

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16092

研究課題名(和文) 形質細胞特異的分子を標的とした多発性骨髄腫の治療開発

研究課題名(英文) Development of a novel multiple myeloma treatment targeting a plasma cell specific molecule

研究代表者

河野 和 (Kawano, Yawara)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：70776244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：AMPD1というAMPをIMPに変換し、NH<sub>3</sub>を産生する経路を触媒するプリン分解経路の酵素が正常形質細胞と多発性骨髄腫細胞に特異的に発現することをオンライン遺伝子発現データベースと患者由来検体を用いて見出した。AMPD1阻害が多発性骨髄腫に対する新たな治療法になりうるかを検討したところ、AMPD1阻害剤が骨髄腫細胞に対して増殖抑制効果と細胞死を認めた。AMPD1阻害剤は同時に正常リンパ球への障害は認められず、骨髄腫細胞特異的に作用することが明らかになった。既存のAMPD1阻害剤の構造をもとに類似体の合成を行ったところ、既存のもの以上の抗骨髄腫活性を有する化合物を複数同定した。

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化社会に伴い増加中の治療が非常に困難な造血器腫瘍であり、骨髄腫の治療のためには既存の治療薬とは異なる作用機序の治療戦略が望まれている。今回、我々はAMPD1という骨髄腫細胞に特異的に発現する分子が新たな治療標的となり得ることを見出すことができ、既存のAMPD1阻害剤よりも活性の高い化合物を同定することができた。今後、AMPD1阻害が多発性骨髄腫の新たな治療選択肢となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified AMPD1, a purine metabolic enzyme that catalyzes AMP into IMP, is specifically expressed in normal plasma cells and multiple myeloma cells using public available gene expression data sets and patient derived samples. AMPD1 inhibitors inhibited the proliferation of myeloma cells in vitro, leading to myeloma cell death. AMPD1 inhibitors did not affect the survival of normal lymphocytes, proving that AMPD1 inhibition may work specifically on myeloma cells. We attempt to develop a novel AMPD1 inhibitor based on pre-existing AMPD1 inhibitors. As a result we succeeded in developing several AMPD1 inhibitors that were more effective compared to the pre-existing inhibitors.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 形質細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)多発性骨髄腫は免疫グロブリンを産生する形質細胞の悪性腫瘍であり、悪性リンパ腫、白血病に次いで頻度の多い造血器腫瘍である。多発性骨髄腫は骨髄腫細胞が骨髄中で増殖することによる病的骨折とそれに伴う全身の疼痛が患者のADLを著しく低下させ、平均生存期間中央値が約5年と予後不良な疾患である。診断時の年齢中央値は66歳と高齢で発症する患者が多く、罹患率、死亡率とも高齢になるほど増加することが知られており、高齢化社会に伴い日本における患者数の増加が予想される。

(2)自家末梢血幹細胞移植の発達やプロテアソーム阻害剤、免疫調整薬、抗体療法といった近年の新規治療薬の登場により多発性骨髄腫患者の予後とPerformance Statusは従来よりも改善した。しかしながら、新規治療薬は骨髄腫細胞への特異性が必ずしも高くなく、特に65歳以上の高齢者が多い骨髄腫患者の中には新規治療薬に伴う副作用により十分量の治療薬が投与できない場合や、治療の継続自体が困難な場合も少なくない。また、プロテアソーム阻害剤と免疫調整薬による治療に抵抗性となる「Double refractory」な骨髄腫が臨床上問題となっている。そのうえ、骨髄腫細胞の細胞生物学的多様性や治療に伴うクローン選択性により、自家末梢血幹細胞移植や新規治療薬の組み合わせをもってしても現時点では多発性骨髄腫の治癒は非常に困難である。したがって、より深い寛解、ひいては骨髄腫の治癒を目指すためには現存する治療薬とは異なる作用機序を有し、骨髄腫細胞への特異性の高い抗骨髄腫治療薬又は治療戦略が望まれていた。

(3)これまでの我々や他のグループの研究成果より骨髄腫細胞の遺伝子異常の多様性、骨髄微小環境の多様性、分化段階の多様性が骨髄腫細胞の薬剤抵抗性に寄与していることが示されてきた。さらに、現在の抗骨髄腫薬は骨髄腫細胞に対する特異度が必ずしも十分ではないため、治療成績向上のためには多様な骨髄腫細胞に広く発現し、骨髄腫細胞への特異度が高い分子を標的とした治療が必要とされた。我々は骨髄腫細胞に高発現し、かつ骨髄腫細胞に特異的に発現する分子を公開されているMicroarrayやRNAseqのデータを用いて同定し、治療標的になりうるかを検討したところ、有力な分子としてAMPD1が浮上した。

### 2. 研究の目的

多発性骨髄腫は高齢化社会に伴い増加中の治癒が非常に困難な造血器腫瘍であり、骨髄腫の治癒のためには現在の治療薬とは異なる作用機序の治療戦略が望まれている。我々はオンライン上の遺伝子発現データベースを用いて骨髄腫細胞に特異的に発現する遺伝子の検索を行った結果、AMPD1 (Adenosine monophosphate deaminase 1)というプリン代謝に関与し、AMPをIMPへと変換し、アンモニアを産生する経路を触媒する酵素分子が骨髄腫細胞に特異的に発現していることを見出した。本研究では骨髄腫細胞におけるAMPD1発現の意義と重要性を明らかにし、骨髄腫細胞のAMPD1を阻害することによる骨髄腫細胞の代謝経路を標的とした新たな治療戦略の有用性を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)AMPD1阻害の骨髄腫細胞に対する有効性を検証するため、AMPD1に対するshRNAを骨髄腫細胞株に作用させ、AMPD1阻害が骨髄腫細胞の生存に及ぼす影響を検討した。また、臨床応用を見据えて薬剤によるAMPD1阻害の有効性を検証するため、既存のAMPD1阻害剤(CPD#3, CPD#4)をin vitroで作用させ、これらの薬剤が骨髄腫細胞に対してAMPD1阻害活性を有するかを細胞内アンモニア濃度の測定することにより間接的に検証した。さらに、AMPD1阻害剤が骨髄腫細胞の細胞周期(BRDU-7AAD染色)、細胞死(Annexin V-PI染色、7AAD染色)に及ぼす影響を検討した。

(2)遺伝子発現データベース解析の結果、AMPD1は低酸素状況下において発現が変化する可能性が示唆された。骨髄腫細胞株を正常酸素条件と低酸素条件において培養し、両条件下におけるAMPD1発現量をリアルタイムPCR法とウエスタンブロット法にて検討した。さらに正常酸素条件と低酸素条件下における骨髄腫細胞株に対するAMPD1阻害剤の有効性を解析した。

(3)AMPD1はAMPをIMPへと変換するプリン体代謝に関わる酵素分子であり、AMPD1を阻害された細胞の増殖抑制には細胞内の代謝経路の変化が関与している可能性が高いことが予想された。AMPD1阻害剤の作用の有無による骨髄腫細胞株の代謝変化を解析するために、腫瘍細胞における主要な代謝産物であるNAD<sup>+</sup>、NADH、乳酸値の両群における差異を検討した。

(4)既存のAMPD1阻害剤(CPD#3, CPD#4)はin vitroにおいて100-200 μMの高濃度で作用を発揮するため、実臨床においてAMPD1阻害による多発性骨髄腫治療を実現するためにはより低濃度で作用を発揮する化合物が必要である。既存のAMPD1阻害剤の構造をもとに構造展開を行い、新

規化合物の合成を行った。合成された化合物の抗骨髄腫細胞活性を検証するため、各化合物を *in vitro* で骨髄腫細胞株に作用させ、骨髄腫細胞に対する細胞死の程度を 7AAD 染色の後にフローサイトメトリー法にて検討した。

#### 4. 研究成果

(1) AMPD1 に対する shRNA を作用させて AMPD1 発現を抑制した骨髄腫細胞株はコントロール shRNA を作用させた群と比較して有意に細胞増殖を抑制したため AMPD1 は骨髄腫細胞の生存・増殖に重要であることが示唆された。また、既存の AMPD1 阻害剤を骨髄腫細胞株に作用させたところ、細胞内アンモニア濃度の低下を認めたため、骨髄腫細胞において薬剤によって AMPD1 酵素活性阻害が可能であることが判明した。さらに骨髄腫細胞株、患者由来骨髄腫細胞に対して AMPD1 阻害剤が細胞周期抑制、細胞死誘導効果を有することが明らかとなった。また、骨髄腫細胞株の AMPD1 mRNA 発現量と AMPD1 阻害剤の有効性は相関関係にあり、AMPD1 発現量の高い骨髄腫細胞ほど AMPD1 阻害が有効であると考えられた。さらに患者由来細胞を用いた検討では AMPD1 阻害剤は骨髄腫細胞に対して細胞傷害活性を有するものの、正常リンパ球への影響はほとんど認められず、AMPD1 阻害は骨髄腫細胞へ特異度の高い治療戦略であることが証明された。

(2) 骨髄腫細胞株を低酸素条件において培養した結果、AMPD1 mRNA と蛋白発現量いずれも正常酸素条件下と比較して著明に増加しており、AMPD1 は腫瘍細胞が骨髄中のような低酸素環境下での活動で重要であると考えられた。さらに AMPD1 阻害剤は正常酸素条件より低酸素条件下においてより抗骨髄腫細胞活性が高いことが明らかとなり、骨髄腫細胞が実際に存在する低酸素環境においてより有効となる可能性が示唆された。

(3) AMPD1 阻害剤の作用の有無による NAD<sup>+</sup>、NADH、乳酸値の両群における差異を検討したところ、AMPD1 阻害剤添加群では非添加群と比較して著明な細胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH の低下、細胞外乳酸値の低下を認めた。これは AMPD1 阻害が骨髄腫細胞内の解糖系代謝を阻害していることを示唆しており、代謝経路を阻害するというこれまでにない作用機序による新たな多発性骨髄腫治療の可能性が広がった。

(4) 既存の AMPD1 阻害剤 (CPD#3, CPD#4) の構造をもとに構造展開を行った結果、合計 11 種類の新規化合物が合成に至った。11 種類中、4 種類が CPD#3, CPD#4 より高い抗骨髄腫細胞活性を有し、その中でも 2 種類は既存薬と比較して 10 倍以上の活性を有していた。

(5) 本研究は世界で初めて AMPD1 が骨髄腫細胞に特異的に発現し、AMPD1 を阻害することが骨髄腫細胞死を誘導することを明らかにした。本研究をより発展させることで既存の治療薬に抵抗性となった多発性骨髄腫症例に新たな治療選択肢をもたらすだけでなく、AMPD1 を介した骨髄腫細胞の生存・増殖機構の解明にもつながると考える。今後は AMPD1 阻害に伴う骨髄腫細胞死のより詳細な機序の解析のために、AMPD1 阻害下でのメタボローム解析を用いた代謝経路の網羅的解析、プロテオーム解析を用いた蛋白量の網羅的な定量解析を行う予定である。さらに、本研究において合成された新規化合物を用いた *in vivo* の前臨床段階の解析を行い、AMPD1 阻害剤を実臨床において用いる上での適切な用量や投与方法の検討を行い、本研究の臨床応用へ取り組んでいく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>河野 和, 稲田 優紀, 笹野 孝行, 西村 直, 松下 豊, 畑 裕之, 松岡 雅雄  |
| 2. 発表標題<br>Targeting AMPD1, a plasma cell specific metabolic molecule, for multiple myeloma treatment |
| 3. 学会等名<br>第44回日本骨髄腫学会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>河野 和, 笹野 孝行, 稲田 優紀, 西村 直, 串間 咲希, 畑 裕之, 松岡 雅雄   |
| 2. 発表標題<br>AMPD1, a plasma cell specific purine metabolic molecule, is a novel therapeutic target for myeloma |
| 3. 学会等名<br>第81回日本血液学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yawara Kawano, Takayuki Sasano, Saki Kushima, Yuki Inada, Nao Nishimura, Hiroyuki Hata, Masao Matsuoka                            |
| 2. 発表標題<br>Targeting the plasma cell specific purine metabolic enzyme, AMPD1, induces multiple myeloma cell death accompanying NAD depletion |
| 3. 学会等名<br>第61回米国血液学会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|