

令和元年5月24日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K09853
研究課題名(和文) 選択的HDAC class IIa阻害剤による新規多発性骨髄腫治療法の開発

研究課題名(英文) selective HDAC class IIa inhibition against myeloma

研究代表者
菊地 尚平(Kikuchi, Shohei)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80515792
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫に対して、新規薬剤であるクラスIIa選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の治療可能性を示し、その機序として、効率的なアポトーシス誘導を応用した治療戦略性を検討した。クラスIIa選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により、骨髄腫細胞において、ある特定のアポトーシス誘導膜蛋白の発現が増強されることを示し、ほかアポトーシス誘導可能性のある治療薬との併用によりより効率的な細胞増殖抑制効果が認められることを示した。より効率的なアポトーシス誘導を介して、薬剤耐性の克服が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで十分研究されてこなかったクラスIIa選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果および作用機序を解析し、多発性骨髄腫における新たな治療戦略の可能性を示した。クラスIIa選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤より効率的なアポトーシス誘導の治療戦略開発を目指しており、薬剤耐性の克服などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase (HDAC) are the enzyme acting on the epigenetic regulation. The aberrant recruitment of HDAC occurs in cancer cells and it's associated with the onset and progression of cancer. Therefore HDAC inhibitors (HDACi) emerged as new cancer target and have been extensively investigated. In multiple myeloma (MM), non-selective and Class I or Class IIb-selective HDACi have shown the biological efficacy in preclinical setting. In clinical trials, non-selective HDACi (panobinostat and vorinostat) and Class I-selective HDACi (romidepsin) show clinical efficacy. However biologic significance of class IIa HDACs (HDAC4, HDAC5, HDAC7 and HDAC9) in cancer cells including MM has not yet been elucidated. Single agent therapy of TMP269 showed mild cytotoxic effect against MM cell lines. Death receptor-5 expression was upregulated by the TMP269 treatment in dose dependent fashion, suggesting apoptotic pathway was enhanced by the HDAC class IIa inhibition.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：HDAC阻害剤 多発性骨髄腫 アポトーシス誘導

1. 研究開始当初の背景

Proteasome inhibitor や **IMiDs** の登場により多発性骨髄腫 (**MM**) の治療成績は大幅に向上したが、再発・難治症例では、根治は期待できない。ヒストン脱アセチル化酵素 (**HDAC**) の異常発現が、腫瘍の発症と進展に関与することから (**Bolden JE, et al. Nature reviews Drug discovery 2006;5(9): 769-784**), **HDAC** 阻害剤が、**MM** に対して広く研究され、臨床応用されはじめている。国際共同第3相臨床試験 **PANORAMA-1** 試験において、**HDAC** 阻害剤 **Panobinostat** は、**Bortezomib** および **Dexamethazone** 併用療法に対する、有意な **Progression free survival** の上乘せ効果を示し (**San-Miguel et al. Lancet Oncol.2014;15(11):1195-1206**)、本邦でも新たに臨床応用が始まるが、重篤な下痢、血小板減少などの有害事象が問題視されている。**HDAC** は、**Class** から分類されるが、**Panobinostat** を含む現在臨床応用可能な **HDAC** 阻害剤は、非選択的に **HDAC** を阻害する **pan-inhibitor** である。抗腫瘍効果を維持しかつ有害事象を軽減させうる手段として、**Class** 選択的あるいは **Isoform** 選択的な **HDAC** 阻害剤の開発、研究が期待されている。

HDAC Class は、さらに **Class a (HDAC4,5,7,9)** および **b (HDAC6,10)** に細分化される。申請者らは、**HDAC Class a** が **ER stress** 下で誘導される転写調節因子 **activating transcription factor 4 (ATF4)** を直接的に阻害して、アポトーシスを抑制していることに着目し、選択的 **HDAC Class a** 阻害剤 **TMP269** が、**Proteasome inhibitor, Carfilzomib** 誘導下の **ER** ストレス環境下で、**ATF4** 下流のアポトーシス促進転写調節因子 **C/EBP homologous protein (CHOP)** の発現増強を介して、強力なアポトーシスを誘導、**Carfilzomib** との強力な相乗効果を示して抗腫瘍効果を増強することを報告し (**Kikuchi S, et al. Leukemia 2015; 29(9):1918-27.**), **HDAC Class a** が化学療法のターゲットとなりうることを初めて明らかとした。

さらに申請者らは、**TMP269** が単剤でもアポトーシスを誘導することを、**PARP** および **Caspase-3** の **Cleaved form (CF)** から確認し、誘導されるアポトーシスが **Caspase-8** の **CF** を認めたことから、**Death Receptor (DR)** 刺激を介した外因性経路有意であることを見出した。

HDAC が **TRAIL** 誘導性アポトーシスに関与しうことはこれまで、乳がん細胞株や急性骨髄性白血症細胞株を用いた実験などから報告されているが (**Fuluda S, et al. Exp Cell Res. 2012;318(11):1208-12.**) **HDAC** のどの **isoform** が関与するかなどその詳細な機序に関しては、いまだ明らかとされていない。申請者らは、さらに、**MM** におけるすべての **DR** および **Death decoy receptor** を解析して、**TRAIL receptor** である **DR5** が **TMP269** により濃度依存性に発現増強されることを見出し、**DR5** の発現に、**HDAC Class a** が関与している可能性が考慮された。これらの結果から、腫瘍細胞が **HDAC Class a** の異常動員を介して、**DR5** の発現を抑制することで、抗アポトーシス機能を獲得して生存しているとの仮説が考えられた。

先の申請者らの **ER** ストレス関連アポトーシスを利用した **TMP269** の研究では、**Tunicamycin** や **Proteasome inhibitor** などの **ER stress inducer** との併用下でなければ、強力なアポトーシスを誘導できないという弱点があったが、この **DR** 誘導をうまく利用すれば、**ER** ストレス環境に左右されないアポトーシス誘導が可能である。本研究では、**HDAC Class a** が **MM** 細胞において、**DR5** の発現および機能に関与することを明らかとし、選択的 **HDAC Class a** 阻害剤による **DR5** の発現誘導を応用した強力かつ効率的にアポトーシスを誘導する新規 **MM** 治療の開発を目的とする。

2. 研究の目的

多発骨髄腫 (**MM**) 治療において **HDAC** 阻害剤が注目されているが、下痢、血小板減少など重篤な有害事象が問題視されている。現在臨床応用可能な **HDAC** 阻害剤は、4 つに分類される **HDAC** 各 **class** を非選択的に阻害するが、有害事象軽減の手段として、**class** 選択的な **HDAC** 阻害剤の開発が期待されている。申請者らは、すでに選択的 **HDAC class a** 阻害剤が **Proteasome inhibitor** との強力な相乗効果を有し、有望な抗腫瘍効果をもたらすことを報告したが、**preliminary data** として、**HDAC class a** 阻害剤が **Death receptor (DR)** 発現を誘導することを見出している (**Kikuchi S, et al. Leukemia 2015**)。本研究では、**MM** 細胞が、**HDAC class a** の異常動員による **DR** 発現抑制を介して、抗アポトーシス作用を獲得しているとの仮説を検証し、選択的 **HDAC class a** 阻害剤による **DR** 誘導を応用した新規 **MM** 治療の開発を目的とする。

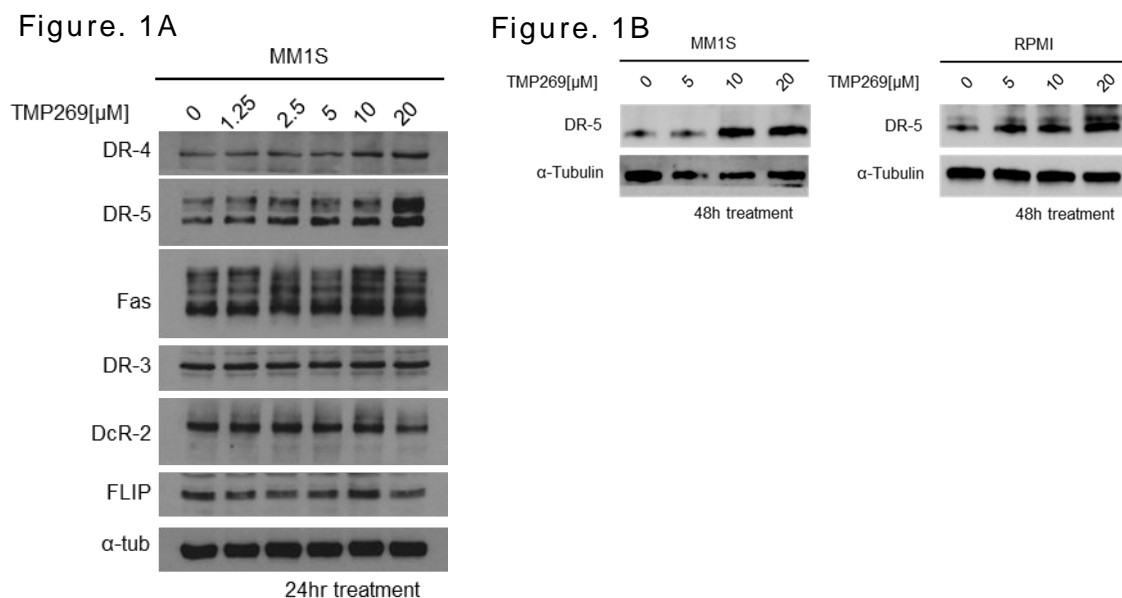
3. 研究の方法

- (1) 選択的 **HDAC Class IIa** 阻害剤によるアポトーシス関連膜蛋白発現変化の網羅的解析
選択的 **HDAC class IIa** 阻害剤 **TMP269** を指定の濃度にて **MM** 細胞株を 48 時間処理し、**Death receptor** 関連のアポトーシス関連蛋白の発現変化をウエスタンブロッティング法により解析する。

- (2) FasL および TRAIL によるアポトーシス誘導下での細胞増殖抑制経過の検討
 96 穴プレートに MM 細胞株を播種し、TMP269 および FasL あるいは TRAIL のアポトーシス誘導蛋白処理を行い、それぞれ 48 時間後の細胞数を MTT アッセイを用いて、検討する。44 時間時点で、MTT 液を各ウエルに添加し、48 時間時点で、HCL 添加イソプロパノール溶液を加えて、MTT 液を可溶化し、吸光度をプレートリーダーにて計測する。570nm の吸光度を計測波長として、650nm を参考波長として、吸光度を算出し、コントロール群を 100% として、細胞増殖抑制効果を % で算出した。
- (3) IAP 阻害剤による細胞増殖抑制効果の検討
 前述の MTT アッセイを用いて、MM 細胞株に対する IAP 阻害剤 Birinapant の指定濃度での細胞増殖抑制効果を検討した。
- (4) IAP 阻害剤によるアポトーシス誘導の解析
 ウェスタンブロッティング法を用いて、PARP、Caspase-8 および-9 の FL および CF の発現変化を検出し、内因性、外因性アポトーシス誘導について検討した。
- (5) TMP269 と Birinapant による相乗効果の検討
 MTT アッセイを用いて、TMP269 あるいは Birinapant 単剤および併用での細胞増殖抑制効果を検討した。相乗効果は、Public open のソフトウェアである Compusyn software を用いて、Combination index を算出し、相乗効果の有無を判定した。

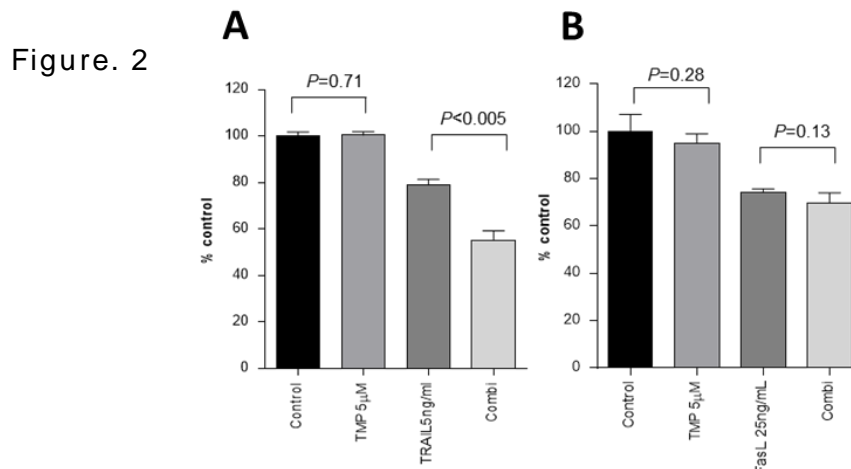
4 . 研究成果

- (1) TMP269 による DR 発現効果の増強
 MM 細胞株 MM1S を用いて、選択的 HDAC class IIa 阻害薬 TMP269 処理による DR-4、DR-5、DcR-2 等受容体を含む外因性アポトーシス誘導に關与する膜蛋白の発現変化をウェスタンブロッティング法を用いて網羅的に解析を行った。
 TRAIL 受容体である DR-5 の発現が、TMP269 濃度依存性に増強していることが認められた。(Figure 1A) さらに、TMP269 による DR-5 発現増強効果は、同じ MM 細胞株である RPMI においても認められた。(Figure 1B)



- (2) DR5 発現亢進によるアポトーシス誘導効果の増強
 次に、TMP269 による DR-5 発現増強効果が、実際に TRAIL 刺激による細胞増殖抑制効果を惹起するかを MTT アッセイを用いて検証した。
 TMP269 単独では、細胞増殖抑制効果をきたさない濃度設定として、TRAIL 5 μg/ml 単独添加群と併用群とを比較した。TRAIL 単独添加群と比較し、併用群は、有意な細胞増殖抑制効果が認められた。(Figure 2A) さらに、TMP269 添加による細胞増殖極性硬化の増強は、FasL 併用 TMP269 群においては、認められなかった。(Figure 2B)

以上の結果から、TMP269 添加による細胞増殖抑制効果の増強は、DR-5 発現増強を介した外因性アポトーシス誘導による結果と考えられた。

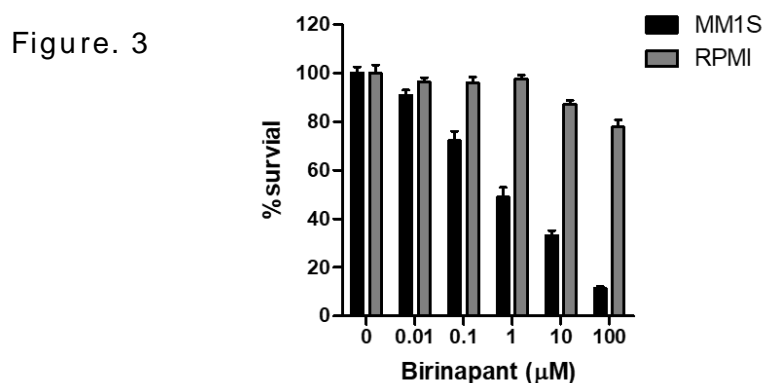


(3) IAP 阻害剤 Birinapant による MM 細胞株に対する細胞増殖抑制効果

申請者らの TMP269 による先行論文 (Kikuchi S, et al. *Leukemia* 2015; 29(9):1918-27.) では、TMP269 単独療法での MM に対する細胞増殖抑制効果は限定的であった。よって、より効率的なアポトーシス誘導を惹起しうる併用薬剤を必要とするが、前述の DR-5 発現増強効果を利用して、より効率的なアポトーシス誘導を惹起する併用薬として Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP) 阻害剤の併用を検討した。

IAP には、cIAP1,2 や XIAP が含まれるが、主にアポトーシス誘導に関する Caspase を阻害し、細胞を保護的に関与している。腫瘍細胞においては、IAP の誘導により腫瘍細胞の生存や化学療法耐性に関する可能性が示唆され、ひろく化学療法のターゲットとして、検討されている。IAP は、内因性、外因性アポトーシス誘導に関する Caspase 3, 7, 8, 9 に対して抑制的に関与しており、(Derakhshan, et al. *Clin Cancer Res*; 23(6); 1379-87.) IAP 阻害剤によりこれらの抗アポトーシス作用を解除することでより効果的なアポトーシス誘導が期待された。

まず、IAP 阻害剤 Birinapant 単独での、MM 細胞株に対する細胞増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて、検討した。Birinapant は、MM に対して、単独では細胞増殖抑制効果は極めて限定的であった。MM1S に対しては、1 から 10 µM 範囲に IC50 が認められたが、RPMI に対しては、最大濃度 100 µM においても、IC50 に達しず、ほとんど効果が認められなかった。(Figure 3)



細胞増殖抑制効果の認められた MM1S を用いて、Birinapant による細胞増殖抑制効果の機序について、解析を行った。TRAIL 刺激により細胞増殖抑制効果は増強しており、Birinapant によるアポトーシス誘導が認められた。(Figure 4)

さらに、ウエスタンブロッティング法を用いて、Birinapant 処理後のアポトーシス誘導状況および各カスパーゼの発現状況を検討した。まず、PARP の FL の発現低下および CF の発現増強を認めており、Birinapant による MM1S に対する細胞増殖抑制効果が、アポトーシス誘導によるものが直接的に示された。さらに、Caspase-8 および Caspase-9 の CF の発現増強認められており、Birinapant により内因性および外因性のアポトーシス誘導効果が示された。(Figure 5)

Figure. 4

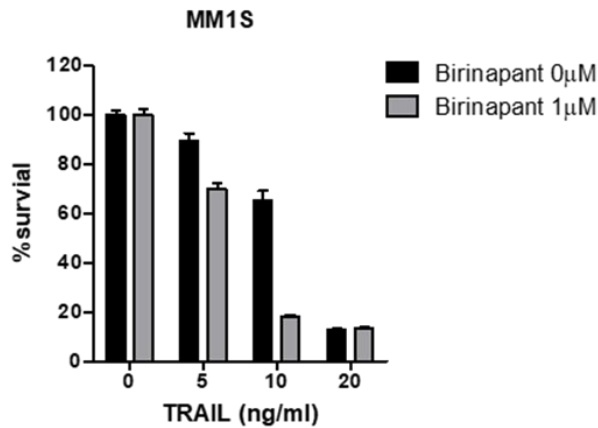
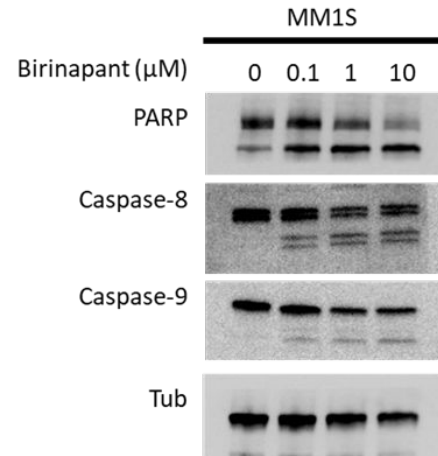


Figure. 5

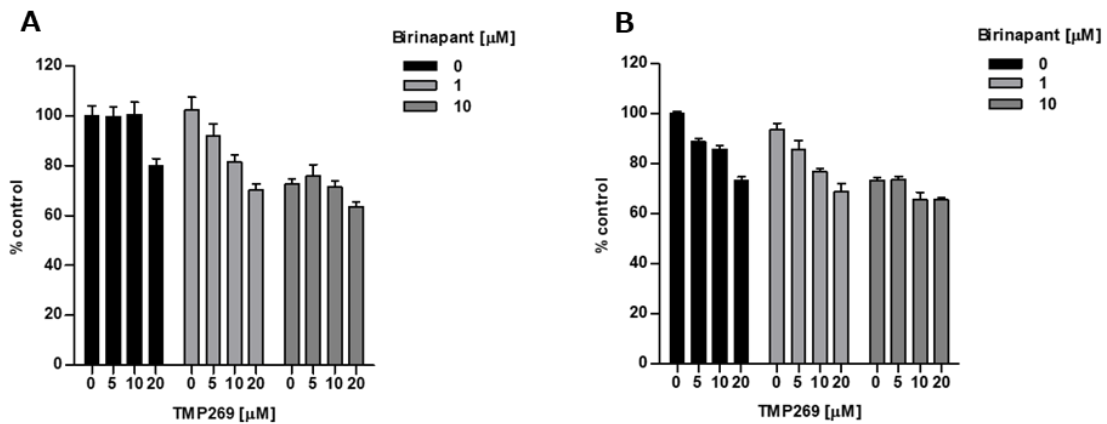


(4) TMP269 と Birinapant の相乗効果の検討

上記の結果から、TMP269 による DR-5 誘導効果および Birinapant による内因性、外因性抗アポトーシス効果の解除を期待して、二剤併用療法での、細胞増殖抑制効果を検討した。

MM1S (Figure 6A) および RPMI (Figure 6B) において、単独療法よりも併用療法において、細胞増殖抑制効果が増強する傾向が認められた。

Figure. 6



相乗効果を検討するために、Compusyn software を用いて、Combination index の検討を行った。

MM1S (Table 1) RPMI (Table 2) いずれにおいても、Birinapant 1 μM の少量 Dose においては、Combination index <1 となり、相乗効果が認められた。しかし、10 μM では、安定した相乗効果は発揮されなかった。

Table. 1 CI of MM1S

Dose TMP	Dose Biri	Effect	CI
5.0	1.0	0.479	0.90372
10.0	1.0	0.423	0.61789
20.0	1.0	0.367	0.46505
5.0	10.0	0.379	1.11361
10.0	10.0	0.373	1.11868
20.0	10.0	0.332	0.69722

Table. 2 CI of RPMI

Dose Biri	Dose TMP	Effect	CI
1.0	5.0	0.765	0.98807
1.0	10.0	0.685	0.70977
1.0	20.0	0.613	0.67518
10.0	5.0	0.658	1.2557
10.0	10.0	0.588	0.7642
10.0	20.0	0.587	1.00282

選択的 HDAC class IIa 阻害剤と IAP 阻害剤の併用は、細胞増殖抑制の増強傾向は認められたものの十分な相乗効果は得られなかった。アポトーシス分子の発現解析や、他の阻害剤の併用を検討し、より効率的なアポトーシス誘導治療の確立をめざす。

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〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。