

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860719

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における新規治療標的としてのヒストンメチル化異常の解析

研究課題名(英文) Abberant histone methylation as a therapeutic target in multiple myeloma

研究代表者

三村 尚也 (MIMURA, Naoya)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00422220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコーム群複合体PRC2を構成するEZH2はヒストンメチル化転移酵素活性を持ち、H3K27me3を介して標的遺伝子の転写抑制に関わる。骨髄腫ではEZH2の発現亢進が報告され、またH3K27me3の脱メチル化酵素であるUTXの不活性型変異も報告されており、H3K27me3の亢進が骨髄腫の発症や進展に関わる可能性が示唆されている。本研究では、EZH2/EZH1阻害剤であるUNC1999のin vitro及びin vivoでの単剤での抗骨髄腫効果とボルテゾミブとの相乗効果を明らかとした。EZH2/EZH1阻害剤は骨髄腫の新たな治療戦略として有望であり、プロテアソーム阻害剤との併用療法が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on EZH2 and its homolog EZH1, both of which induce H3K27me3 as the catalytic components of PRC2, resulting in repressed transcription of target genes. In MM, EZH2 overexpression and inactivating mutations of UTX, a histone demethylase which removes methyl groups of H3K27, suggest an oncogenic function of H3K27me3. We demonstrate not only the anti-MM effects of the dual inhibitor of EZH2 and EZH1, UNC1999, both in vitro and in vivo, but also the combination effects with bortezomib. Our findings provide the rationale for this novel strategy; dual inhibition of EZH2 and EZH1 in combination with proteasome inhibition.

研究分野：血液内科

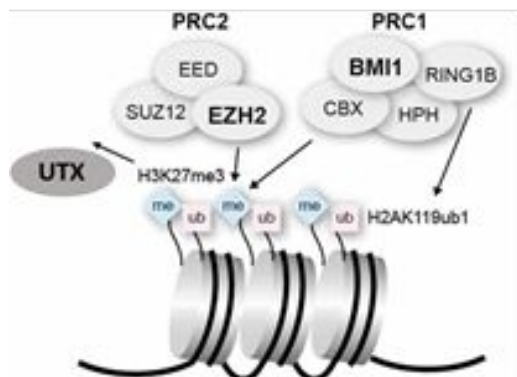
キーワード：多発性骨髄腫 エピジェネティック異常 ヒストンメチル化 EZH2阻害薬

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は癌化した形質細胞の増殖により骨破壊を来す血液悪性疾患である。近年の新規治療薬であるボルテゾミブ、サリドマイド、レナリドミドの登場により患者予後の改善が認められているが、依然として予後不良であり、更なる新規治療薬の開発が求められている(Laubach et al. Annu Rev Med 2011, Palumbo et al. N Engl J Med 2011)。申請者はこれまでに、多発性骨髄腫の新規分子標的療法の研究を行ってきた。小胞体ストレス応答における IRE1-XBP1 経路を阻害する新規低分子化合物 MKC-3946 がプロテアソーム阻害剤や HSP90 阻害剤との併用療法により、骨髄腫細胞に致死的小胞体ストレスを増強して細胞死に導くことを in vitro または in vivo の骨髄腫モデルで証明した(Mimura et al. Blood 2012)。また、新規選択的 Akt 阻害剤である TAS-117 が in vitro または in vivo で強力な抗骨髄腫効果を示すことを明らかにした(Mimura et al. 2012 年アメリカ血液学会・口頭発表、論文投稿中)。

がんの発生や進展においてがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異のみならず、エピジェネティック異常が重要な役割を果たしている事が明らかになりつつある。多発性骨髄腫においても、DNA メチル化異常(Walker et al. Blood 2011)、t(4;14)転座により誘導される MMSET によるヒストンメチル化異常(Marango et al. Blood 2008)、ヒストン脱メチル化酵素 UTX の変異(Haaften et al. Nat Genet 2009)が報告され、実際に HDAC 阻害剤は抗骨髄腫効果を示し、臨床治験段階に入っている(Hideshima et al. Int J Hematol 2013)。

申請者はこれら骨髄腫におけるエピジェネティック異常の中でも、ヒストン H3K27 トリメチル化の異常に着目した。ポリコーム群複合体は PRC1 と PRC2 に大別され、H3K27me3 のメチル化転移酵素である EZH2 は EED、SUZ12 と共に PRC2 complex を形成して機能しているが(下図)、骨髄腫



細胞では EZH2、EED、SUZ12 の遺伝子がいずれも高発現しており(Kalushkova et al. Plos One 2010)、また EZH2 を siRNA 法でノックダウンすると骨髄腫細胞の増殖が抑制されることから(Croonquist et al. Oncogene 2005)、骨髄腫においては EZH2

は oncogene として機能している事が示唆される。また、前述のヒストン脱メチル化酵素 UTX は H3K27me3 の脱メチル化に関与しており、その不活性型変異が骨髄腫患者の 10% に報告されていることから H3K27me3 の亢進が骨髄腫の発症または進展に関わっている可能性が示唆される。しかし、骨髄腫細胞における H3K27me3 の標的遺伝子を詳細に解析した報告は無く、EZH2/UTX の骨髄腫における生物学的意義はいまだ明らかにはなっていない。

更に治療応用の観点からは、EZH2 のメチル化活性の阻害作用を有する薬剤 DZNep が in vitro での抗骨髄腫効果を示しており(Xie et al. Plos One 2011)、EZH2 が骨髄腫の治療標的になりうる可能性を示している。2012 年より選択的 EZH2 阻害剤が開発され、悪性リンパ腫などの前臨床モデルで抗腫瘍効果を示すことが報告されたが(McCabe et al. Nature 2012, Knutson et al. 2013 PNAS)、まだ骨髄腫における効果は検証されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、ヒストン H3K27 トリメチル化(H3K27me3)の異常が骨髄腫の発症や進展にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とし、H3K27me3 メチル化酵素であるポリコーム群遺伝子 EZH2 の骨髄腫細胞における生物学的意義の解析とともに、H3K27 脱メチル化酵素 UTX のコンディショナルノックアウトマウスの解析を行う。また、in vitro および in vivo の前臨床モデルにおける EZH2 阻害剤の抗骨髄腫効果をプロテアソーム阻害剤など既存薬剤との併用療法も含めて検証し、EZH2 阻害剤の多発性骨髄腫に対する臨床応用に道筋をつけ、骨髄腫患者の予後向上に寄与したい。

3. 研究の方法

(1) EZH2 の骨髄腫細胞における生物学的意義

shRNA 法で骨髄腫細胞株の EZH2 をノックダウンして細胞増殖抑制効果を検証する。

(2) EZH2 阻害剤の in vitro での抗骨髄腫効果

骨髄腫細胞株や患者骨髄腫細胞を用いて、EZH2 阻害剤である UNC1999(Konze et al. ACS Chem Biol 2013)の細胞増殖抑制効果を検討した。

(3) EZH2 阻害剤とプロテアソーム阻害剤との併用療法の抗骨髄腫効果

併用療法による抗骨髄腫効果を MTS アッセイにより検討した。またこの併用効果のメカニズムとしてアポトーシスに着目し、フローサイトサイトメトリーを用いた annexin-PI 染色法やウェスタンブロット法にてアポトーシスの解析を行った。またそれぞれの単剤と併用療法によって発現変化する遺伝子を RNA シークエンスによって解析した。

(4) EZH2 阻害剤の in vivo での抗骨髄腫効果の解析

ヒト骨髄腫細胞株を免疫不全マウスに移植した xenograft モデルを用いて、EZH2 阻害剤単剤もしくはプロテアソーム阻害剤との併用療法が抗骨髄腫効果を示すかどうか検討した。

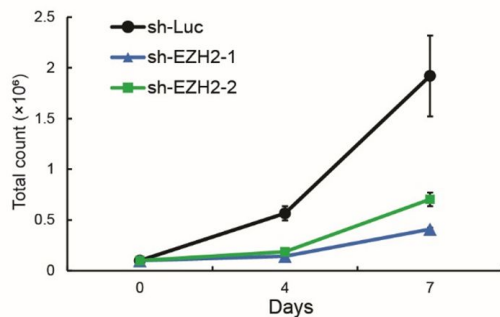
(5) UTX コンディショナルノックアウトマウスの解析

前述の通り、H3K27me3 の脱メチル化酵素 UTX の不活性型変異が骨髄腫患者の 10% に報告されている。UTX を Cre マウスを用いて形質細胞でのみ欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、多発性骨髄腫やその前段階である MGUS (意義不明のモノクローナル グロブリン血症) を発症するかどうかを解析した (現在も進行中)。

4. 研究成果

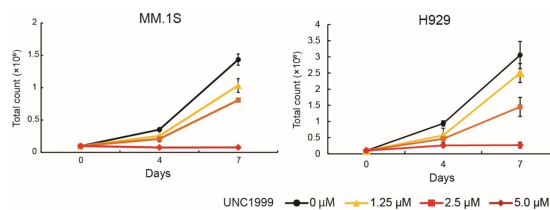
(1) EZH2 の骨髄腫細胞における生物学的意義

shRNA によって EZH2 をノックダウンすると、骨髄腫細胞の増殖抑制が得られた。このことから EZH2 は骨髄腫において oncogene として働く事を確認した。

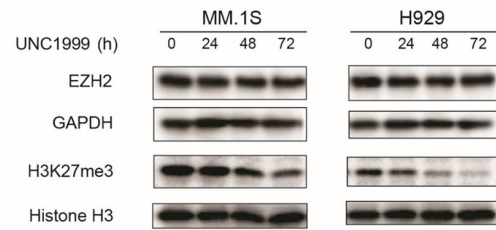


(2) EZH2 阻害剤の in vitro での抗骨髄腫効果

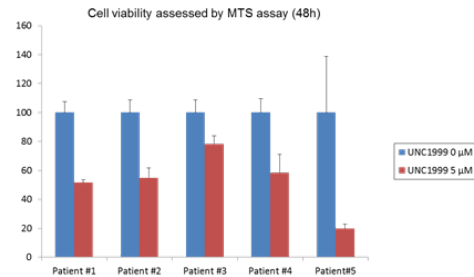
EZH2 阻害剤 UNC1999 は複数の骨髄腫細胞株において、時間・濃度依存性に増殖抑制効果を示した (下図)。



また、骨髄腫細胞内の H3K27me3 が濃度依存的に抑制されることをウェスタンブロット法で確認した (右上図)。

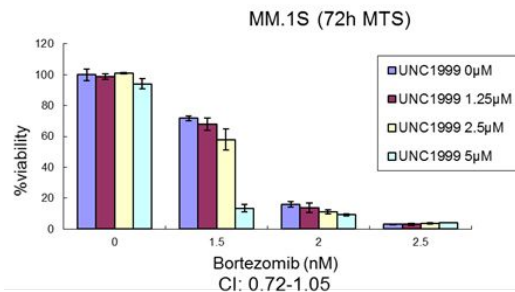


更に UNC1999 は患者骨髄腫細胞に対して有意な細胞毒性を示した (下図)。

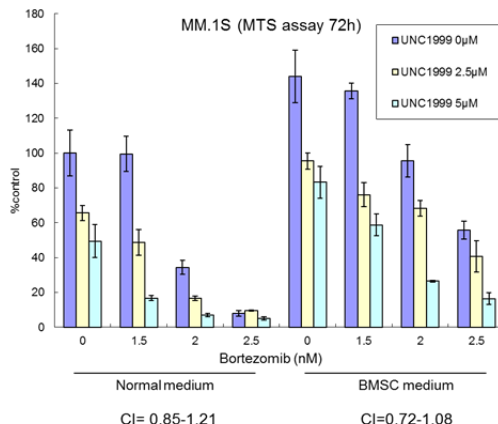


(3) EZH2 阻害剤とプロテアソーム阻害剤との併用療法の抗骨髄腫効果

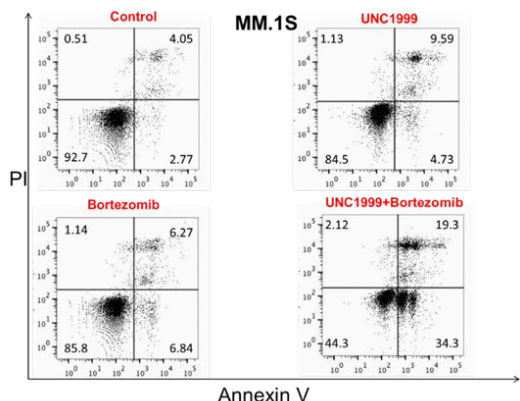
MTS アッセイによる評価にて、UNC1999 はプロテアソーム阻害剤との併用療法において Combination Index (CI) が 1 以下であり、相加・相乗効果を示した (下図)。



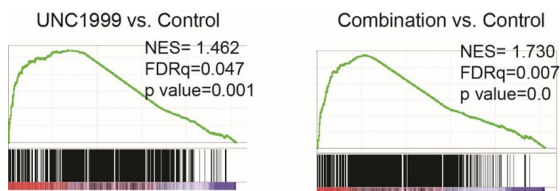
この効果は患者由来の骨髄間質細胞から得られた培養上清の存在下でも認められた (下図)。



UNC1999 と bortezomib との併用療法によって、フローサイトメリーによる annexin 陽性細胞の増加や(下図) ウェスタンブロット法による cleaved caspase-8, -9, -3 や cleaved PARP の増強が示され、bortezomib が誘導する apoptosis が UNC1999 によって更に増幅されるものと考えられた。



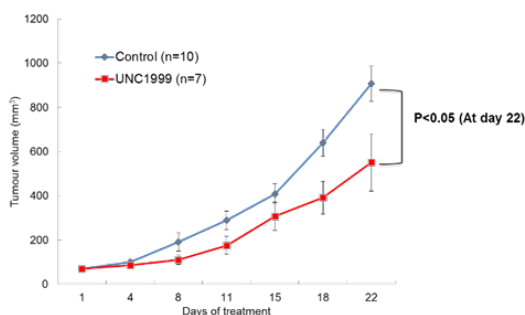
更に我々は、RNA シークエンスによる gene set enrichment analysis (GSEA) によって、UNC1999 単剤と bortezomib との併用の両者において、ポリコームの標的遺伝子が脱抑制されている事を見出した(下図)。



現在、更に詳細なメカニズム解析が進行中である。

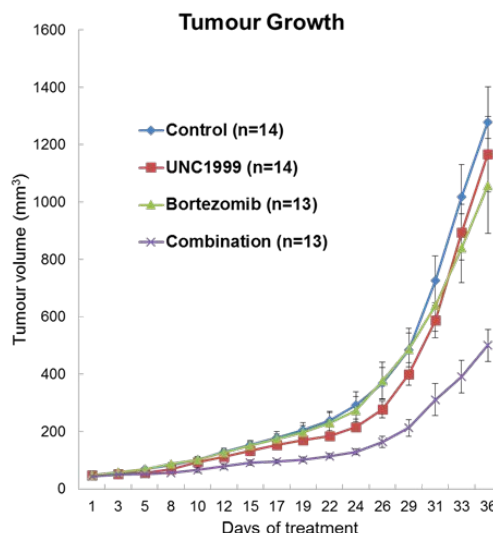
(4) EZH2 阻害剤の in vivo での抗骨髄腫効果の解析

NOG マウスを用いた MM.1S 皮下腫瘍モデルにおいて、UNC1999 (25mg/kg 週 2 回)の腹腔内投与により、単剤で有意な腫瘍増殖の抑制が示された(下図)。



また同じ xenograft モデルにおいて、少量ボルテゾミブ、減量 UNC1999 (15mg/kg 週 3 回)、両者の併用療法とを比較すると、併用療法で有意な腫瘍増殖抑制効果と生存延長を認め、

in vivo での本併用療法の効果が示された(下図)。



以上、(1)から(3)の結果より、EZH2 + EZH1 阻害剤と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たな治療戦略として有望であると言える。

(5) UTX コンディショナルノックアウトマウスの解析

現在解析中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Ola Rizq, Naoya Mimura, Motohiko Oshima, Shuhei Koide, Tohru Iseki, Chiaki Nakaseko and Atsushi Iwama

Synergistic activity of a novel EZH2 inhibitor UNC1999 and bortezomib in multiple myeloma

第 77 回日本血液学会学術集会

2015 年 10 月 16 日 石川県立音楽堂ほか(石川県・金沢市)

2. 三村尚也, Ola Rizq, 井関徹, 中世古知昭, 岩間厚志

EZH2 阻害による多発性骨髄腫の新規治療戦略

第 49 回日本骨髄腫学会学術集会

2015 年 5 月 17 日 くまもと森都心プラザ 熊本県・熊本市)

3. Ola Rizq, Naoya Mimura, Shuhei Koide, Anqi Ma, Jian Jin, Tohru Iseki, Chiaki Nakaseko and Atsushi Iwama

EZH2 Inhibition and the Combination with Proteasome Inhibition Are Novel Potential Strategies for the Treatment of

Multiple Myeloma
56th ASH Annual Meeting, Dec.6, 2014, San
Francisco, USA
(ほか、発表内定1件)

〔図書〕(計 0 件)
(図書刊行予定1件)
〔日本臨床〕多発性骨髄腫学 2016年7月
増刊号
多発性骨髄腫におけるエピジェネティック
異常
三村尚也、岩間厚志

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 尚也 (MIMURA, Naoya)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00422220

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70244126

大島 基彦 (OHSHIMA, Motohiko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：70506287

中島 やえ子 (NAKAJIMA, Yaeko)
研究者番号：50749497

千葉大学・大学院医学研究院・日本学術振
興会特別研究員 RPD