

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19059

研究課題名(和文) 難治性多発性骨髄腫に対する新規治療標的分子の探索および機序の解明

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic target molecules and the molecular mechanism for refractory multiple myeloma

研究代表者

市川 大樹 (ICHIKAWA, Daiju)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：60462793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では多発性骨髄腫におけるレナリドミド感受性株及び抵抗性株についてDNA microarray より遺伝子発現量の差異をGSEA, クラスターリング解析を行った。その結果、それぞれレナリドミド処理のみでエンリッチされたものはP53 PATHWAY 群のみ、レナリドミド感受性株で刺激依存的に減少するものとして50 spots、刺激依存的に上昇するものとして132 spots が得られた。そのうちタンパク質発現について同様の変動があったものとしてBNIP3, DCAF4L2, STAP2 が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the mechanism of IMiDs resistance in MM. We examined gene profiles in lenalidomide-sensitive and -resistant cell lines with or without lenalidomide using DNA microarray following GSEA and cluster analyses. In GSEA, P53 PATHWAY gene group is enriched in lenalidomide-treated sensitive MM cells as compared to resistant cell line. In cluster analyses, 50 spots were down-regulated and 132 spots were upregulated under lenalidomide-treated sensitive MM cells. In those genes, BNIP3, DCAF4L2, and STAP2 proteins are concordantly increased. We next attempted knockdown of BNIP3, DCAF4L2, and STAP2 in lenalidomide-sensitive cells using retroviral delivery of shRNA against human those genes. However those genes knockdown did not rescue lenalidomide-induced cell. We need to reveal that P53 PATHWAY gene group and another up- or down-regulated genes in cluster analyses regulated the sensitivity of MM cells to IMiDs in the future.

研究分野：がん免疫

キーワード：多発性骨髄腫 IMiDs

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(MM)は、モノクローナルな免疫グロブリン(M 蛋白)の存在と溶骨性変化や腎障害などの臨床症状を特徴とした、B 細胞の最終分化段階である形質細胞の腫瘍性疾患である。MM は、造血障害、M 蛋白沈着による臓器障害、骨融解病変、高カルシウム血症、貧血、易感染症など様々な症状を呈する。

これまでに、多発性骨髄腫に対する化学療法としてメルファランとプレドニゾロンの併用療法(MP 療法)、アルキル化剤を中心とした多剤併用療法、メルファラン大量化学療法の有用性が報告されているが治癒に至るまでにはほど遠い。近年、新規薬剤である免疫調節薬(Immunomodulatory Drugs; IMiDs)サリドマイド、その誘導体であるレナリドミド(Len)、ポマリドミド、さらにはプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブが登場し、多発性骨髄腫患者の生存率は改善してきている。さらに、レナリドミドやポマリドミドにおける多発性骨髄腫細胞のアポトーシス誘導に関する機序の一端が明らかとなってきている。それは、IMiDs が cereblon(CRBN)という E3 ユビキチンリガーゼに結合することにより、正常では CRBN に結合することのなかった IKZF1/3、CK1alpha といった蛋白質がそれらの薬剤を介して CRBN に結合することが可能となる。これにより IKZF1/3、CK1alpha がユビキチン化を受け、プロテアソーム依存的に分解され、骨髄腫の細胞増殖抑制やアポトーシスが誘導される。一方、この CRBN に IMiDs が結合することで催奇形性を有する可能性がゼブラフィッシュを用いた研究で報告されている。またこれらの IMiDs をもってしても多発性骨髄腫は治癒には至らず絶対予後不良であり、治療抵抗性を示す多発性骨髄腫も存在する。

我々はこれまでに多発性骨髄腫患者由来の多発性骨髄腫細胞株において、レナリドミドの感受性の違いとこれまでに報告のあった標的分子の分解とに差はないことを示している。このことはおそらく他の蛋白質

による制御がレナリドミドの抵抗性に関与していることが考えられる。

これらの状況を踏まえ、我々は独自にサリドマイドをリード化合物として約 30 種類のフトルイミド誘導体を合成し、レナリドミド耐性骨髄腫細胞株を含めて増殖抑制を指標にその活性が強い TC11 を見出した(IC₅₀:1-5 microM)。さらに、共同研究者の柳川博士らが開発した *in vitro* virus 法を用いて、TC11 の新規結合分子として NPM1 および alpha-tubulin を同定している。しかしながら、TC11 の詳細な細胞死誘導機構はいまだ不明である。これまでに骨髄腫細胞株において NPM1 のノックダウンにより細胞増殖の抑制や TC11 処理による NPM1 のリン酸化の亢進は認められるものの、TC11 の主たる経路であるのかは定かではない。

2. 研究の目的

そこで、我々はまず第 1 に IMiDs の耐性機構の解明を行うことを目的とし、第 2 に TC11 による詳細な細胞死誘導機構を明らかにした後に IMiDs 抵抗性の機構との関連性を解析し、最終的に催奇形性のなく IMiDs 抵抗性多発性骨髄腫に対しても有用な治療薬の開発に繋げていくことを目的とした。

3. 研究の方法

まずレナリドミド抵抗性多発性骨髄腫細胞株における耐性機構を解明するために、レナリドミド存在化での感受性 MM 細胞株と抵抗性 MM 細胞株を比較し、網羅的に RNA 発現変動の解析・蛋白質の同定を行った。次に同定した RNA(蛋白質)を過剰発現した MM 細胞株およびノックダウン細胞株を樹立し、レナリドミド耐性機構の解明を行った。また、TC11 のアポトーシス誘導機構がこのレナリドミド耐性機構とどのように関連しているのかを解析するために、TC11 によるアポトーシス誘導経路について解析した。実際には下記の方法で行った。

(1) レナリドミド感受性株と耐性株とで蛋白質発現量に差異のある分子の網羅的同定

下記の4種類の細胞からそれぞれRNAを抽出し、RNAレベルでの差についてDNA microarrayを用いて網羅的に解析した。

a) レナリドミド感受性細胞株

(レナリドミド未処理および処理)

b) レナリドミド抵抗性細胞株

(レナリドミド未処理および処理)

(2) 上記で同定したRNAのレナリドミド誘導細胞死への影響について

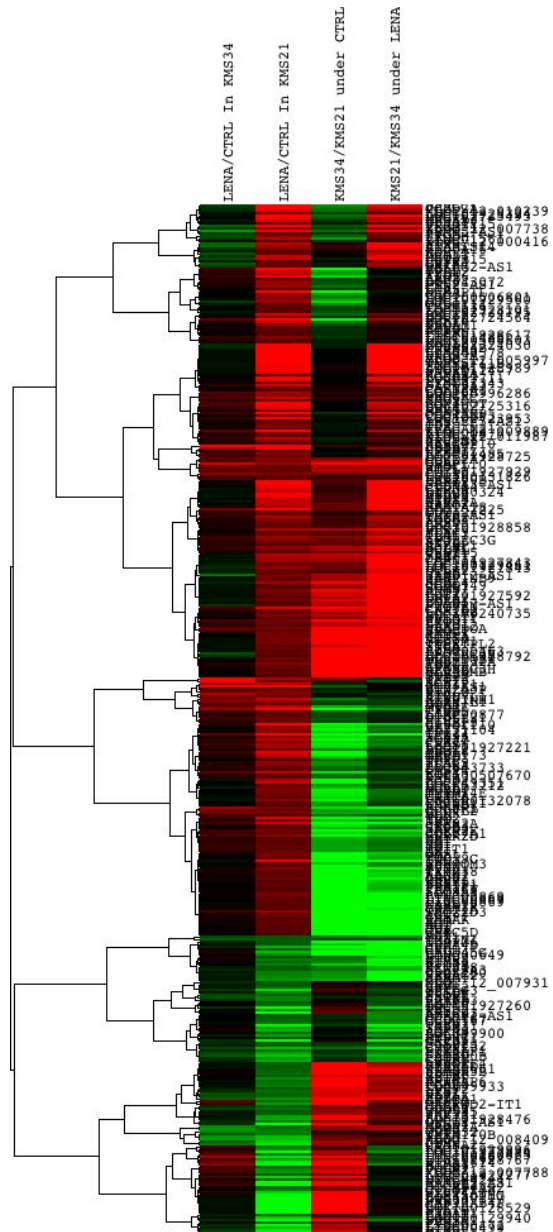
(2)-a 上記で同定した蛋白質(以下同定蛋白質と呼ぶ)が、実際にレナリドミドで誘導される細胞死に重要な役割を果たすのかを調べる為に、同定したRNAの過剰発現細胞株およびノックダウン細胞株をそれぞれ樹立した。レナリドミド感受性細胞株には過剰発現体を、レナリドミド抵抗性細胞株には特異的なshRNA発現体についてレトロウイルスを用いて作製した。

(2)-b 作製した細胞株におけるレナリドミド誘導細胞死への影響得られた細胞株を用い、レナリドミド処理において、同定蛋白質を過剰発現させたレナリドミド感受性細胞株では細胞死の抑制が、同定蛋白質特異的shRNAを発現させたレナリドミド抵抗性細胞株では細胞死の誘導が起こるのかを検討した。

4. 研究成果

遺伝子及びタンパク質の網羅的解析を行うにあたり、レナリドミドの濃度及び処理時間について条件検討を行った。次にこの最適条件下において、遺伝子発現量について網羅的に解析するためにDNA microarrayを行った。得られた結果からレナリドミド感受性細胞株で上昇している遺伝子やレナリドミド耐性株で上昇している遺伝子についてクラスター解析及びGSEAを行った。その結果、GSEAよりレナリドミド処理のみでエンリッチされたものはP53 PATHWAY群のみであった。一方クラスタリング解析では、

レナリドミド感受性株で刺激依存的に減少するものとして50 spots、刺激依存的に上昇するものとして132 spotsが得られた(図1)。



(図1)クラスタリング解析

さらにタンパク質についても同様な発現変動が認められたかをWestern blot法により検討した。その結果、BNIP3, DCAF4L2, STAP2がRNAの発現変動と同様なデータが得られた。そこでこれらを各々ノックダウンすることでレナリドミドの感受性に影響するのかをレトロウイルスを用いて検討した。しかしノックダウンしてもレナリドミドで誘導される細胞死が回復されなかった。

一方、我々はこれまでにサリドマイド誘導体として合成した TC11 が IMiDs とは異なる機序により細胞死を誘導すると考えているが、まだ詳細な機序についてはわかっておらず、その分子機構についても解析を行った。その結果、TC11 は IMiDs とは異なり CRBN に結合しないこと、またその基質の分解を引き起こさないこと、さらに CRBN をノックダウンした MM 細胞株においても TC11 誘導細胞死を抑制しなかったことが明らかになった。これらのことから我々は TC11 が CRBN とは非依存的に細胞死を誘導することを示した。さらに IMiDs とは異なり alpha-tubulin の重合阻害及び、M 期停止を引き起こすことにより細胞死を誘導していることを明らかにした。

今後もレナリドミド耐性株で変動する遺伝子のうち解析できていなかった遺伝子について同様に検討し、レナリドミドに耐性に関わる分子を同定・機序の解明を行っていく。これらを明らかにすることで、多発性骨髄腫などの新規治療薬開発につなげていく。

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 3 件)

1. 第 79 回日本血液学会
Cereblon-independent anti-myeloma pathway of TC11, a novel compound of immunomodulatory drugs.
発表者 Misa Nakamura, Daiju Ichikawa, Shuji Aida, Nahoko Hashimoto, Wakana Murota, Ryo Uozaki, Mikio Okayama, Kota Fujimori, Yuko Yonemura, Noriko Tabata, Hiroshi Yanagawa, Maiko Matsushita, Yutaka Hattori.
2017/10/20 (東京, 日本).

2. 第 42 回日本骨髄腫学会学術集会
PEG(E)-TC11, a novel PEG phthalimide derivative, inhibited MM cell growth CRBN independent manner.
発表者 會田 宗司, 市川 大樹, 中村 美沙, 宇於崎 涼, 飯田 和樹, 穂積 暢史, 岡山 幹夫, 藤森 宏太, 米村 裕子, 田島 典子, 山田 健人, 松下 麻衣子, 須貝 威, 柳川 弘志, 服部 豊.
2017/5/28 (東京, 日本).
3. American association for cancer research annual meeting 2017.
PEG(E)-TC11, a novel polyethylene glycol-linked phthalimide derivative, inhibited high-risk MM cell growth in vivo and in vitro via cell cycle G2/M arrest in a CRBN-independent manner.
発表者 Shuji Aida, Daiju Ichikawa, Kazuki Iida, Masashi Hozumi, Misa Nakamura, Ryo Uozaki, Nahoko Hashimoto, Mikio Okayama, Yuko Yonemura, Noriko Tabata, Taketo Yamada, Maiko Matsushita, Takeshi Sugai, Hiroshi Yanagawa, Yutaka Hattori.
2017/4/5 (Washington D.C., USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: フェニルフタルイミド修飾体及び有効成分とする医薬組成物
発明者: 柳川弘志, 服部豊, 市川大樹他
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2017/037906
出願年月日: 2017/10/19
国内外の別: 国際

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
市川 大樹 (ICHIKAWA, Daiju)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号: 60462793