

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09940

研究課題名(和文)ハイリスク造血器腫瘍の髄外病変に着目した新規ターゲットの探索と創薬研究

研究課題名(英文)molecular analysis and drug discovery targeting extramedullary disease in high-risk multiple myeloma

研究代表者

服部 豊 (HATTORI, Yutaka)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：20189575

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではリプログラミング遺伝子Oct4が多発性骨髄腫細胞に過剰発現することを見出し、その強制発現細胞を樹立して下流シグナルの変化を検索した。Oct4強制発現細胞では間葉系遺伝子発現が增强しEMT様現象を誘導すること、MRP1トランスポーターが過剰発現し薬剤耐性化に関わることがわかった。新規フタルイミド体TC11の最適化体PEG-TC11を開発し、in vivoにおける薬物動態と抗骨髄腫作用を確認した。PEG-TC11は、サリドマイド類の標的分子cereblonには結合せず、 α -tubulin、nucleophosmin-1に結合しp53非依存的にG2/M arrestを引き起こした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病、悪性リンパ腫では、薬物治療の進歩により治療する症例も多いが、多発性骨髄腫は治療があり得ない難治性造血器腫瘍であった。近年の新規薬剤の開発により予後は改善したもの、ハイリスク骨髄腫はしばしば薬剤耐性の獲得や髄外病変の形成に至り、これらは治療の深刻な妨げとなる。本研究では、ハイリスク骨髄腫におけるリプログラミングや上皮間葉系移行(EMT)を司る遺伝子の異所性発現を見出し、さらにその下流因子を検索して臨床的悪性化の分子機構を追求した。さらに、各種化合物ライブラリーをスクリーニングし、新規治療薬の開発を行い、さらにそれらの標的分子の探索を推し進めた。

研究成果の概要(英文): In this project, we found overexpression of Oct4 gene in multiple myeloma (MM) cells and also established Oct4-overexpressed MM cell lines. In the overexpressed cells, expression of mesenchymal genes such as Snail was increased, and the EMT-like morphological change was observed. Expression of MRP1 transporter proteins was also increased, and Oct-4-overexpressed cells obtained the resistance to various anti-MM drugs. We have also developed a novel phthalimide, TC11, and its optimized form, PEG-TC11. PEG-TC11 revealed strong growth inhibitory effects to MM cells in mice xenograft model. Even though TC11 and PEG-TC11 have structural similarity to thalidomide, they did not associated with the thalidomide-binding protein, cereblon, but with α -tubulin and nucleophosmin-1. By binding to α -tubulin and nucleophosmin-1, PEG-TC11 induced G2/M arrest without involvement of p53 and caused apoptosis of high-risk MM cells with p53 deletion.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 リプログラミング遺伝子 上皮間葉系移行 薬剤耐性 フタル酸 TC11 G2/M細胞周期停止

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍は、薬物治療により治癒があり得る限られた悪性腫瘍であるが、多発性骨髄腫は、未だに治癒困難な難治性造血器腫瘍である。とくに *TP53* 遺伝子欠失(*del17*)や *t(4;14)* を有する症例は、新規薬剤に対しても治療抵抗性を示し、固形がんの遠隔転移に類する髄外病変を形成しやすく、有意に予後不良であることからハイリスク骨髄腫と称される。しかし、その悪性化の分子機構については情報が全く不足している。

一方、我々はこれまでに、上皮特異的な遺伝子や上皮間葉系移行(Epithelial mesenchymal transition, EMT)関連遺伝子が多くの骨髄腫細胞に発現していることを見出してきた。すなわち骨髄腫細胞は、分化の逸脱を来し、もはや造血器腫瘍というより固形癌に近い形質を獲得してしまったのではないかという独創的な作業仮説を打ち立てた。さらに、脱分化の結果として治療抵抗性や髄外病変形成に至るのではないかと考えるようになった。また、ハイリスク骨髄腫にも有効な新規フタルイミド体 TC11 を見出し、標的分子としてシャペロン蛋白質である nucleophosmin (NPM)1 および α -tubulin を同定した。

2. 研究の目的

難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫は、近年の新規治療薬の登場により、その予後は著しく改善してきた。しかし、治療を継続する間に次第に薬剤抵抗性を獲得し、やがては致命的となる。さらに髄外病変形成例には、未だに太刀打ちできない。このような悪性形質を示す症例は、しばしば *t(4;14)* ドライバー変異や *TP53* 遺伝子欠損を有し、ハイリスク骨髄腫と称され未だ有効な治療薬は存在しない。かかる clinical unmet need を克服するために、骨髄腫細胞が有する脱分化という新しい視点からその病態を解明する。さらに、我々が有する各種化合物ライブラリーのスクリーニングを集中的にくり返し、ハイリスク骨髄腫克服薬の開発も目指す。

3. 研究の方法

(1)リプログラミング因子 (Oct4、Sox2、Nanog) の骨髄腫細胞における発現を検討した。Oct4 および Sox2 強制発現骨髄腫細胞 (Oct4/KMS21 および Sox2/KMS21) を樹立し、その下流因子発現誘導を検討し、薬剤耐性、クローン増殖性、形態変化と EMT 現象等との関連を検討した。

(2)レナリドミド長期暴露細胞を複数樹立し、その耐性化の分子機構を明らかにした。近年、レナリドミドを含む免疫調節薬(IMiDs)は、E3 コピキチンリガーゼ cereblon (CRBN) に結合することによって抗腫瘍効果、免疫賦活、催奇形性を示すと報告されている。まず、CRBN および基質群の発現変動や遺伝子変異について検討した。さらにこれらに非依存的に耐性化を示す細胞を用いて、未知のレナリドミド耐性化機構を明らかにした。

(3)新規フタルイミド体 TC11 の最適化を図り、*in vivo* における抗骨髄腫効果、マウスにおける薬物動態を評価した。さらに、TC11 最適化体の分子機構を解明するために、 α -tubulin の重合・脱重合への作用や細胞周期への影響を検討した。

(4)天然物コマロピキノンおよびその誘導体ライブラリーより、ハイリスク骨髄腫細胞にも有効な GTN024 を見出し、活性酸素種産生による骨髄腫細胞のアポトーシス誘導について検討した。さらに、安全性の高い新規誘導体のスクリーニングも行った。

4. 研究成果

(1)リプログラミング因子の骨髄腫細胞における発現の検討：骨髄腫細胞株群では、白血病細胞株群と比較して Oct4、Sox2、Nanog の複数の過剰発現が認められた。それらの機能を検討するために Oct4/KMS21 および Sox2/KMS21 を樹立した。Oct4/KMS21 および Sox2/KMS21 は、親株に比べてレナリドミド、ポマリドミドといった IMiDs のほかにもボルテゾミブ、パノビノスタット、メルファランに対して耐性を示した。また、Oct4/KMS21 および Sox2/KMS21 は、増殖能が亢進しており、サイトカイン未含有メチルセルロース培地では KMS21 親株は増殖しないがこれらはクローン増殖性を示した。また Oct4/KMS21 では、形態的に偽足を形成し、EMT 関連因子のうち mesenchymal 分子の発現上昇が認められた。

次に、文献検索により複数の論文でリプログラミング因子の下流で発現の変化が報告されている遺伝子を抽出し、それらの変動を検索した。Oct4/KMS21 では、薬剤排出ポンプ機能を有する ABCC トランスポーター群の発現が亢進しており、多剤耐性能獲得の原因の一つと推測された。cyclin D2 の発現も亢進しており、クローン増殖性との関連が示唆された。今後は、これらが骨髄腫細胞の薬剤耐性や増殖能にかかわることを立証してゆく必要がある。その他、偽足形成にかかわる細胞裏打ち分子についても検討を進め、EMT 現象との関連を追球してゆく。また、Sox2 導入細胞についても、下流因子の発現と機能について検討する必要がある。

(2)レナリドミド長期暴露細胞の薬剤耐性機構に関する検討：骨髄腫細胞株 KMS21, MUM24, KMS27, KMS34 を低濃度レナリドミド(0.5~5 μ M)存在下で半年以上培養し、耐性株 KMS21R, MUM24R, KMS27R, KMS34R を樹立した。いずれの耐性細胞も培養皿への付着性を有し、KMS34 においては紡錘上の細胞形態を呈するといった変化も認められた。薬剤耐性の分子機構を追求するために、これら 4 つの耐性細胞における IMiDs 結合分子である CRBN およびその基質 IKZF1(ikalos)、IKZF3(Aiolos)の発現の変化を検討した。その結果、KMS21R では CRBN の発現が低下しており、KMS27R では CRBN 発現に有意な変化は認められなかったが IKZF1 および IKZF3 の過剰発現が認められた。MUM24R では、CRBN-IKZF1/3 系に有意な変化は認められず、これらの遺伝子に変異も認められなかった。このことより、CRBN-IKZF1/3 系以外に耐性化にかかわる分子機構が存在すると考えられた。RNA sequence により、親株と比較して MUM24R で発現変化を来す遺伝子を網羅的に解析した。その結果、細胞接着分子、神経遊走因子、タンパク質リン酸化因子の発現が有意に変化していた。接着分子群については、特異的阻害薬添加により骨髄腫細胞のレナリドミドへの感受性の回復が認められ、今後はノックダウンにより薬剤耐性との直接的関連を立証し、克服法の開発も目指してゆく。

(3) 新規フタルイミド体 TC11 の最適化および分子機構の解明：我々が独自に見出した新規フタルイミド体 TC11 の可溶化体 PEG-TC11 の合成に成功し、*in vitro* において TC11 に比べより強いアポトーシス誘導を来すことが分かった。さらに、マウスに単回投与した場合 Cmax 値が 8 倍増加し血中薬物動態の改善が得られた。これによりマウス xenograft モデルにおいて TC11 を凌駕する腫瘍増殖遅延とアポトーシス誘導が観察された。

抗腫瘍活性の分子機構として、PEG-TC11 は α -tubulin に直接結合し、その重合阻害をきたすことによって、骨髄腫細胞を M 期細胞周期停止からアポトーシスを誘導することを明らかにした。ハイリスク骨髄腫細胞では腫瘍抑制遺伝子 TP53 腫瘍抑制遺伝子がしばし

ば欠失しているが、M 期細胞周期停止には P53 蛋白質は関与していない。したがって、*TP53* 遺伝子を欠損するハイリスク骨髄腫細胞に対しても PEG-TC11 は有効な治療薬になりうると考えられた。

我々はさらに、PEG-TC11 が標的分子である nucleophosmin1 をリン酸化することを見出した。今後、NPM1 のリン酸化亢進が、細胞分裂時の中心体の過剰複製を来し、さらには骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導するかについて検討する必要がある。

(4) 天然物コマロピキノンおよびその誘導体による骨髄腫克服薬の開発：天然化合物であるコマロピキノンおよびその誘導体群ライブラリーのスクリーニングを行い、ハイリスク骨髄腫細胞にアポトーシスを誘導する GTN024 を見出した。GTN024 は活性酸素種(ROS) を産生することによってアポトーシスを誘導するが、正常造血細胞に対しても毒性を示す。さらにスクリーニングを行い、抗腫瘍活性があったものに対しては構造改変を行い、毒性が低い GTN057 の合成に成功した。GTN057 は、SCID xenograft モデルにおいても骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導し、腫瘍血管新生の抑制効果も認められた。その薬理作用についても検討を進め、ROS 産生のみならず hepatocyte growth factor (HGF) 受容体/c-MET のチロシンキナーゼ阻害作用により骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導することも明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Ichikawa D, Nakamura M, Murota W, Osawa S, Matsushita M, Yanagawa H, Hattori Y.	4. 巻 521
2. 論文標題 A phenylphthalimide derivative, TC11, induces apoptosis by degrading MCL1 in multiple myeloma cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 252-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.119.	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 -
1. 著者名 Okayama M, Kitabatake S, Sato M, Fujimori K, Ichikawa D, Matsushita M, Suto Y, Iwasaki G, Yamada T, Kiuchi F, Hirao M, Kunieda H, Osada M, Okamoto S, Hattori Y.	4. 巻 505
2. 論文標題 A novel derivative (GTN024) from a natural product, komaroviquinone, induced the apoptosis of high-risk myeloma cells via reactive oxygen production and ER stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 787-793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.09.177.	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 Aida S, Hozumi M, Ichikawa D, Iida K, Yonemura Y, Tabata N, Yamada T, Matsushita M, Sugai T, Yanagawa H, Hattori Y.	4. 巻 493
2. 論文標題 A novel phenylphthalimide derivative, pegylated TC11, improves pharmacokinetic properties and induces apoptosis of high-risk myeloma cells via G2/M cell-cycle arrest.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophysic. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 514-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.08.159.	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 Suto Y, Sato M, Fujimori K, Kitabatake S, Okayama M, Ichikawa D, Matsushita M, Yamagiwa N, Iwasaki G, Kiuchi F, Hattori Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of the natural product komaroviquinone and related compounds aiming at a potential therapeutic lead compound for high-risk multiple myeloma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 4558-4563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2017.08.054.	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 -

1. 著者名 Matsushita M, Ozawa K, Suzuki T, Nakamura M, Nakano N, Kanchi S, Ichikawa D, Matsuki E, Sakurai M, Karigane D, Kasahara H, Tsukamoto N, Shimizu T, Mori T, Nakajima H, Okamoto S, Kawakami Y, Hattori Y	4. 巻 7
2. 論文標題 CXorf48 is a potential therapeutic target for achieving treatment-free remission in CML patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood Cancer J	6. 最初と最後の頁 e701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/bcj.2017.84.	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 辻宏樹、不藤 拓海、佐俣 光一、山元 智史、市川 大樹、松下 麻衣子、服部 豊
2. 発表標題 骨髄腫細胞においてリプログラミング遺伝子による脱分化が薬剤抵抗性とクローン増殖性を増強する
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 不藤拓海、宇於崎 涼、山口 高史、山元 智史、辻 宏樹、佐俣 光一、市川 大樹、松下 麻衣子、服部 豊
2. 発表標題 多発性骨髄腫細胞のレナリドミド耐性に関する多様な分子メカニズム
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 佐俣光一、岡山幹夫、藤森宏太、山元智史、市川大樹、松下麻衣子、須藤豊、岩崎源司、山田健人、服部豊
2. 発表標題 komaroviquinoneという天然物由来の新規化合物がin vivoにおいて抗MM活性を示す
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saito S, Matsushita M, Mori K, Yokoe S, Ichikawa D, Hattori Y.
2. 発表標題 Characteristics of Cytotoxic T Cells against Myeloma Cells for Adoptive Immunotherapy.
3. 学会等名 10th International symposium of Japanese Society of Hematology. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uozaki R, Aida S, Yamaguchi T, Yamamoto T, Kashiwazaki S, Yanagawa H, Ichikawa D, Matsushita M and Hattori Y
2. 発表標題 Elucidation of the IMiDs-Resistant Mechanism and Development of the Overcoming Drugs Inducing CRBN Independent G2/M Cell Cycle Arrest in Myeloma Cells.
3. 学会等名 60th AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition. abst 4451 2018/12/03 San Diego CA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto T, Kosaka N, Ochiya T and Hattori Y
2. 発表標題 Understanding the Role of Extracellular Vesicles in Lenalidomide-Resistance Multiple Myeloma.
3. 学会等名 60th AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition. abst 1887 2018/12/01 San Diego CA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡山幹夫、北畠翔太郎、佐藤真梨子、藤森宏太、左俣光一、市川大樹、松下麻衣子、須藤豊、岩崎源司、山田健人、木内文之、岡本真一郎、服部 豊
2. 発表標題 新規天然化合物コマロピキノン化合物の抗骨髄腫効果および構造展開
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 大阪市2018/10/14
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇於崎涼、市川大樹、松下麻衣子、服部豊
2. 発表標題 多発性骨髄腫のIMiDs抵抗性メカニズムの解明
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会 大阪国際会議場 大阪市2018/9/27
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤豊、佐藤真梨子、北畠翔太郎、藤森 宏太、岡山 幹夫、市川 大樹、松下 麻衣子、山際教之、岩崎 源司、木内 文之、服部 豊
2. 発表標題 天然物コマロピキノン及び関連化合物の骨髄腫細胞 に対する抗腫瘍活性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura M, Ichikawa D, Aida S, Hashimoto N, Murota W, Uozaki R, Okayama M, Fujimori K, Yonemura Y, Noriko Tabata N, Yanagawa H, Matsushita M, Hattori Y.
2. 発表標題 Cereblon-independent anti-myeloma pathway of TC11, a novel compound of immunomodulatory drugs.
3. 学会等名 79th Annual Meeting Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsushita M, Yokoe S, Ozawa K, Kanchi S, Ichikawa D, Matsuki E, Mori T, Okamoto S, Hattori Y.
2. 発表標題 Evaluation of a novel therapeutic target in hematological malignancies.
3. 学会等名 AACR special conference Tumor Immunology and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤森剛太、岡山 幹夫、市川 大樹、松下 麻衣子、服部 豊
2. 発表標題 天然物由来の新規コマロピキノン誘導体はP53欠損多発性骨髄腫を克服する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoe S, Matsushita M, Ozawa K, Uchiuni A, Kashiwazaki S, Ichikawa D, Hattori Y.
2. 発表標題 Establishment of KU-MEL9-specific cytotoxic T cells for the development of adoptive immunotherapy for multiple myeloma.
3. 学会等名 The 8th International Symposium2017 by Japanese Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Aida S, Ichikawa D, Iida K, Hozumi M, Nakamura M, Uozaki R, Hashimoto N, Okayama M, Yonemura Y, Tabata N, Yamada T, Matsushita M, Sugai T, Yanagawa H, Hattori Y.
2. 発表標題 PEG(E)-TC11, a novel polyethylene glycol-linked phthalimide derivative, inhibited high-risk MM cell growth in vivo and in vitro via cell cycle G2/M arrest in a CRBN-independent manner.
3. 学会等名 2017 Annual meeting of American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 會田 宗司、市川 大樹、中村 美沙、宇於崎 涼、飯田 和樹、穂積 暢史、岡山 幹夫、藤森 宏太、米村 裕子、田畠 典子、山田 健人、松下 麻衣子、須貝 威、柳川 弘志、服部 豊
2. 発表標題 PEG(E)-TC11は、CRBN非依存的に細胞周期の調節を介してハイリスク骨髄腫の増殖を抑制する。
3. 学会等名 第42回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2017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	木内 文之 (KIUCHI Fumiyuki) (60161402)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授 (32612)	
研究 分担者	山田 健人 (YAMADA Taketo) (60230463)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究 協力者	柳川 弘志 (YANAGAWA Hiroshi)	慶應義塾大学・薬学部・教授	TC11, PEG-TC11の合成、供与
研究 協力者	須藤 豊 (SUTO Yutaka)	高崎健康福祉大学・有機合成化学・准教授	コマロピキノン誘導体の合成、供与