

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08872

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫に対するRSK2標的化創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery targeted against RSK2 in multiple myeloma

研究代表者

黒田 純也 (JUNYA, KURODA)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70433258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は既存の治療戦略による完治が困難な難治性造血器腫瘍である。研究代表者らは、同疾患においてセリン・スレオニンキナーゼ RSK2のN末端キナーゼドメインが新規の治療標的分子に成り得る可能性を発見していたことから、本研究では「多発性骨髄腫に対するRSK2を標的とした創薬開発」を目指した研究を行った。その結果、RSK2/AKT/S6K同時阻害の強力な抗腫瘍効果の理論的基盤を確立し、その制御を可能とするリード化合物として複数の5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6(7H)-one誘導体を同定した。今後、前臨床試験を通じて、創薬開発へと更に研究を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRSK2の機能をAKT, S6Kが補完すること、これらを同時に阻害することでMYCやMTOR、VEGF、各種の造腫瘍性サイトカインシグナルの同時ブロックが可能となり強力な抗腫瘍効果が得られることを見出した。これまでヒトに治療薬として投与可能なRSK2標的薬は臨床実装化されていないが、本研究においてRSK2/AKT/S6Kの同時制御を可能とするリード化合物として複数の5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6(7H)-one誘導体を同定したことは、今後の創薬開発にむけて重要な成果を得たものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is cytogenetically and molecularly complex and heterogeneous and remains a difficult-to-treat hematologic malignancy with currently available therapeutics. Based on the previous studies suggesting the N-terminal kinase domain (NTKD) of RSK2, a serine-threonine kinase, as a novel potential therapeutic molecular target for MM, this study aimed the drug discovery of RSK2-NTKD-targeted therapeutic against MM. As the result, we in this study developed the therapeutic rationale for the simultaneous targeting of RSK2-NTKD/AKT/S6K for MM, as the combinatory blockade of those three molecules enables the blockade of several critical molecular pathways for MM pathophysiology. Then, we discovered several derivatives of 5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6(7H)-one as potential lead compounds for the simultaneous targeting of RSK2-NTKD/AKT/S6K in myeloma cells. We will further extend our research for drug development based on these results in the future.

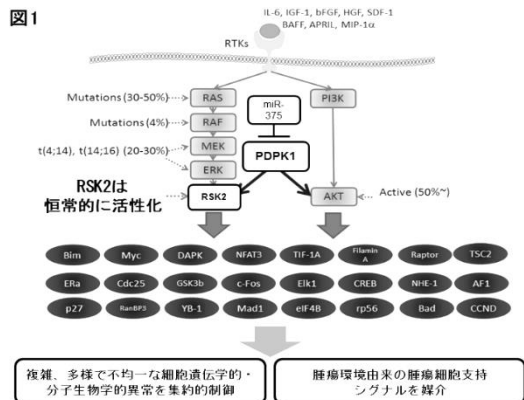
研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 RSK2 AKT 分子標的 創薬 小分子化合物

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(Multiple myeloma; MM)は、造血器悪性腫瘍において 2 番目に高頻度の疾患であり、高齢化社会において患者数は増加の一途にある。MM は既存の抗癌剤治療では治癒困難であり、かつては平均生存期間は約 3 年とされてきた。近年、各種の新規薬剤の臨床開発により治療後は大幅に改善し、平均生存期間は 5-7 年程度に延長したが、今尚、MM は最終的にはあらゆる治療に対して抵抗性を獲得し、ほぼ全例が致死性の転帰をたどることに変わりはない。開発が進められている CAR-T 療法等の細胞治療も期待は高い一方、極めて高額な医療費を要するほか、高齢者では安全性に懸念が残る治療戦略であり、高齢者に好発し、ほぼ全例が致死性の転帰を辿る MM では、その適応範囲について慎重な議論が必要となる。より多くの症例が身体的・社会的背景の相違に関わらず享受でき、かつ、普遍的有効性を期待しうる治療戦略は未開発と言え、至適分子標的の同定に基づいた治療薬剤の開発が重要課題として残された閉塞状況は今も継続している。

MMの病態形成は、多彩な分子生物学的異常が経時的に重複して獲得され、クローン性進化を遂げることで進行する多段階過程をとる。先行研究からは骨髄腫細胞一細胞あたり 30~100 のミスセンス・ナンセンス遺伝子変異が存在するとされるが、一方で疾患特異的・普遍的遺伝子異常は存在しない。同時に、診断時点で遺伝子変異パターンの異なる平均 4~6 サブクローンが個々の症例において共存し、治療経過中に高度悪性形質を獲得したブランチクローンが優位に増殖する過程も想定されており、こうした「分子生物学的多様性と不均一性を伴うクローン性進化」がMMの大きな特徴である。一方、骨髄腫細胞は骨髄腫瘍環境における骨髄間質細胞やサイトカインによる支持によっても細胞増殖能、細胞死抵抗性が促進される。すなわち、MMの克服には「高度の inter-patient diversity と intra-clonal heterogeneity を有する多様で複雑な分子異常」と「腫瘍環境による疾患形成支持」を集約的に制御しうる分子メカニズムを同定し、治療戦略を開発することが理想的である。



MM では疾患特異的染色体異常や RAS、RAF などの遺伝子異常などの多様な分子生物学的異常や腫瘍環境由来シグナルによって RAS/RAF/MEK/ERK シグナル経路(RAS 経路)が過剰活性化し、その発症・病態悪化に中心的な役割を果たす(図 1)。この為、これまで RAS、RAF、MEK 等を標的とした治療薬の開発が試みられてきたが、これら上流分子を標的とした創薬開発はいずれも失敗に終わってきた。研究代表者は、その原因の解明と克服戦略の開発のための研究を継続する過程において、骨髄腫細胞における疾患普遍的な分子制御異常として、RAS 経路の最後尾においてシグナル媒介分子として機能するセリン・スレオニンキナーゼ RSK2 の N 末端キナーゼドメイン(N-terminal kinase domain: NTKD)の恒常的活性化を見出した。重要なことに骨髄腫細胞では、(i) RSK2 NTKD は、検討した骨髄腫細胞株全 11 株、患者由来骨髄腫細胞では 90%以上の症例において恒常的に過剰活性化状態にあり、(ii) その活性化は PDK1 活性化という疾患特有のメカニズムによるもので、腫瘍環境由来や RAS 経路上流シグナル分子の活性化状態、染色体・遺伝子変異に非依存的事であること、(iii) RSK2 は c-MYC、IRF4、cyclin D など MM の病態形成に必須の多くの分子を重複制御することで、骨髄腫細胞の細胞生存、アポトーシス抵抗性、細胞増殖を制御する中心的役割を果たすこと、よって、(iv) RSK2 の上流分子である RAS や RAF、MEK を阻害しても RSK2 の活性は保持され、下流のエフェクター分子を制御し続ける (Shimura Y, Mol Cancer Ther 2012; Chinen Y, Cancer Res 2014; Tatekawa S, Br J Haematol 2017) (図 1)。多様で不均一な分子異常を呈する MM において、RSK2 の恒常的活性化は、MM の疾患形成と治療抵抗性に関わる多彩な腫瘍生物学的イベントに広く関わる普遍的な分子制御異常であり、完治を導く革新的標的候補として、論理的基盤が整備されたものと期待される。しかしまばら、一方で、ヒトに投与可能な RSK2-NTKD 阻害を可能とする治療薬は未開発であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では「MMに対するRSK2を標的とした創薬開発」を目指す。具体的には、MMにおけるRSK2被制御分子をメルクマールとして特定し、細胞ベースアッセイを用いてヒット化合物のスクリーニングを行う。こうして候補化されたヒット化合物の中から、各種の異なる分子異常を有するMMにおいて横断的な抗腫瘍効果を有し、かつ、既存治療薬に対する抵抗性細胞に対しても有効な化合物を*in vitro*、ならびに前臨床モデルによって特定し、MMに対するRSK2標的化リード化合物の選定へと展開することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) MM細胞におけるRSK2被制御分子の網羅的解析とメルクマール遺伝子の特定

レンチウイルスベクターを用いてRSK2発現抑制を行い、複数の骨髄腫細胞株に普遍的に誘導される遺伝子発現変化を網羅的に解析した。これによりヒット化合物スクリーニングの際に候補化合物がRSK2を標的とした遺伝子発現制御効果を発揮したことを示す複数のメルクマール遺伝子を特定した。

(2) RSK2を標的としたヒット・リード化合物の探索

①メルクマール遺伝子発現の検討のための細胞ベースアッセイ系の確立

メルクマール遺伝子について細胞レベルでの化合物によるメルクマール遺伝子mRNAの発現変化を測定しうるシステムを構築した。

②大規模ライブラリーを活用したスクリーニングによるヒット化合物候補の探索

細胞ベースアッセイでメルクマール遺伝子の発現変化をもたらすヒット化合物候補を各種の大規模化合物ライブラリー等から探索した。

(3) RSK2阻害による分子生物学的効果の解析に抗腫瘍効果増強戦略の開発

RSK2キナーゼ活性抑制、発現抑制による分子生物学効果を各種の網羅的解析に基き検討し、RSK2機能抑制の抗腫瘍効果を増強する更なる標的分子を特定した。

(4) RSK2/AKT/S6K機能抑制能を有するヒット化合物の特定、ならびにリード化合物の選定

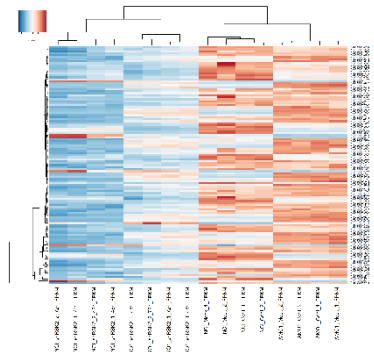
MM細胞株、患者由来初代骨髄腫細胞に対する*in vitro*での効果の検討

ヒット化合物候補について、その分子効果、抗腫瘍効果を骨髄腫由来細胞株、患者由来骨髄腫細胞において検討した。患者由来骨髄腫細胞はMM患者骨髄検体から抗CD138ビーズ法を用いて単離した。

4. 研究成果

(1) MM細胞におけるRSK2被制御分子の網羅的解析とメルクマール遺伝子の特定

レンチウイルスベクターを用いてRSK2発現抑制を行い、複数の骨髄腫細胞株に普遍的に誘導される遺伝子発現変化を網羅的に解析した(右図)。その結果、RSK2阻害によって、分子生物学的異常の多様性に関わらず複数の骨髄腫由来細胞に横断的に、YPEL3, BTG2, FAM46C, ARRDC3など複数の癌抑制遺伝子が同時に誘導され、RSK2阻害による抗腫瘍効果発現のメルクマールとなる分子と考えられた。

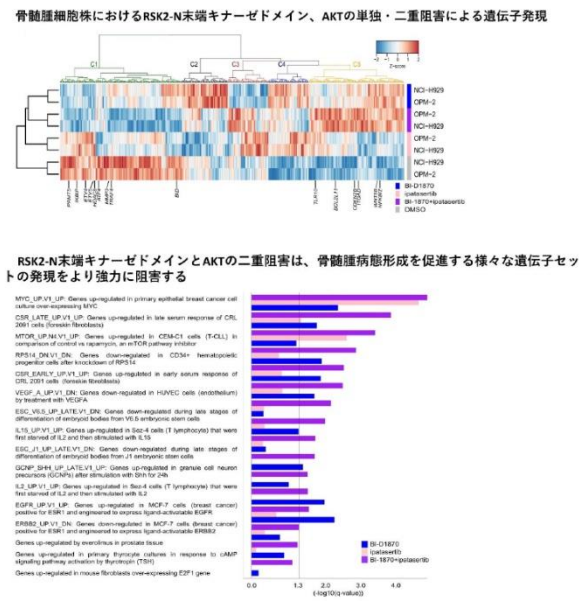


(2) RSK2を標的としたヒット・リード化合物の探索

候補化合物の活性はRSK2-NTKDの標的分子であるYB-1の抑制活性を検討するとともに、上記のメルクマール遺伝子について細胞レベルでの化合物によるメルクマール遺伝子mRNAの発現変化を測定しうるシステムを定量的PCRにより判定するスクリーニング系を最適化した。

(3) RSK2阻害による分子生物学的効果の解析に抗腫瘍効果増強戦略の開発

RSK2キナーゼ活性抑制、発現抑制による分子生物学効果を各種の網羅的解析に基く検討により、RSK2阻害に際して、AKT, S6Kが補完的に機能し、抗腫瘍効果に対する抵抗性の原因となることが示唆された。他方、RSK2/AKTの同時阻害により、強力にMYC被制御遺伝子、mTOR被制御遺伝子、リボゾームバイオジェネシス関連分子、サイトカイン・ケモカイン誘導性細胞活性化分子など、骨髄腫細胞の増殖、生存、治療抵抗性獲得などを普遍的に支配する数多くの遺伝子・分子を多重に制御することが可能になり、その結果、遺伝子異常や染色体異常のパターンの異なる多様な骨髄腫細胞に対して、普遍的に強力な抗腫瘍効果を誘導しうることを明らかにし(右図)(Isa R, et al. Int J Mol Sci 2022)、以後の研究では、RSK2/AKT/S6Kの同時阻害を実現し得る化合物の探索が目標となった。



(4) RSK2/AKT/S6K機能抑制能を有するヒット化合物の特定、ならびにリード化合物の選定
上記の結果を理論的基盤とし、化合物ライブラリーでの検討を重ね、複数の5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6(7H)-one誘導体がRSK2/AKT/AKT同時阻害を可能とするリード化合物として候補化した。

(5) MM細胞株、患者由来初代骨髄腫細胞に対する*in vitro*での効果の検討
ヒット化合物候補について、その分子効果、抗腫瘍効果を骨髄腫由来細胞株、患者由来CD138陽性骨髄腫細胞において検討中である。細胞株について10種、患者由来骨髄腫細胞では現在までに20症例以上について検討済みであり、複数のリード化合物について、少なくとも良好な抗腫瘍効果を*in vitro*で認めている(未発表データ)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nishiyama D, Chinen Y, Isa R, Fujibayashi Y, Kuwahara-Ota S, Yamaguchi J, Takimoto-Shimomura T, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Handa H, Kuroda J.	4. 巻 113
2. 論文標題 EWSR1 overexpression is a pro-oncogenic event in multiple myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 381-394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-03027-0	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 Fujibayashi Y, Isa R, Nishiyama D, Sakamoto-Inada N, Kawasumi N, Yamaguchi J, Kuwahara-Ota S, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Chinen Y, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Handa H, Kuroda J	4. 巻 12
2. 論文標題 Aberrant BUB1 Overexpression Promotes Mitotic Segregation Errors and Chromosomal Instability in Multiple Myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12082206	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 Shimura Y, Tsukamoto T, Yamaguchi J, Kuwahara-Ota S, Isa R, Nishiyama D, Kobayashi T, Horiike S, Suzuki A, Kuroda J	4. 巻 112
2. 論文標題 Toward further simplification of elotuzumab therapy by subcutaneous administration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 427-428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02942-6	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 Kuwahara-Ota S, Shimura Y, Steinebach C, Isa R, Yamaguchi J, Nishiyama D, Fujibayashi Y, Takimoto-Shimomura T, Mizuno Y, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Chinen Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Gutschow M, Kuroda J	4. 巻 191
2. 論文標題 Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 784-795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.16881	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 該当する

1. 著者名 Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Shimura Y, Chinen Y, Tanba K, Kuwahara-Ota S, Fujibayashi Y, Nishiyama D, Isa R, Yamaguchi J, Kawaji-Kanayama Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Serine-227 in the N-terminal kinase domain of RSK2 is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 5185-5199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3136	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 Chinen Y, Tsukamoto T, Maegawa-Matsui S, Matsumura-Kimoto Y, Takimoto-Shimomura T, Tanba K, Mizuno Y, Fujibayashi Y, Kuwahara-Ota S, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J.	4. 巻 84
2. 論文標題 Tumor-specific transcript variants of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and multiple myeloma with chromosome 11q13 abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2020.02.004	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 Isa R, Horinaka M, Tsukamoto T, Mizuhara K, Fujibayashi Y, Taminishi-Katsuragawa Y, Okamoto H, Yasuda S, Kawaji-Kanayama Y, Matsumura-Kimoto Y, Mizutani S, Shimura Y, Taniwaki M, Sakai T, Kuroda J.	4. 巻 23
2. 論文標題 The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062919.	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 Tsukamoto T, Tokuda Y, Nakano M, Tashiro K, Kuroda J.	4. 巻 6
2. 論文標題 Expression of activated B-cell gene signature is predictive of the outcome of follicular lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1932-1936.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005876.	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 Matsumoto Y, Tsukamoto T, Chinen Y, Shimura Y, Sasaki N, Nagoshi H, Sato R, Adachi H, Nakano M, Horiike S, Kuroda J, Taki T, Tashiro K, Taniwaki M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Detection of novel and recurrent conjoined genes in non-Hodgkin B-cell lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop.	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslirt.20033.	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7件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kimoto Y, Tsukamoto T, Shimura Y, Chinen Y, Tanba K, Ota S, Fujibayashi Y, Nishiyama D, Isa R, 1, Yamaguchi J, Kanayama Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J
2. 発表標題 RSK2Ser227 in N-terminal kinase domain is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujibayashi Y, Inada N, Kawasumi N, Ota S, Isa R, Yamaguchi J, Nishiyama D, Kimoto Y, Chinen Y, Shimura Y, Kobayashi T, Taniwaki M, Kuroda J
2. 発表標題 BUB1 overexpression may associate with karyotypic clonal evolution in multiple myeloma
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田純也
2. 発表標題 多発性骨髄腫に対する分子標的治療戦略の理論とエビデンス
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukamoto T, Tokuda Y, Nakano N, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Tashiro K, Kuroda J
2. 発表標題 Expression of activated B cell gene signature is predictive for prognosis in follicular lymphoma
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishiyama D, Chinen Y, Fujibayashi Y, Isa R, Ota S, Kimoto Y, Yamaguchi J, Tsukamoto T, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Handa H, Kuroda J
2. 発表標題 Clinical and functional significance of EWSR1 overexpression in multiple myeloma
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田純也
2. 発表標題 日常診療と形質細胞性腫瘍
3. 学会等名 日本内科学会近畿地方会生涯教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田純也
2. 発表標題 多発性骨髄腫における分子腫瘍学的多様性の克服に向けて.
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学 血液内科学教室 研究「骨髄腫」
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/hematol/study/study02.html>

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
---------	---------