

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08807

研究課題名(和文)新規多発性骨髄腫モデルマウスを用いた統合的エピジェネティック治療の確立

研究課題名(英文) Integrative epigenetic therapies using novel myeloma mouse models

研究代表者

三村 尚也 (Mimura, Naoya)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00422220

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)：本研究では、多発性骨髄腫のエピジェネティック修飾異常を標的とした新規治療薬の開発を目指した。まずH3K27me3転移酵素であるEZH2/EZH1共阻害剤と選択的Akt阻害剤との併用による抗骨髄腫効果のメカニズムを解明した。またBMI1ダウンレギュレーターPTC596はプロテアソーム阻害剤と協調的にBMI1蛋白を減少させるが、その本質的な薬理作用は微小管の重合阻害作用であることを明らかにした。そしてH3K27脱メチル化酵素Utx欠損とBraf V600E活性型変異の両方の体細胞変異を成熟B細胞にのみ誘導したコンパウンドマウスにおける形質細胞腫瘍の発症機序解明を行い、治療候補薬の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

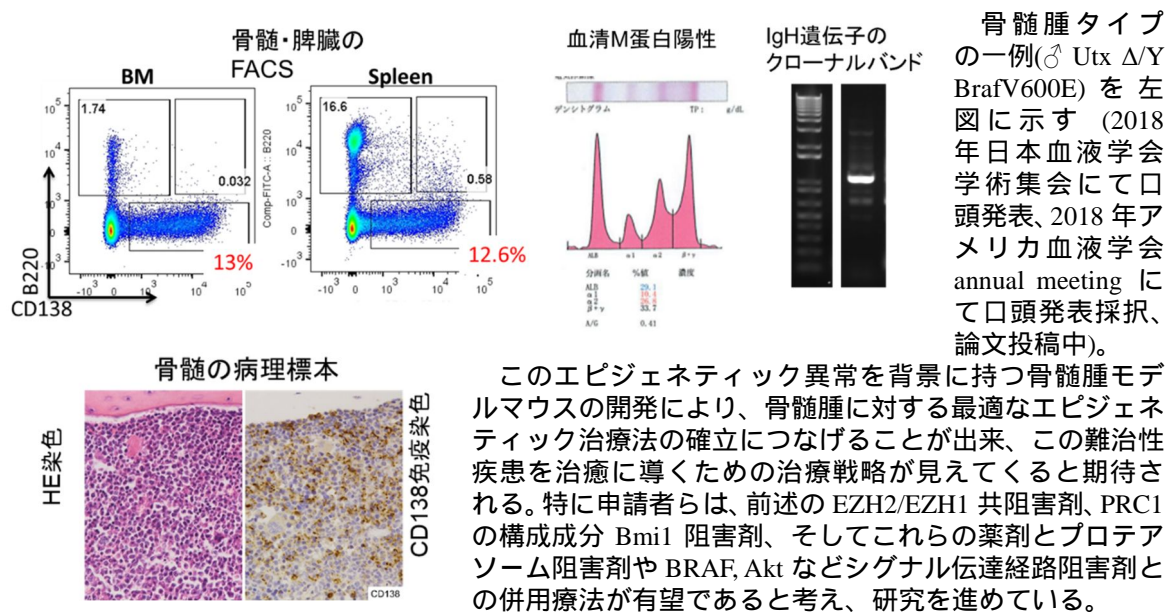
多発性骨髄腫は難治性の血液腫瘍であり、新たなアプローチの治療開発が求められている。本研究で明らかになったエピジェネティック治療は遺伝子の発現異常を一度に修正できる魅力的な治療法であり、今回の成果は新規治療薬の基盤構築となりうると考えられる。また本研究で使用した形質細胞腫瘍モデルマウスは、ヒトの遺伝子異常を模した自然発症モデルであり、既存のモデルマウスに比べてより動的な病態形成や治療反応を見ることが出来る可能性がある。このマウスを用いた研究により骨髄腫の新規治療薬開発につながるものと確信している。

研究成果の概要(英文)：We have been developing novel epigenetic therapies for multiple myeloma (MM). (1) EZH2 and its homolog EZH1 are the histone lysine methyltransferases inducing the repressive mark of H3K27me3. UNC1999, dual inhibitor of EZH2 and EZH1, and a selective Akt inhibitor TAS-117 synergistically inhibit the growth of MM cells through epigenetic mechanisms. (2) A microtubule polymerization inhibitor PTC596 cooperatively downregulates BMI1 protein with proteasome inhibitors, exhibiting in-vitro and in-vivo cytotoxicity in MM cells. (3) Our mouse model with concurrent loss of the histone demethylase Utx and the activating mutation of Braf V600E in post germinal center B cells develops mature B-cell malignancies including plasma cell neoplasms. One of the mechanisms of the disease development is Myc upregulation induced by epigenetic gene alterations. Some epigenetic therapies are candidates for this mouse model.

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 モデルマウス EZH2/EZH1共阻害剤 選択的Akt阻害剤 BMI1ダウンレギュレーター

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、研究者個人に帰属します。



2. 研究の目的

本研究においては、申請者らが開発したエピジェネティック遺伝子改変による骨髄腫モデルマウスを用いて、UTX の多発性骨髄腫の発症に関わるエピジェネティック異常の治療標的遺伝子を探索し、それを制御するための新規治療方法を統合的に確立することを目的とする。具体的には、

- (1) 骨髄腫マウスの腫瘍形質細胞の網羅的遺伝子解析を行い、骨髄腫の進展に関わる標的遺伝子を明らかにする。
- (2) 腫瘍形質細胞をセルライン化した in vitro 系と免疫不全マウスに2次移植した in vivo 系を用いて、EZH2/EZH1 共阻害剤単剤、あるいはプロテアソーム阻害剤やシグナル伝達経路阻害剤との併用療法の治療効果とその標的遺伝子を明らかにする。
- (3) 上記と同様の系を用いて、新規 Bmi1 阻害剤 PTC596 単剤の抗骨髄腫効果、プロテアソーム阻害剤との併用効果、それらの治療標的遺伝子を明らかにする。
- (4) 以上の結果をヒト骨髄腫細胞株や患者由来骨髄腫細胞においても検証し、多発性骨髄腫に対する最も有効なエピジェネティック治療の統合的戦略を提案する。

学術的独自性と創造性に関しては、まず今まで遺伝子改変による骨髄腫モデルマウスの作製成功例は非常に限られており、特にエピジェネティック関連遺伝子を改変した骨髄腫モデルマウスは世界初であり、非常にインパクトが大きい。多発性骨髄腫の発症・進展機序は未だ完全には解明されておらず、このマウスの網羅的遺伝子解析は世界初のデータになると考えられる。また遺伝子改変骨髄腫マウスを用いた新規エピジェネティック治療モデルは他に類が無いと思われる。

(以上、研究開発当初の目標)

3. 研究の方法

(1) 選択的 Akt 阻害剤と EZH2/EZH1 阻害剤の併用療法の解析

PI3K-Akt 経路は骨髄腫細胞の生存・増殖に重要なシグナル伝達経路であり、骨髄微小環境において活性化する。Akt は本経路のマスターレギュレーターであり、非選択的に Akt を阻害する perifosine は前臨床的な抗骨髄腫効果を示し、臨床試験も実施されたものの、臨床応用には至っていない。我々はこれまでに、骨髄腫細胞の Akt を選択的かつ低濃度で良好に阻害する TAS-117 の前臨床的な抗骨髄腫効果と、プロテアソーム阻害剤との良好な併用効果を明らかにしており (Mimura N, et al. Cancer Res. 2014)、選択的 Akt 阻害剤の骨髄腫治療における可能性に期待している。そこで Akt とヒストンメチル化酵素 EZH2/EZH1 との分子学的関連を明らかにし、両者を標的とした新たな骨髄腫治療の可能性を検討する。

(2) 新規 Bmi1 阻害剤 PTC596 単剤あるいはプロテアソーム阻害剤との併用療法の解析

Polycomb repressive complex 1 (PRC1) はヒストン H2A のリジン 119 番のモノユビキチン化 (H2AK119ub1) を介して、PRC2 による H3K27me3 と協調的に遺伝子転写を抑制する。BMI1 は PRC1 の構成成分の一つであり、細胞周期を調整する p16INK4a と p14ARF の発現を抑制して腫

瘍増殖的に機能する。骨髄腫細胞では BMI1 の高発現が報告されており、治療標的となり得る可能性がある。そこで BMI1 の発現を低下させるダウンレギュレーターとして開発され、既に固形がんにおいて臨床試験が進行している PTC596 の抗骨髄腫効果を検討する。PTC596 は APC/CCDC20 を抑制することで持続的な CDK1/CDK2 の活性化を来し、BMI1 のリン酸化と蛋白分解を誘導することが示されている。

(3) マウス腫瘍形質細胞の網羅的エピジェネティック解析とエピジェネティック治療の開発

多発性骨髄腫を発症したマウスの骨髄あるいは脾臓から、FACS を用いて純度の高い腫瘍形質細胞を回収し、RNA シークエンス、H3K27me3 などの ChIP シークエンスなどの網羅的解析を行う。UTX 欠損のヒストン修飾と遺伝子発現への影響を検討し、腫瘍の発症進展に関わる原因遺伝子を同定する。また腫瘍形質細胞を回収して *in vitro* にて骨髄間質細胞あるいは IL-6 を使用して培養を行っており、一部が既にマウス骨髄腫細胞株として stable な状況となっている。この細胞株にウイルスベクターを用いて Utx を add back し、エピゲノムの変化を検証する。

またマウス骨髄腫細胞株を用いて、EZH2/EZH1 阻害剤である UNC1999 を始めとするエピジェネティック修飾薬の治療効果を MTS アッセイや annexin PI 染色を用いて検討し、新たな治療法開発の基盤構築を行う。

(以上、研究開始当初の計画から一部変更あり)

4. 研究成果

(1) 選択的 Akt 阻害剤と EZH2/EZH1 阻害剤の併用療法の抗骨髄腫効果

骨髄腫細胞株に対する選択的 Akt 阻害剤 TAS-117 と、EZH2/EZH1 共阻害剤 UNC1999 あるいは EZH2 単独阻害剤 GSK126 との併用効果を比較検討した。TAS-117 と UNC1999 との併用は相加相乗的であったのに対して、GSK126 との併用は明らかに拮抗的であった。TAS-117 と UNC1999 との併用療法によって、骨髄腫細胞株のアポトーシスはそれぞれの単剤に対して有意に増強された。

重要なことに、TAS-117 治療によって骨髄腫細胞の Rb-E2F 経路が抑制されて E2F1 が不活性化され、その下流にある EZH2 の転写が抑制されて EZH2 の蛋白発現が低下することを明らかにした。一方で TAS-117 治療によって、EZH2 のホモログである EZH1 発現は上昇し、H3K27me3 レベルはむしろ増加することが分かった。TAS-117 治療を行った骨髄腫細胞株の RNA シークエンスを行うと、FOXO シグナル経路の遺伝子群が発現上昇していることが判明した。実際に TAS-117 治療によって転写因子である FOXO3 や FOXO4 の遺伝子発現は上昇し、その下流にある BIM や CDKN1B の遺伝子発現も上昇していた。ChIP-qPCR 解析を行うと、TAS-117 治療によって EZH1 プロモーターへの FOXO3 の結合が増加しており、shRNA 法による FOXO3 のノックダウンによって EZH1 や CDKN1B の発現は抑制された。これらの結果により、TAS-117 による Akt 阻害により、FOXO3 が EZH1 プロモーターに結合して EZH1 の発現が上昇することが明らかとなった。そして Akt 阻害時の EZH1 の機能を明らかにするために、shRNA 法によって骨髄腫細胞の EZH1 をノックダウンしたところ、TAS-117 による抗腫瘍効果が増強した。このことから、TAS-117 と UNC1999 の併用療法においては、UNC1999 による EZH1 抑制効果が重要な役割を果たしていることが示唆され、選択的 Akt 阻害剤と EZH2/EZH1 共阻害剤との併用療法は、多発性骨髄腫の新たな治療戦略の一つになり得ると考えられた (Rizk M, et al. Cancer Sci. 2019)。

(2) BMI1 ダウンレギュレーター PTC596 の抗骨髄腫効果

BMI1 ダウンレギュレーター PTC596 は複数の骨髄腫細胞株に 0.1 μ M 以下の低濃度で細胞毒性を示し、G2/M 期における細胞周期の停止とそれに引き続くアポトーシスを誘導した。また PTC596 の経口投与は *in vivo* 皮下移植モデルにおいて、有意に腫瘍増殖を抑制した。PTC596 とボルテゾミブやカルフィルゾミブの併用療法は、骨髄腫細胞株と患者由来の骨髄間質細胞との共培養系において、相加相乗効果を示した。また患者由来骨髄腫細胞に対しても、PTC596 はボルテゾミブの抗腫瘍効果を有意に増強した。更に *in vivo* 皮下移植モデルにおいても、PTC596 とボルテゾミブの併用療法はそれぞれの単剤と比して有意に腫瘍増殖を抑制し、忍容性も良好でマウスの生存を延長させた。

PTC596 は既報どおり、骨髄腫細胞の BMI1 蛋白を減少させることを確認したが、興味深いことにボルテゾミブが BMI1 の転写を抑制して BMI1 蛋白を減少させることを見出し、PTC596 とボルテゾミブとの併用療法によって、BMI1 蛋白とユビキチン化 H2A が協調的に減少することを明らかにした。更にこの併用療法によって、抗アポトーシス蛋白である MCL1 の減少と、カスパーゼや PAPR の切断が増強され、骨髄腫細胞へのアポトーシス誘導が分子学的にも証明された。PTC596 とボルテゾミブとの併用療法における GSEA では、細胞周期関連遺伝子群の発現低下とアポトーシス関連遺伝子群の発現上昇が認められた。最近 PTC596 は固形がんでの研究において、直接的には微小管の重合阻害作用を持つことが明らかとなったが、骨髄腫細胞株においても、PTC596 が微小管の重合を阻害することを明らかとした。そして ChIP シークエンスと RNA シークエンスを用いた解析では、骨髄腫細胞における BMI1 の標的遺伝子の発現は PTC596 治療によって脱抑制していないことが分かった。つまり PTC596 は骨髄腫細胞に対して、直接的には

BMI1 を標的としておらず、微小管重合阻害による細胞周期停止によって二次的に BMI1 蛋白を減少させる機序が考えられた。

PTC596 とプロテアソーム阻害剤との併用療法の作用機序を明らかとするために、PTC596 とボルテゾミブのそれぞれの単剤治療によって発現上昇する遺伝子のうち、重複する 5299 遺伝子の GO 解析を行ったところ、小胞体関連蛋白の GO term が複数抽出された。RT-PCR 解析を行うと、ボルテゾミブ治療によって発現が上昇する *HSPA5* (BiP)、*ATF4*、*DDIT3* (CHOP) といった小胞体ストレス関連遺伝子が、PTC596 を併用することで更に上昇していた。特に CHOP の発現上昇は致死的な小胞体ストレスの誘導を示しており、ボルテゾミブによる致死的な小胞体ストレスを PTC596 が増強する作用機序が示された。以上の結果により、PTC596 単剤あるいはプロテアソーム阻害剤との併用療法は、多発性骨髄腫に対する新規治療選択として有望であると考えられた (Nagai Y, et al. Sci Rep. 2021)。

(3) マウス腫瘍形質細胞の網羅的エピジェネティック解析とエピジェネティック治療の開発

病的マウス由来の腫瘍形質細胞の RNA シークエンスを施行すると、GSEA によって MYC の標的遺伝子群が有意に上昇し、また骨髄腫細胞における腫瘍増殖や細胞周期亢進に関連する遺伝子群も上昇しており、腫瘍発症の機序の一つであると考えられた。そして *Utx* 欠損と *Braf*-V600E 変異が、時間をかけて協調して、oncogene である *Myc* 発現を始めとした myeloma-like gene signature を誘導することを明らかにした。また *UTX* 欠損によってエピジェネティックな遺伝子転写調整が変化し、骨髄腫発症を惹起させることを示した。

Utx *-/- Braf* V600E の腫瘍形質細胞は *in vitro* で培養可能であり、この細胞に *Utx* を遺伝子導入すると腫瘍増殖は抑制されたため、*Utx* が腫瘍抑制的に機能していることが確認された。またこの腫瘍細胞に対しては、*EZH2/EZH1* 共阻害剤 UNC1999 が *EZH2* 単独阻害剤 GSK126 よりも強い細胞毒性を示し、UNC1999 とボルテゾミブとの併用療法が相加相乗効果を示した。これらの結果は、今までの我々の研究で示された UNC1999 による *EZH1* 阻害効果の重要性が、*Utx* ノックアウト細胞においても当てはまることを示唆している。また *UTX* の不活性型変異のあるヒト骨髄腫細胞株は、ボルテゾミブやレナリドミドなど既存の抗骨髄腫薬に対して比較的耐性であることを明らかにし、その克服に向けて更なる検討が必要であると考えられた。これらのデータは学会発表を行い、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yurie Nagai, Naoya Mimura, Ola Rizq, 中略, Atsushi Iwama, Emiko Sakaida	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 The combination of the tubulin binding small molePTC596 and proteasome inhibitors suppresses the growth of myeloma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81577-x	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 該当する

1. 著者名 Mohamed Rizk, Ola Rizq, Motohiko Oshima, Yaeko Nakajima Takagi, Shuhei Koide, Atsunori Saraya, Yusuke Isshiki, Tetsuhiro Chiba, Satoshi Yamazaki, Anqi Ma, Jian Jin, Atsushi Iwama, and Naoya Mimura	4. 巻 110(12)
2. 論文標題 Akt inhibition synergizes with polycomb repressive complex 2 inhibition in the treatment of multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3695-3707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14207.	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 該当する

1. 著者名 三村尚也	4. 巻 62(4)
2. 論文標題 多発性骨髄腫に対する新規エピジェネティック治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 314-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.62.314	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoya Mimura
2. 発表標題 Novel epigenetic therapies for multiple myeloma
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 (シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yurie Nagai, Naoya Mimura, Ola Rizq, 中略, Atsushi Iwama, Emiko Sakaida
2. 発表標題 The Preclinical Activities of PTC596, a Novel Tubulin Binding Agent That Down-Regulates BMI1, Alone and in Combination with Bortezomib in Multiple Myeloma
3. 学会等名 The 61st ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed Rizk, Ola Rizq, Motohiko Oshima, 中略, Atsushi Iwama, Naoya Mimura
2. 発表標題 Akt Inhibition Differently Controls PRC2 Components and Synergizes with Dual EZH2/1 Inhibitor in the Treatment of Multiple Myeloma
3. 学会等名 The 61st ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurie Nagai, Naoya Mimura, Ola Rizq, 中略, Atsushi Iwama, Emiko Sakaida.
2. 発表標題 Preclinical activities of a novel BMI1 inhibitor PTC596 in multiple myeloma
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed Rizk, Ola Rizq, Motohiko Oshima, 中略, Atsushi Iwama, Naoya Mimura
2. 発表標題 Molecular mechanisms of dual inhibition of Akt and PRC2 in the treatment of Multiple Myeloma
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed Rizk, Ola Rizq, Motohiko Oshima, 中略, Atsushi Iwama, Naoya Mimura
2. 発表標題 Akt Inhibition Synergizes with PRC2 inhibition in the treatment of Multiple Myeloma
3. 学会等名 第44回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ola Rizq, Naoya Mimura, Motohiko Oshima, 中略, Emiko Sakaida, 中略, Atsushi Iwama
2. 発表標題 Cooperative impact of Utx loss and Braf V600E mutation induces myeloma in mice
3. 学会等名 The 17th International Myeloma Workshop (IMW) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	堺田 恵美子 (Sakaida Emiko) (60422218)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

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		
米国	マウントサイナイ医科大学	ハーバード大学 Dana-Farber Cancer Institute	