

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16101

研究課題名（和文）EZH1/2二重阻害による骨髄腫幹細胞を標的とした革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel stem cell-targeted therapy for multiple myeloma based on dual inhibition of EZH1/2

研究代表者

中川 亮（Nakagawa, Makoto）

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：20808878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞株およびマウスモデルを用いた検討で、EZH1/2二重阻害剤が骨髄腫幹細胞を標的とした治療として妥当であることを明らかとした。また、この阻害剤に対して、骨髄腫細胞株およびPDXモデルは高い感受性を示した。作用メカニズムについては、幹細胞性維持に重要なWNT/ $\beta$ -cateninシグナルに着目し、これらの遺伝子がEZH1/2のダイレクトターゲットであることを明らかにした。さらに、WNT関連遺伝子の発現上昇により、自己複製能の低下および細胞増殖抑制がもたらされることを突き止めた。本研究を通じて、EZH1/2の分子生物学的機能を解明し、開発中のEZH1/2二重阻害剤の非臨床POCを概ね取得できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、多発性骨髄腫におけるEZH1/2の機能について解明を進めた。研究代表者は、EZH2だけではなくEZH1/2のいずれもが幹細胞性の維持に重要であることを見出し、実際にEZH1/2二重阻害剤を投与することで幹細胞性が失われることを証明している。また、研究代表者らが共同開発したEZH1/2二重阻害剤は、既存のEZH2特異的阻害剤と比較して極めて治療効果が高く、明確な優位性がある。この阻害剤は骨髄腫幹細胞を標的とすることから、再発・難治例に対しても治癒を見込める有効な治療となる可能性があり、今後は企業治験や医師主導治験を通じた臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：By examining cell lines and mouse models, we found that the EZH1/2 dual inhibitor is appropriate as a therapy targeting myeloma stem cells. In addition, the myeloma cell lines and a PDX model showed high sensitivity to this inhibitor. Regarding the molecular mechanism of this inhibitor, we focused on WNT/ $\beta$ -catenin signaling, which is important for maintenance of stem cell, and clarified that these genes are direct targets of EZH1/2. Furthermore, we found that increased expression of WNT-related genes results in a decrease in self-renewal ability and suppression of cell proliferation. Through this research, we were able to elucidate the molecular biological function of EZH1/2 and obtain a nonclinical Proof of Concept for the EZH1/2 dual inhibitor under development.

研究分野：整形外科

キーワード：EZH1/2 骨髄腫幹細胞 Side population WNT/ $\beta$ -catenin PRC2

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、B 細胞の最終分化形態である形質細胞に様々な遺伝子異常が蓄積され生じる悪性腫瘍である。多数の新規薬剤が開発されているが、一度は治療が奏功してもいずれ再発をきたすため根治は困難で、現在でも5年生存率は50%以下と予後不良な疾患である。がん幹細胞は、しばしば治療抵抗性を示して治療後に残存し、再び腫瘍組織を構築して再発の原因となるが、多発性骨髄腫においてもがん幹細胞の存在が難治性の一因となっており、がん幹細胞を根絶することで治癒に結びつくことが期待されている。ポリコム抑制複合体 PRC1 及び PRC2 は、様々な遺伝子群の転写抑制に関わり幹細胞性の維持に重要な役割を果たしている。PRC2 の活性サブユニットである EZH1/2 はヒストンメチル化酵素であり、ヒストン H3K27 のトリメチル化を誘導することにより下流の遺伝子群の転写を抑制している。多発性骨髄腫では EZH2 遺伝子の過剰発現と下流遺伝子群の発現抑制を認め、腫瘍の悪性化および幹細胞性の維持に寄与している。そこで、ヒト骨髄腫細胞株を用いて幹細胞性の高い Side Population (SP) 領域を同定し、EZH1/2 の遺伝子発現を調べたところ、SP 領域では EZH1 と EZH2 のいずれの発現も有意に亢進していることが分かった。この結果は、骨髄腫幹細胞の維持に EZH1/2 の両方が重要であり、がん幹細胞の治療標的として有望であることを示している。これらを基盤として、EZH1/2 に対する強力かつ特異的な二重阻害剤を第一三共株式会社と共同開発した。

## 2. 研究の目的

本研究は、骨髄腫幹細胞を標的として独自に開発した EZH1/2 二重阻害剤による多発性骨髄腫の前臨床段階での薬理的評価を行うと共に、EZH1/2 の分子生物学的機能を解明し、最終的には企業治験や医師主導治験へ導出するための非臨床 POC 取得を目的とする。また、網羅的遺伝子解析を中心として薬剤感受性を規定する遺伝子やバイオマーカーの同定を試み、実臨床における患者層別化の基盤とする。本研究は、骨髄腫幹細胞を標的として独自開発した EZH1/2 二重阻害剤による多発性骨髄腫に対する我が国発の革新的な治療法の確立を目指しており、未だ解明されていない多発性骨髄腫における EZH1/2 の機能解明から創薬、臨床応用に至るトランスレーショナル研究として非常に独自性の高い研究である。

## 3. 研究の方法

本研究では、具体的に以下の3点について検討を行った。

- (1) 骨髄腫細胞株および動物モデルを用いた EZH1/2 二重阻害剤の薬効評価  
入手した8つのヒト骨髄腫細胞株およびマウスモデルを用いて、EZH1/2 二重阻害剤の薬効評価を行うと共に、フローサイトメトリーを用いた SP 領域の解析により、幹細胞を標的とした治療としての妥当性を検討した。
- (2) 効果予測及び薬効評価のバイオマーカーの同定  
EZH1/2 二重阻害剤に対する感受性の結果とともに、多発性骨髄腫における EZH1/2 の分子生物学的機能を解明し、薬剤感受性を規定する遺伝子やバイオマーカーを同定することは個別化治療戦略において重要である。研究代表者は、ヒト骨髄腫細胞株を用いた RNA シークエンスおよびクロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)シークエンスを行い、ダイレクトターゲットとなる遺伝子を調べた。EZH1/2 は膨大な数の下流遺伝子群の転写を制御しているため、上記の網羅的解析を用いて阻害剤投与により変化しているシグナルを同定し、細胞増殖および幹細胞性に与える影響を検討した。同定したシグナルおよび遺伝子については、過剰発現やノックダウンなどの遺伝子操作を行うことで、さらに詳細な分子メカニズムを検討した。
- (3) 骨髄腫 PDX モデルの樹立および薬効評価法の確立  
ヒト腫瘍組織を免疫不全マウスに移植する PDX(patient derived xenograft)モデルは、個々の患者の腫瘍組織を実験動物レベルで忠実に再現し、薬剤スクリーニングに有用である。しかし、多発性骨髄腫は骨を主病変とし、その微小環境が腫瘍の増殖に重要であるため皮下移植では腫瘍が生着しない。そこで、生検組織より得られた腫瘍細胞を極細針のマイクロシリンジを用いてマウスの脛骨髄内に直接移植する手技を確立した。さらに、移植したマウスの末梢血を採取し、マウスには存在しないヒト免疫グロブリン値を ELISA で測定、検知することで腫瘍の生着を確認し、PDX モデルの樹立に成功した。ヒト免疫グロブリン値は病勢評価として実臨床に即した評価法であり、治療評価の指標にもなり得る。そこで、腫瘍が生着した PDX モデルに EZH1/2 二重阻害剤を投与したところ、ヒト免疫グロブリン (IgG) 値の上昇が著明に抑制された。本研究では、この技術を応用して多発性骨髄腫 PDX モデルの複数樹立および EZH1/2 二重阻害剤の薬効評価を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨髄腫細胞株および動物モデルを用いた EZH1/2 二重阻害剤の薬効評価

入手した 9 つのヒト骨髄腫細胞株のうち、8 つの細胞株が EZH1/2 二重阻害剤に高い感受性を示した。これらの細胞株における GI50 は、EZH2 特異的阻害剤である GSK126 と比較して 20 倍以上低値であった。この結果から、EZH2 だけでなく EZH1 も腫瘍の増殖に重要である可能性が示唆された。また、骨髄腫に対する第一選択薬であるプロテアソーム阻害剤耐性の細胞株 KMS-11/BTZ も EZH1/2 二重阻害剤に高い感受性を示した。以上より、多発性骨髄腫治療におけるキードラッグであるプロテアソーム阻害剤使用後の再発患者においても、EZH1/2 二重阻害剤は有望な治療選択肢になり得る可能性が示唆された。

また、これらの細胞株において、幹細胞活性の高い SP 分画の割合が、EZH1/2 二重阻害剤投与により有意に低下することを確認した。限界希釈細胞移植法により幹細胞数を評価したところ、EZH1/2 を二重阻害した細胞では、腫瘍の生着が非投与群に比べて著しく遅延した。さらに、骨髄腫細胞株の異所移植、同所移植モデルを作製し、EZH1/2 二重阻害剤を投与したところ、CD38 陽性細胞が消失し、非常に高い抗腫瘍効果を示した。*In vitro* と同様に *in vivo* においても、幹細胞分画の細胞が阻害剤投与により有意に減少することをフローサイトメトリーで確認した。マウスへの投与に際し、有害な副作用は認めなかった。これらの結果から、EZH1/2 は再構築能を含めた骨髄腫幹細胞の維持に重要であり、EZH1/2 二重阻害剤が幹細胞を標的とした治療として妥当であることが強く示唆された。

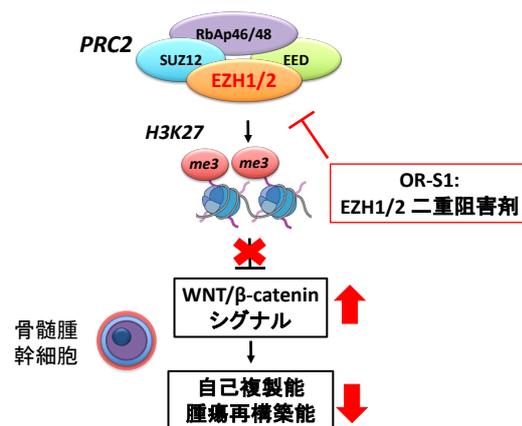
##### (2) 効果予測及び薬効評価のバイオマーカーの同定

ヒト骨髄腫細胞株 (MM. 1S および RPMI8226) を用いた RNA シークエンス解析を行い、WNT/ $\beta$ -catenin シグナルの遺伝子発現が EZH1/2 二重阻害剤投与群において有意に亢進していることを突き止めた。さらに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) シークエンスを行った結果、このシグナルの多くの遺伝子がヒストン H3K27 のトリメチル化を起しおり、阻害剤投与によりそれらの遺伝子が有意に脱メチル化される点は、2 つの細胞株に共通のメカニズムであることが分かった。WNT 関連遺伝子の発現上昇は、幹細胞分画と非幹細胞分画のいずれにおいてもみられる現象であることを RT-PCR で確認し、幹細胞分画の減少に WNT/ $\beta$ -catenin シグナルが寄与していることを明らかにした。

WNT/ $\beta$ -catenin シグナルが腫瘍増殖に与える影響を調べるために、脱リン酸化された活性型  $\beta$ -catenin を骨髄腫細胞株に過剰発現させたところ、幹細胞活性の高い SP 分画の腫瘍細胞数が有意に減少した。その一方で、 $\beta$ -catenin をノックダウンさせると、EZH1/2 二重阻害剤の効果が減弱することも確認した。これらの結果から、WNT/ $\beta$ -catenin シグナルは骨髄腫細胞の幹細胞性維持に重要な因子の 1 つであり、このシグナルが亢進することによって自己複製能が低下する結果、細胞増殖が抑制されることが示唆された。

また、EZH1/2 二重阻害剤への感受性を示した他の細胞株においても、EZH1/2 二重阻害により WNT/ $\beta$ -catenin シグナルの発現が有意に亢進していることを確認した。これらの結果から、多発性骨髄腫において、WNT/ $\beta$ -catenin シグナルは PRC2 のダイレクトターゲットであることが示唆された (図)。

図 EZH1/2 の骨髄腫におけるシグナル制御



##### (3) 骨髄腫 PDX モデルの樹立および薬効評価法の確立

研究機関を通じて、PDX モデルの樹立に成功したのは 1 例のみであった。その理由としては、病院側から得られるサンプル数が少ない点、移植生着に数ヶ月単位で時間がかかるため、悪性度の高い腫瘍ではないと生着が困難であることなどが考えられた。樹立に成功した 1 例では、細胞株と同様に EZH1/2 二重阻害剤への感受性が高く、WNT 関連遺伝子の発現上昇も認めた。

本研究では、細胞株およびマウスモデルを用いた検討で、EZH1/2 二重阻害剤が骨髄腫幹細胞を標的とした治療として妥当であることを明らかとした。また、この阻害剤に対して、骨髄腫細胞株および PDX モデルは高い感受性を示した。作用メカニズムについては、幹細胞性維持に重要な WNT/ $\beta$ -catenin シグナルに着目し、これらの遺伝子が EZH1/2 のダイレクトターゲットであることを明らかにした。さらに、WNT 関連遺伝子の発現上昇により、自己複製能の低下および細胞増殖抑制がもたらされることを突き止めた。

本研究を通じて、EZH1/2 の分子生物学的機能を解明し、開発中の EZH1/2 二重阻害剤の非臨床 POC を概ね取得できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 中川 亮, 北林 一生	4. 巻 24
2. 論文標題 造血管腫瘍におけるEZH1/2を標的とした新規治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 704-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Makoto, Fujita Shuhei, Katsumoto Takuo, Yamagata Kazutsune, Ogawara Yoko, Hattori Ayuna, Kagiyama Yuki, Honma Daisuke, Araki Kazushi, Inoue Tatsuya, Kato Ayako, Inaki Koichiro, Wada Chisa, Ono Yoshimasa, Yamamoto Masahide, Miura Osamu, Nakashima Yasuharu, Kitabayashi Issay	4. 巻 110
2. 論文標題 Dual inhibition of enhancer of zeste homolog 1/2 overactivates WNT signaling to deplete cancer stem cells in multiple myeloma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 194 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13840	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 Nakagawa Makoto, Kitabayashi Issay	4. 巻 109
2. 論文標題 Oncogenic roles of enhancer of zeste homolog 1/2 in hematological malignancies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2342 ~ 2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13655	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 Kagiyama Yuki, Fujita Shuhei, Shima Yutaka, Yamagata Kazutsune, Katsumoto Takuo, Nakagawa Makoto, Honma Daisuke, Adachi Nobuaki, Araki Kazushi, Kato Ayako, Inaki Koichiro, Ono Yoshimasa, Fukuhara Suguru, Kobayashi Yukio, Tobinai Kensei, Kitabayashi Issay	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 CDKN1C mediated growth inhibition by an EZH1/2 dual inhibitor overcomes resistance of mantle cell lymphoma to ibrutinib	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14905	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Makoto Nakagawa, Takuo Katsumoto, Kazutsune Yamagata, Yoko Ogawara, Ayuna Hattori, Yukiko Aikawa, Daisuke Honma, Kazushi Araki, Tatsuya Inoue, Ayako Kato, Koichiro Inaki, Chisa Wada, Yoshimasa Ono, Yasuharu Nakashima, Issay Kitabayashi
2. 発表標題 Dual inhibition of EZH1/2 depletes stem cells and over-activates WNT signaling in multiple myeloma
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------