

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09939

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達経路を標的とした難治性骨髄腫に対する治療構築のための基盤研究

研究課題名(英文)Targeting intracellular pathways in relapsed and refractory multiple myeloma

研究代表者

多林 孝之(Tabayashi, Takayuki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60624898

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)：ボルテゾミブや免疫調節薬などの規分子標的薬の効かない再発/難治性多発性骨髄腫に対する新たな治療法の開発は緊急課題となっている。我々は難治性多発性骨髄腫に対する新たな治療法としてDNA修復に重要なはたらきを担っている細胞周期チェックポイント蛋白であるWEE1に着目し研究を行った。我々はWEE1の阻害がボルテゾミブ感受性細胞と耐性細胞の両方に対してアポトーシスを強力に誘導することを明らかにし、さらにAZD1775とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬との併用は単剤より強力な抗骨髄腫作用を有することを示した。このことからWEE1阻害剤が難治性多発性骨髄腫の有効な治療薬となりうるということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は高齢者に好発する血液のがんであり、社会の高齢化に伴って患者数は増加の一途である。新規薬剤の登場によって治療成績は向上しているものの根治が出来ないため、いずれ治療に対して効果を認めなくなり難治の状態に至る。そのためこのような難治性多発性骨髄腫に対する新たな治療法の開発が急務となっている。我々は、従来の抗がん剤とは作用機序が異なるWEE1阻害薬という分子が難治性の多発性骨髄腫細胞に対して効果を有することを細胞レベルで明らかにした。本研究によって、この分子を使用した治療法が難治性の多発性骨髄腫に対して有効な治療法となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Although the introduction of novel agents, such as proteasome inhibitors, immunomodulatory drugs has improved the clinical outcomes of the patients with multiple myeloma (MM), most patients eventually relapse and develop drug resistance. Therefore, novel therapeutic approaches to overcome bortezomib (BTZ) resistance are urgently needed. WEE1 is a cell cycle checkpoint kinase and a key regulator of DNA damage surveillance pathways. We have investigated the efficacy of WEE1 inhibitor in various MM cells including BTZ-resistant cells, showing that WEE1 inhibitor induced apoptosis in all MM cells. Moreover, WEE1 inhibitor in combination with HDAC inhibitor induced apoptosis in these cells more effectively than single agent. In conclusion, our data suggest that WEE1 might be a promising molecular target for the treatment of BTZ-resistant MM.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 難治性 細胞回転 WEE1 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

プロテソーム阻害剤、免疫調節薬などの新規分子標的薬の登場によって多発性骨髄腫の治療成績は向上したが未だ根治せず、いずれ治療に対して効果を認めなくなり再発/難治の状態に至る。いったん再発/難治の状態になると有効な治療がなく予後は非常に不良である。近年、多発性骨髄腫患者から経時的に採取した多発性骨髄腫細胞(以下、骨髄腫細胞)の詳細な解析から、疾患の進行にしたがって骨髄腫細胞が遺伝子異常の異なるヘテロな細胞集団になっていることが明らかになった(Keats JJ. et al. Blood 2012;120:1067-76)。また、薬剤耐性の再発/難治性骨髄腫細胞においてどのようなシグナル伝達経路が活性化しているのかなど不明な点も多い。このような背景から多発性骨髄腫を克服するためには、造血器腫瘍におけるシグナル伝達経路シグナル伝達を明らかにし、それらを標的とした新たな戦略の確立が必要と考えられる。我々の骨髄腫細胞を対象にした研究では、植物の成分 1'-acetoxychavicol cetate (ACA) がNF- $\kappa$ B 経路の阻害を介して骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導したが (Ito K, Kizaki M et al. Cancer Res 2005;65:4417)、ACA をリード化合物として構造展開することによって独自に開発したTM-233ではNF- $\kappa$ B 経路のみならずJAK/STAT 経路も阻害することによってボルテゾミブ耐性の骨髄腫細胞に対しても強力に細胞を傷害した(Sagawa M, Tabayashi T, et al. Cancer Sci.2015;106:438-46)。また、これらの経路以外にWnt/ $\beta$ -catenin経路の阻害やMAPKK ファミリーであるTOPK の阻害でもボルテゾミブ耐性である骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった(Tabayashi T, et al. Blood 2014;124:3372)。さらに、TOPKの阻害薬によってレナリドミド耐性の骨髄腫細胞がレナリドミド感受性を回復することを示した(Tabayashi T, et al. Blood 2015;126:1763)図)。これらの知見からヘテロのクローンに対しても、種々のシグナル伝達経路の阻害薬によって薬剤耐性が克服できる可能性が示唆された。近年、多発性骨髄腫においてはゲノムDNAの不安定化が生じ、細胞内で恒常的にDNA損傷が生じていることが明らかになってきている(Cea M, et al. Blood 2016;127:1138)。DNA損傷時の細胞維持の機序として細胞周期チェックポイント機構があり、その中でG1/Sチェックポイントで働くp53とG2/Mチェックポイントで働くWEE1が重要な役割を演じている。これらの蛋白は細胞内でDNA損傷時に活性化し細胞周期を停止させることによって損傷したDNAが修復する時間をつくることによって細胞を維持する。DNA損傷時に細胞周期チェックポイント機構が働かないとDNAが修復されまなまま細胞分裂が開始され最終的にアポトーシスに至る。多発性骨髄腫においては恒常的にDNA損傷が生じていること、多くの難治性多発性骨髄腫においてはp53遺伝子異常を伴っていることからこのような細胞ではDNA修復機構としてWEE1に依存している状態が予測される。そこで我々は、DNA修復に重要なはたらきを担っている細胞周期チェックポイント蛋白であるWEE1に着目し、再発/難治骨髄腫に対する治療法確立を目的として本研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ボルテゾミブ耐性など難治性骨髄腫細胞に対する WEE1 の阻害の効果を調べ、WEE1 阻害薬を使用した難治性多発性骨髄腫に対する新規治療法を開発することにある。

## 3. 研究の方法

(1)多発性骨髄腫細胞における WEE1 阻害の効果を調べるために WEE1 の特異的阻害薬である AZD1775 を用いた。多発性骨髄腫細胞として腫細胞株(U266,RPMI-8226,KMS-11,OPM-2,MM1.S)とボルテゾミブ耐性株である KMS-11/BTZ および OPM-2/BTZ、患者臨

床検体を用いた。AZD1775 は 1,2,5,10  $\mu$ M の濃度で使用し細胞増殖の解析は MTS アッセイにて行った。

(2)WEE1 阻害の作用機序を調べるために 500nM の AZD1775 を投与 24 時間後の細胞を用いてフローサイトメトリーを用いアポトーシスアッセイを行った。細胞回転の解析には 500nM の AZD1775 を投与しそれぞれ、6、12、24 時間後にフローサイトメトリーを用いセルサイクル解析を行った。

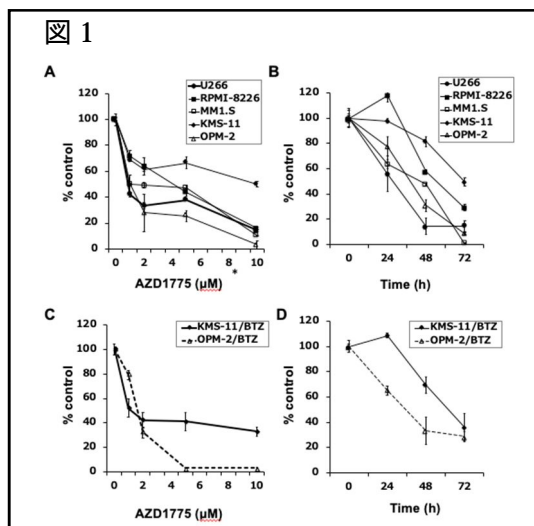
(3)WEE1 阻害における細胞内シグナル伝達経路の解析を行うため、細胞に 500nM の AZD1775 を投与 24 時間後に蛋白を抽出してウェスタンブロットを行った。

(4)種々の抗癌剤との併用療法の効果を調べるため、細胞株に 500nM の AZD1775 とともにそれぞれ 1  $\mu$ M のメルファランとピンクリスチン、50nM のドキソルビシンを投与し 24 時間後に MTS アッセイを行った。

(5)AZD1775 とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDAC)阻害薬との併用効果を調べるため発性骨髄腫性細胞株と臨床検体を用いて MTS アッセイを行った。HDAC 阻害薬としてクラス I、II、IV の全てを阻害するパノピノスタット、クラス I、II を阻害するポリノスタット、クラス I を阻害するエンチノスタット、クラス II を阻害するリコリノスタットを使用した。また、500nM の AZD1775 と 50nM のパノピノスタットを単剤および両方を細胞に投与し 24 時間後に蛋白を抽出してウェスタンブロットを行った。

#### 4 . 研究成果

(1)AZD1775 は骨髄腫細胞株に対して濃度と時間依存的に細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することを見出した。WEE1 阻害薬の抗骨髄腫効果は P53 の変異の有無に関わらず認められ、さらに難治性のボルテゾミブ耐性細胞に対しても認められた(図 1)。また、AZD1775 による抗骨髄腫作用は骨髄間質細胞と骨髄腫細胞の共培養下でも認められた。



(2) AZD1775 はボルテゾミブ感受性細胞と耐性細胞の両方に G2/M アレストとアポトーシスを誘導した。

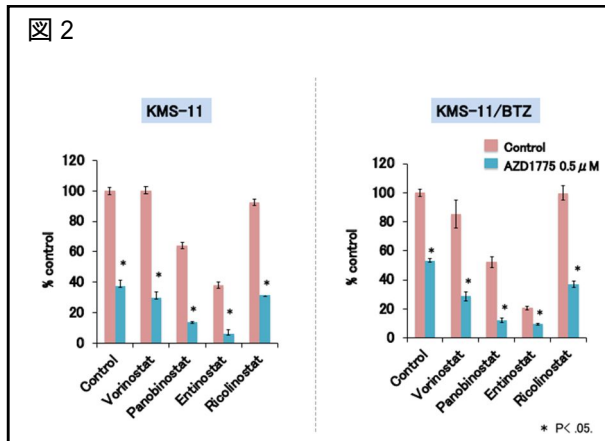
(3) AZD1775 を投与した細胞では、cleavedPAR の増加とともに H2AX も増加しており AZD1775 によってアポトーシスの誘導とともに DNA 損傷も誘導されていることが示唆された。

(4) 骨髄腫治療で使用されるメルファラン、ピンクリスチン、ドキソルビシンと AZD1775

を投与したところ、いずれも単剤に比べて併用でより抗骨髄腫効果が増強された。

(5) HDAC 阻害薬は二重鎖 DNA 損傷を誘導することから WEE1 との相乗効果がもっとも期待できると考え HDAC 阻害薬との併用に注目し WEE1 阻害薬との併用効果を解析した。HDAC 阻害薬と AZD1775 を併用したところそれぞれ単剤に比べて併用の方がより強力にアポトーシスを誘導した (図 2)

損傷のマーカである H2AX の発現増加が認められており HDAC 阻害薬による DNA 損傷の増加と WEE1 阻害薬による DNA 修復阻害が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 多林 孝之	4. 巻 60
2. 論文標題 再発難治性多発性骨髄腫（RRMM）の治療戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1257～1264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.60.1257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuka, Momose Shuji, Tabayashi Takayuki, Sawada Keisuke, Yamashita Takahisa, Higashi Morihiko, Sagawa Morihiko, Tokuhira Michihide, Rosenwald Andreas, Kizaki Masahiro, Tamaru Jun ichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center derived B cell lymphomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 749～759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tabayashi T, Takahashi T, Tanaka Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan T, Watanabe R, Tokuhitra M, Kizaki M
2. 発表標題 Dual Targeting of Cell-cycle Checkpoint and Histone Deacetylase Overcomes Bortezomib-Resistance in Multiple Myeloma.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多林孝之, 田中佑加, 高橋康之, 木村勇太, 富川武樹, 佐川森彦, 阿南朋恵, 中世古玲子, 得平道英, 木崎昌弘
2. 発表標題 細胞周期制御蛋白とヒストン脱アセチル化酵素の両方を標的としたボルテゾミブ耐性多発性骨髄腫の克服
3. 学会等名 第43回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多林孝之, 田中佑加, 高橋康之, 木村勇太, 富川武樹, 佐川森彦, 阿南朋恵, 渡部玲子, 得平道英, 木崎昌弘
2. 発表標題 当院におけるプレキサホルとG-CSFによる自家末梢血幹細胞採取
3. 学会等名 第66回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木崎昌弘, 多林孝之
2. 発表標題 シンポジウム：造血器腫瘍に対する治療概念の進化 多発性骨髄腫に対する治療の進歩
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 得平道英, 田中佑加, 高橋康之, 木村勇太, 富川武樹, 渡邊純一, 阿南朋恵, 佐川森彦, 多林孝之, 渡部玲子, 木崎昌弘
2. 発表標題 腎障害多発性骨髄腫患者におけるボルテゾミブ導入および維持療法の有用性
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多林孝之, 田中佑加, 高橋康之, 木村勇太, 富川武樹, 渡邊純一, 阿南朋恵, 佐川森彦, 中世古玲子, 得平道英, 木崎昌弘
2. 発表標題 細胞回転チェックポイントキナーゼとHDACを標的とした多発性骨髄腫の新規治療法の開発
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多林孝之、高橋康之、田中佑加、木村勇太、富川武樹、阿南朋恵、佐川森彦、渡部玲子、得平道英、木崎昌弘
2. 発表標題 A Novel Therapeutic Approach for Targeting the Cell-cycle Checkpoint Kinase in Multiple Myeloma
3. 学会等名 第79回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----