

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591409

研究課題名(和文)多発性骨髄腫の接着分子を介した難治化の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of refractoriness of myeloma mediated by adhesion molecules

研究代表者

今井 陽一 (Imai, Yoichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10345209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は再発・難治性症例が多数存在する難治性疾患であり、治療抵抗性の獲得においてインテグリンなどの接着分子が重要な役割を果たす。多発性骨髄腫細胞株において接着分子インテグリンの機能阻害とHDAC阻害剤により増殖抑制・アポトーシスが誘導された。そこでHDAC阻害剤の標的分子を解析し、MLL-HOXA9およびカルシニューリンが同定された。HDAC阻害剤はHSP90の阻害を介してMLLおよびカルシニューリンの酵素サブユニットPPP3CAのタンパク分解を誘導した。PPP3CAは、多発性骨髄腫細胞の造腫瘍性の維持と溶骨病変における破骨細胞の形成において重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma is one of incurable hematological malignancies. We revealed that functional inhibition of integrin and histone deacetylase (HDAC) blocks proliferation and induces apoptosis in myeloma cells. We discovered that MLL-HOXA9 and PPP3CA, alpha subunit of calcineurin, are inhibited by HDAC inhibitors. We revealed that MLL and PPP3CA are protected from protein degradation by HSP90. HDAC inhibitors induce degradation of MLL and PPP3CA through inhibition of chaperone function of HSP90. It was shown that PPP3CA plays important roles in maintenance of viability of myeloma cells in vitro and in vivo. In clinical samples, PPP3CA expression was high in advanced disease. Osteoclasts formation is essential for osteolytic disease of multiple myeloma. PPP3CA was necessary for formation of osteoclasts and HDAC inhibitors were shown to inhibit osteoclasts formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血液内科学

キーワード：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性骨髄腫は、従来の抗がん剤による化学療法では十分な治療効果が得られないほか、移植療法やサリドマイド・ボルテゾミブなどの既存の分子標的療法によっても再発・難治性症例が多数存在する難治性疾患である。

(2) これらの治療抵抗性の獲得において、インテグリンをはじめとする接着分子が重要な役割を果たすことが示唆されているがその詳細な分子メカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

接着分子の活性化による多発性骨髄腫の造腫瘍性および難治性の獲得機構を新たに解明する。本研究によって造腫瘍性および難治性の鍵分子が明らかになることにより、それを標的とする新規治療法の開発基盤の形成が可能になり、多発性骨髄腫の根治療法の樹立に大きく役立つと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 種々の接着分子について、強制発現や固有リガンド存在下での培養により抗がん剤への感受性の変化、遺伝子発現、細胞内シグナルの変化を同様に解析する。

(2) (1)の研究で明らかになった多発性骨髄腫の接着分子を介した難治性獲得の鍵分子候補の HOXA9 の制御機構を明らかにする。

(3) HOXA9 の転写を調節する分子について、HDAC 阻害剤と CXCR4 阻害剤を併用した際に mRNA や蛋白質の発現量が変化する分子の同定を目指す。発現量の変化が確認できない場合は、リン酸化などの蛋白質修飾や HOXA9 との結合性など、その機能が変化する分子を見出す。その知見をもとに HDAC 阻害と接着分子の機能阻害による HOXA9 の転写抑制を介した発現低下機構の解明を目指す。

(3) 以上の解析で明らかになった HOXA9 の制御の鍵分子について、多発性骨髄腫の造腫瘍性における意義を検討する。具体的には、多発性骨髄腫細胞株においてレンチウイルスベクターを用いた高発現の誘導あるいは shRNA による発現低下の系を用いて細胞株の増殖能やアポトーシスの誘導を解析する。

(4) さらに、鍵分子の発現を制御した多発性骨髄腫細胞株の NOD マウスへの移植の系を用いて、in vivo で造腫瘍性における意義を検討する。臨床検体の解析も合わせて進める。

4. 研究成果

(1) 多発性骨髄腫細胞株において CXCR4 の阻害による接着分子インテグリンの機能阻害と HDAC 阻害剤による HDAC 阻害の組み合わせにより増殖抑制・アポトーシスが誘導されることを明らかにできた。さらに、この増殖抑制・アポトーシスの誘導における鍵分子として HOXA9 を同定した。HDAC 阻害剤による HOXA9 の発現低下の分子機構を解析した。その結果、HOXA9 の発現が転写の抑制を介して

低下することが見出された。

(2) HOXA9 は trithorax 蛋白質である MLL (mixed-lineage leukemia) によって発現が制御される。HDAC 阻害剤 LBH589 の MLL に対する効果を検証したところ、LBH589 処理により骨髄腫細胞株での MLL 蛋白質の発現量が低下し、LBH589 は MLL の蛋白質としての安定性に関与すると考えられた。本研究により、多発性骨髄腫細胞の造腫瘍性における MLL による HOXA9 の制御機構の重要性が見出された。

(3) このように HDAC 阻害剤は蛋白質の安定化を阻害して、抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。さらに、研究代表者は HDAC 阻害剤によって、発現が低下する蛋白質を検索したところ、カルシニューリンのサブユニットである PPP3CA の蛋白質の発現量が LBH589 処理により低下した。また、LBH589 とカルシニューリン阻害剤の併用により多発性骨髄腫細胞株の増殖が大幅に抑制されることを見出した。以上の知見から、多発性骨髄腫の造腫瘍性においてカルシニューリンが大きな役割を果たすことが明らかになった。

(4) カルシニューリンの酵素サブユニット PPP3CA は HSP90 と結合するクライアント分子であり、LBH589 により HDAC6 の阻害を介して HSP90 の分子シャペロン能が阻害され、PPP3CA の蛋白質分解が誘導されることを明らかにした。さらに、カルシニューリンの制御サブユニットであるカルシニューリン B の阻害剤 FK506 の併用により LBH589 の抗骨髄腫細胞効果が増強することを明らかにし、カルシニューリンが多発性骨髄腫細胞の腫瘍性の維持に重要な役割を果たすことを示した。

(5) LBH589 と FK506 の併用効果は免疫不全マウスへの多発性骨髄腫細胞株の xenograft モデルでも確認され、カルシニューリンが多発性骨髄腫の治療標的となることを in vivo で確認した。

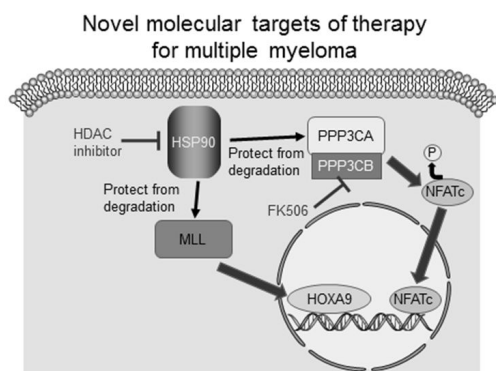
(6) 症例検体での mRNA の発現量の解析からは病状の進行とともに PPP3CA の発現が増加することが示唆された。

(7) ボルテゾミブは LBH589 と同様に HDAC6 を阻害するほか、PPP3CA の mRNA 発現を直接低下させる作用も持ち、LBH589 の併用により PPP3CA の発現量低下を誘導し骨髄腫細胞生存を抑制することが明らかになった。

(8) また、多発性骨髄腫の溶骨性病変では破骨細胞が活性化することが知られているが、破骨細胞においても、LBH589 が PPP3CA の蛋白質発現低下を誘導し破骨細胞の形成を抑制することを明らかにした。

以上からカルシニューリンが多発性骨髄腫細胞の造腫瘍性の維持と溶骨性病変における破骨細胞の形成において重要な役割を果たし、新規治療標的となることが明らかになった。

図 多発性骨髄腫の造腫瘍性における MLL-HOXA9 とカルシニューリンシグナルの役割



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Shiozaki H, Yoshinaga K, Kondo T, Imai Y, Shiseki M, Mori N, Teramura M, Motoji T: A case report of donor cell-derived leukemia after cord blood transplantation and a review of the literature: differences from bone marrow as the transplanted source. *Bone Marrow Transplantation* 49: 102-109, 2014.

Imai Y, Ohta E, Wang Y, Kitagawa Y, Ding Y, Yamada O, Maru Y, Motoji T: Identification of calcineurin as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma, & Leukemia* 13: S47, 2013.

Shimura H, Imai Y, Ieko M, Shiseki M, Mori N, Teramura M, Motoji T: Transient lupus anticoagulant with a prolonged activated partial thromboplastin time secondary to cytomegalovirus-related infectious mononucleosis. *Annals of Hematology* 2: 143-144, 2013.

Imai Y, Ohta E, Wang Y, Kitagawa Y, Ding Y, Yamada O, Maru Y, Motoji T: MLL-HOXA9 and calcineurin are novel therapeutic targets in multiple myeloma. *American Society of Hematology annual meeting abstracts* 120: 4007, 2012.

Yoshimi M, Goyama S, Kawazu M, Nakagawa M, Ichikawa M, Imai Y, Kumano K, Asai T, Mulloy JC, Kraft AS, Takahashi T, Shirafuji N, Kurokawa M: Multiple phosphorylation sites are important

for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *European Journal of Immunology* 42: 1044-1050, 2012.

Taoka K, Kumano K, Nakamura F, Hosoi M, Goyama S, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M: The effect of iron overload and chelation on erythroid differentiation. *International Journal of Hematology* 95: 149-159, 2012.

Mitsuhashi K, Ishiyama M, Imai Y, Shiseki M, Mori N, Teramura M, Seshimo A, Motoji T: Combined romiplostim and intravenous immunoglobulin therapy increased platelet count, facilitating splenectomy in a patient with refractory immune thrombocytopenic purpura unresponsive to monotherapy. *British Journal of Haematology* 158: 798-800, 2012.

Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, Goyama S, Tsuruta T, Kobayashi H, Shimabe M, Arai S, Nakagawa M, Imai Y, Kumano K, Kumagai K, Kubota N, Kadowaki T, Kurokawa M: Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *Journal of Experimental Medicine* 208: 2403-2416, 2011.

Nakagawa M, Shimabe M, Watanabe-Okochi N, Arai S, Yoshimi A, Shinohara A, Nishimoto N, Kataoka K, Sato T, Kumano K, Nannya Y, Ichikawa M, Imai Y, Kurokawa M: AML1/RUNX1 functions as a cytoplasmic attenuator of NF- κ B signaling in the repression of myeloid tumors. *Blood* 118: 6626-6637, 2011.

Nishimoto N, Arai S, Ichikawa M, Nakagawa M, Goyama S, Kumano K, Takahashi T, Kamikubo Y, Imai Y, Kurokawa M: Loss of AML1/Runx1 accelerates the development of MLL-ENL leukemia through down-regulation of p19^{ARF}. *Blood* 118: 2541-2550, 2011.

Nannya Y, Kataoka K, Hangaishi A, Imai Y, Takahashi T, Kurokawa M: The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation depends on disease risk. *Transplant International* 24: 469-476, 2011.

Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M: Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood* 117: 6304-6314, 2011.

Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N, Yoshiki Y, Nannya Y, Nitta E, Arai S, Sato T, Shimabe M, Nakagawa M, Imai Y, Kitamura T, Kurokawa M: Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. *Blood* 117: 3617-3628, 2011.

〔学会発表〕(計2件)

Imai Y, Ohta E, Wang Y, Kitagawa Y, Ding Y, Yamada O, Maru Y, Motoji T: Identification of calcineurin as a novel therapeutic target in multiple myeloma. 14th International Myeloma Workshop, Kyoto, April 4th, 2013.

Imai Y, Ohta E, Wang Y, Kitagawa Y, Ding Y, Yamada O, Maru Y, Motoji T: MLL-HOXA9 and calcineurin are novel therapeutic targets in multiple myeloma. 54th American Society of Hematology Annual Meeting, Atlanta, December 10th, 2012.

〔図書〕(計1件)

今井 陽一、太田 瑛里：多発性骨髄腫発生病理と mixed-lineage leukemia (MLL)タンパク、日本臨床 第72巻・第6号、1047-1051、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 陽一 (IMAI, Yoichi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：10345209

(2)連携研究者

丸 義朗 (MARU, Yoshiro)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：00251447