

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20840

研究課題名（和文）p97/VCPを標的とした新規多発性骨髄腫治療薬の開発に関する研究

研究課題名（英文）Targeting p97/VCP in Multiple Myeloma

研究代表者

西村 直（Nishimura, Nao）

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：90912311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：新たに得られた知見として、骨髄腫細胞でのVCP阻害による1)オートファジー抑制作用及び、2)DNA傷害反応の誘導である。また、研究協力者である熊本大学薬学部の協力により、新たにOSSL\_325096およびその誘導体合成を行い、20種類以上の新規化合物を得た。その中で、多発性骨髄腫細胞株であるKMS-12PEに対して増殖阻害作用がある化合物が複数認められた。現在各々の化合物についての生理活性については解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、p97/VCPの骨髄腫細胞内での新たな役割が明らかになるとともに、p97/VCPを標的とした新規薬剤開発への足掛かりとなった。

研究成果の概要（英文）：Our new findings include autophagy inhibition and DNA-damage response induction with p97/VCP knock-down. Furthermore, we synthesized several novel chemical compounds by modifying OSSL\_325096, and some of these compounds showed anti-proliferative activity against the KMS12PE myeloma cell line. Detailed mechanisms and molecular activities for these compounds are under investigation.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 p97/VCP ERストレス

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

p97/VCP は AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase family に属する小胞体(ER)関連のタンパク質であり、ER 関連のタンパク質分解、オートファジー、アグリソームの形成など、様々な細胞機能を担っている。近年の研究で、p97/VCP の新たな機能が明らかとなり、多発性骨髄腫 (multiple myeloma, MM)を含めた様々ながん治療への応用が試みられている。申請者は MM 細胞株に対する化合物ライブラリのスクリーニングにより、比較的低濃度 (IC<sub>50</sub>, 100-500nM) で細胞増殖抑制効果のある OSSL\_325096 を見出した。OSSL\_325096 は *in-vitro*, *in-vivo* 両方の系において、MM 細胞に ATP 競合的な p97/VCP 阻害を介した ER ストレス、およびアポトーシスを誘導することがわかった。また、OSSL\_325096 は既存の MM 治療の主軸である bortezomib に抵抗性となった細胞株に対しても効果を示した。現在、いくつかの p97/VCP 阻害剤が開発されているものの、いずれも臨床応用には至っておらず、また p97/VCP の MM における役割についてもよくわかっていない。申請者は動物実験においても良好な活性を示した OSSL\_325096 を同定し、その作用機序として p97/VCP の活性中心に対する ATP 競合的な阻害作用を見出した。MM は予後不良な疾患であり、今までにない機序で作用する新規治療薬の開発、並びに病態解明は重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本課題では、OSSL\_325096 の更なる作用機序の解明や、化学的修飾、探索的化合物スクリーニングにより、p97/VCP を標的とした新規がん治療の開発を行う。本研究において、p97/VCP が MM 細胞で果たす役割の詳細な解析や、OSSL\_325096 の合成展開により、MM の新たな治療戦略を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

p97/VCP が MM 細胞内で果たす生物学的役割の解析

p97/VCP を KD した MM 細胞の、トランスクリプトームやプロテオーム解析を行うことにより、p97/VCP 阻害によるアポトーシス誘導の機序につき、ER ストレス以外の経路も含めてさらなる検討を行う。

- ・ p97/VCP KD: shRNA, CRISPR-Cas9 システム
- ・ トランスクリプトーム解析: RNA-seq
- ・ プロテオーム解析: ショットガンシーケンス

OSSL\_325096 の合成展開による前臨床候補化合物開発

研究協力者である熊本大学薬学部 生体機能化学 共同研究講座と協力し、OSSL\_325096 側鎖の化学修飾を行い、p97/VCP D2 ドメイン ATP 結合部位への選択的親和性の向上、溶解性や安定性の向上、吸収性の向上、毒性の軽減などを目指す。

新たな化合物ライブラリのスクリーニングによる新規リード化合物の探索

p97/VCP 酵素活性阻害に特化した cell-free の assay 系を構築し、新たに p97/VCP 阻害活性を持つ小分子化合物の探索的スクリーニングを行う。

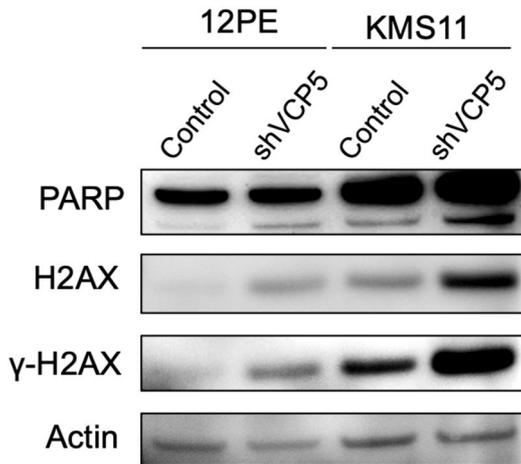
- ・ cell-free の assay 系: リコンビナント VCP を用いた蛍光ベースの ATPase activity assay
- ・ 新規ライブラリ: 当教室の HIV 研究チームの化合物ライブラリを再リクルート

### 4. 研究成果

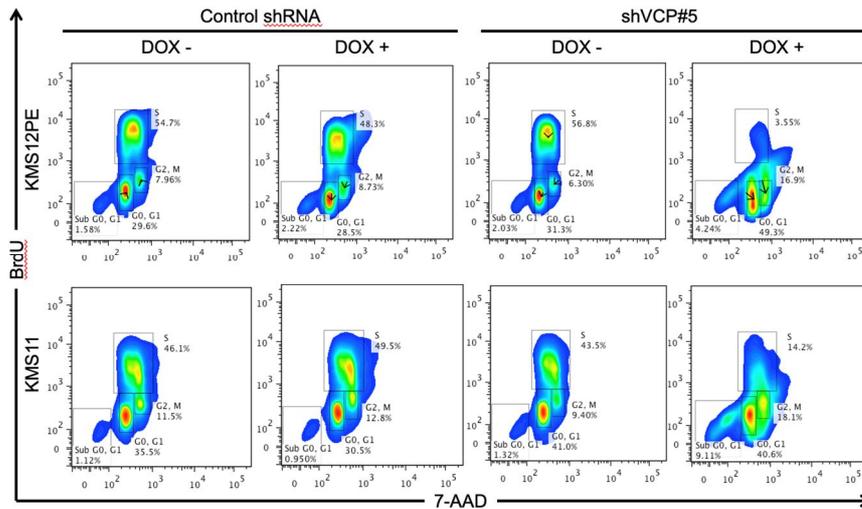
p97/VCP が MM 細胞内で果たす生物学的役割の解析

今回、我々は新たに MM 細胞株において p97/VCP のノックダウンを行った。VCP ノックダウンにより、MM 細胞において PARP の cleavage と H2AX および H2AX の発現増加が認められ、DNA damage response (DDR)が惹起されていることが示唆された(図 1)。

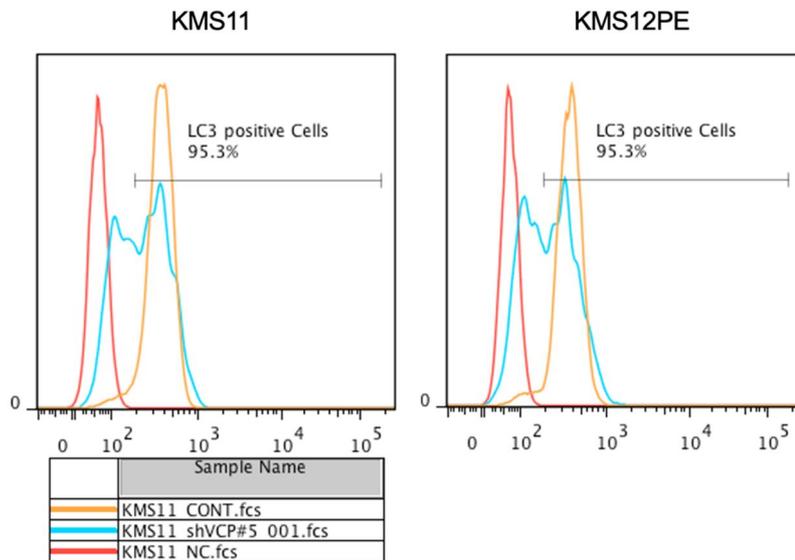
7AAD と BrdU を用いたフローサイトメトリーによる細胞周期解析では、VCP/p97 ノックダウン後の MM 細胞は G2/M 期分画の割合が著明に増加しており、DDR に引き続いた細胞周期停止をきたしていると考えた(図 2)。DDR は多発性骨髄腫をはじめとした各種のがん種で有望な治療標的とされている(1, 2)。また、VCP ノックダウン後の細胞では LC3 陽性細胞分画が減少しており、VCP/p97 ノックダウン後にオートファジーが抑制されていることが示唆された。これらの知見より、MM 細胞における多彩な VCP の機能が明らかとなった。ただ、当初予定していたトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析が行えておらず、今後の課題である。



(図 1) VCP/p97 のノックダウンは MM 細胞に DNA damage response を引き起こす



(図 2) VCP/p97 のノックダウンは骨髄腫細胞に cell cycle arrest を引き起こす



(図 3) VCP/p97 のノックダウンは骨髄腫細胞の autophagy を抑制する

#### OSSL\_325096 の合成展開による前臨床候補化合物開発

研究協力者である熊本大学薬学部 生体機能化学 共同研究講座にて既に複数の OSSL\_325096 誘導体を合成済みであり、一部には骨髄腫細胞株への細胞増殖抑制効果を認めた。こちらに関しては現在も進行中であり、未発表であることから化合物の化学構造を含めた詳細なデータは現時点で開示できない。

#### 新たな化合物ライブラリのスクリーニングによる新規リード化合物の探索

新規ライブラリスクリーニングに関しては、cell free の VCP/p97 ATPase activity assay 系の構築がうまくいっておらず、開始できていない。既に化合物ライブラリは当教室にあるため、引き続き assay 系の構築を進めていきたい。

#### 【参考文献】

1. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015 Nov 19;60(4):547-60. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.040. PMID: 26590714.
2. Fujii E, Inada Y, Kakoki M, Nishimura N, Endo S, Fujiwara S, Wada N, Kawano Y, Okuno Y, Sugimoto T, Hata H. Bufalin induces DNA damage response under hypoxic condition in myeloma cells. *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):6443-6449. doi: 10.3892/ol.2018.8091. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29616114; PMCID: PMC5876453.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------