich しており、骨髄腫発症の一因であると考えられた (Rizq and Mimura, et al. ASH annual meeting 2018 にて口頭発表)。詳細なエピジェネティック解析による骨髄腫発症メカニズムの解明と、治療モデルとしての確立を目指して、研究は現在も進行中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) 全て査読あり

1 . [Mimura N](#). Novel therapeutic approaches to achieve the cure of multiple myeloma. Chiba Medical J. 2017; 93E:17-23.

2 . Rizq O, [Mimura N](#), Oshima M, Saraya A, Koide S, Kato Y, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Ma A, Jin J, Iseki T, Nakaseko C, Iwama A. Dual Inhibition of EZH2 and EZH1 Sensitizes PRC2-Dependent Tumors to Proteasome Inhibition. Clin Cancer Res. 2017 Aug 15;23(16):4817-4830. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2735.

[学会発表] (計 1 1 件)

1 . Ola Rizq, [Naoya Mimura](#), Motohiko Oshima, Shuji Momose, Yaeko Nakajima-Takagi, Kazumasa Aoyama, Atsunori Saraya, Tohru Iseki, Emiko Sakaida, Chiaki Nakaseko, Yutaka Okuno, Hiroaki Honda, Jun-ichi Tamaru and Atsushi Iwama. *Utx* Insufficiency Cooperates with *Braf V600E* in the Induction of Myeloma in Mice. The 60th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2018/12/1-4, San Diego, CA, USA.

2 . Ola Rizq, [Naoya Mimura](#), Motohiko Oshima, Shuji Momose, Yaeko Nakajima-Takagi, Kazumasa Aoyama, Atsunori Saraya, Tohru Iseki, Emiko Sakaida, Chiaki Nakaseko, Yutaka Okuno, Hiroaki Honda, Jun-ichi Tamaru, and Atsushi Iwama. Loss of *Utx* with *BrafV600E* induces mature B-cell tumorigenesis in a conditional mouse model. 第 80 回日本血液学会総会, 2018/10/12-14, 大阪市.

3 . Ola Rizq, [Naoya Mimura](#), Motohiko Oshima, Syuji Momose, Yaeko Nakajima-Takagi, Kazumasa Aoyama, Atsunori Saraya, Tohru Iseki, Emiko Sakaida, Chiaki Nakaseko, Yutaka Okuno, Hiroaki Honda, Jun-ichi Tamaru, and Atsushi Iwama. Loss of *Utx* Cooperates with *Braf V600E* Mutation to Induce Post-Germinal Center B-cell Disorders in

Mice. The 9th JSH international symposium 2018 in Kyoto, 2018/7/27-28, Kyoto, Japan.

4. 三村尚也. 骨髄腫における治療標的としてのエピゲノム異常 Epigenetic aberrations as therapeutic targets in multiple myeloma 第 58 回日本リンパ網内系学会総会(シンポジウム). 2018/6/30. 名古屋市.

5. リズクオラ, 三村尚也, 井関徹, 堺田恵美子, 中世古知昭, 岩間厚志. 新規骨髄腫マウスモデルの作成. 第 43 回日本骨髄腫学会学術集会, 2018/5/12-13, 千葉市.

6. 三村尚也. 骨髄腫細胞におけるプロテアソーム阻害と EZH2/1 共阻害剤の相乗効果の分子メカニズム. 第 42 回日本骨髄腫学会学術集会, 2017/5/27-28, 東京.

7. Ola Rizq, Naoya Mimura, Motohiko Oshima, Atsunori Saraya, Shuhei Koide, Yuko Kato, Kazumasa Aoyama, Yaeko Nakajima-Takagi, Changshan Wang, Anqi Ma, Jian Jin, Tohru Iseki, Chiaki Nakaseko, and Atsushi Iwama. Molecular mechanism behind the synergistic activity of proteasome inhibition and PRC2 inhibition in the treatment of multiple myeloma. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2016/12/3-6, San Diego, CA, USA.

8. Ola Rizq, 三村尚也, 大島基彦, 更屋敦則, 小出周平, 加藤裕子, 青山和正, 井関徹, 中世古知昭, 岩間厚志. Combined inhibition of PRC2 and proteasome as a potential therapy for multiple myeloma. 第 78 回日本血液学会総会, 2016/10/13-15, 横浜市.

9. Ola Rizq, Naoya Mimura, Motohiko Oshima, Atsunori Saraya, Shuhei Koide, Yuko Kato, Kazumasa Aoyama, Changshan Wang, Tetsuhiro Chiba, Tohru Iseki, Chiaki Nakaseko, and Atsushi Iwama. PRC2 Inhibition Sensitizes Myeloma Cells to Proteasome Inhibitor. The 5th Japanese Cancer Association (JCA) - American Association for Cancer Research (AACR) Special Joint Conference, 2016/7/13-15, Urayasu, Chiba, Japan.

10. 三村尚也. 多発性骨髄腫に対する新規エピジェネティック治療. 第 41 回日本骨髄腫学会学術集会(シンポジウム), 2016/5/28-29, 徳島市.

11. Ola Rizq, 三村尚也, 井関徹, 中世古知昭, 岩間厚志. EZH2・EZH1 阻害剤は骨髄腫細胞のボルテゾミブ感受性を増強する. 第 41 回日本骨髄腫学会学術集会, 2016/5/28-29, 徳島市.

[図書](計4件).

1. 三村尚也(分担著者). 科学評論社. 血液内科 2019 年 1 月特集「多発性骨髄腫の分子病態解明の進歩と新たな治療展開」. 2019 年.

2. 三村尚也(分担著者). 日本臨牀社. 日本臨牀 2018 年 7 月特集「多発性骨髄腫-基礎・臨床研究の最新動向」. 2018 年.

3. 三村尚也(分担著者). 医薬ジャーナル社. 多発性骨髄腫 Updating 第 10 巻. 2016 年.

4. 三村尚也, 岩間厚志(分担著者). 日本臨牀社. 多発性骨髄腫学-最新の診療と基礎研究-. 2016 年.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岩間 厚志 ローマ字氏名：Atsuh Iwama
所属研究機関名：東京大学 部局名：医科学研究所
職名：教授 研究者番号（8桁）：70244126

研究協力者氏名：中世古 知昭 ローマ字氏名：Chiaki Nakaseko
所属研究機関名：千葉大学 部局名：大学院医学研究院
職名：特任教授 研究者番号（8桁）：30323398

研究協力者氏名：井関 徹 ローマ字氏名：Tohru Iseki
所属研究機関名：千葉大学 部局名：医学部附属病院
職名：講師 研究者番号（8桁）：10232365

研究協力者氏名：大島 基彦 ローマ字氏名：Motohiko Oshima
所属研究機関名：東京大学 部局名：医科学研究所
職名：助教 研究者番号（8桁）：70506287

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。