

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17836

研究課題名（和文）DOT1L阻害による多発性骨髄腫の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new myeloma therapy targeting DOT1L

研究代表者

石黒 一也（Ishiguro, Kazuya）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90784439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫（MM）の病態には、ヒストン修飾が重要な役割を担っている。本研究では、DOT1L阻害による抗MM効果をさらに検証した。CRISPR研究より、MMの生存はDOT1Lに強く依存していることが示された。トランスクリプトーム解析により、DOT1Lの阻害がMM細胞の免疫反応を活性化することが明らかになった。DOT1Lの阻害はMM細胞において内因性レトロウイルス（ERV）遺伝子の発現を増加させた。一方、EZH2/G9aの共阻害もまた、ERV遺伝子の発現を増加させ、免疫反応を上昇させた。そしてEZH2阻害剤とG9a阻害剤の併用は、細胞周期停止とアポトーシスを誘導し、MM細胞の増殖を強く抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DOT1Lは唯一のH3K79メチル化酵素であり、転写活性化に関与することが知られている。DOT1L阻害剤の一つであるEPZ-5676は、MLL関連白血病の第I相試験において一定の奏効率と安全性を示した。一方、多発性骨髄腫（MM）におけるDOT1L阻害剤の効果を明らかにしたのは、我々の研究が世界初である。本研究は今後のMMにおけるDOT1L阻害剤による臨床試験など、MMの新たな治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Epigenetic mechanisms such as histone modification play key roles in the pathogenesis of multiple myeloma (MM). We previously showed that DOT1L, a histone H3 lysine 79 (H3K79) methyltransferase is a potential therapeutic target in MM. In this study, we further evaluated the antitumor effect of DOT1L inhibition in MM. CRISPR studies showed that survival of MM was strongly dependent on DOT1L. Transcriptome analysis revealed that DOT1L inhibition upregulated interferon (IFN) signaling in MM cells. Notably, DOT1L inhibition increased expression of endogenous retrovirus (ERV) genes in MM cells. On the other hand, we also found that dual EZH2/G9a inhibition also increased expression of ERV genes and upregulated IFN-stimulated genes in MM cells. A combination of an EZH2 inhibitor and a G9a inhibitor strongly suppressed MM cell proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis. These results suggest that histone modifiers may be an effective therapeutic target for MM.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(MM)は形質細胞腫瘍の一つであり、高カルシウム血症、腎機能障害、貧血、骨病変を引き起こし、生存期間中央値は2~10年と予後不良な疾患である。MMの治療法としては、骨髄腫細胞表面抗原のCD38やSLAMF7を標的としたモノクローナル抗体製剤(Daratumumab、Isatuximab、Elotuzumab)、免疫調節薬(Lenalidomide、Pomalidomide)、プロテアソーム阻害剤(Bortezomib、Carfilzomib)を組み合わせた薬物療法と自家造血幹細胞移植併用大量化学療法が中心であるが、ほぼ全ての症例は再発を繰り返し、治療抵抗性となる。よって新たな治療薬の開発が急務である。

一方で、ヒストン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティック機構の異常は、MMを含む様々な悪性腫瘍の治療標的として有望視されている。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるPanobinostatは、Bortezomib、Dexamethasoneとの併用で再発/難治性MMの治療に用いられており、一定の効果が認められている。

ヒストン修飾の中でもリジン残基のメチル化は、転写制御において重要な役割を担い、様々ながんとの関わりが知られている。ヒストンH3リジン79(H3K79)メチル化酵素であるDOT1Lは転写活性化や伸長に関与することが知られ、MLL関連白血病の他にも神経芽細胞腫、大腸がん、乳がん、前立腺がん、肺がんなどにおいて有望な治療標的と考えられている。

我々はDOT1L阻害剤SGC0946あるいはEPZ-5676が、*in vitro*において骨髄腫細胞に対して高い増殖抑制効果を示し、細胞周期停止とアポトーシスを誘導することを明らかにした。またEPZ-5676は*ex vivo*においても高い腫瘍形成抑制効果を示した。DOT1L阻害剤による抗MM効果の機序を解明するため、トランスクリプトームとエピゲノムの統合解析を行った結果、骨髄腫細胞増殖のキーとなるIRF4-MYCシグナル(IRF4、MYC、PRDM1、KLF2)の発現とH3K79ジメチル化修飾の特異的な抑制を明らかにした。

EPZ-5676はMLL関連白血病の第I相試験が行われており、主な副作用として倦怠感、吐き気、便秘、発熱性好中球減少症が報告されているが、重篤な副作用は認められていない。またMMよりも進行が急速である急性白血病において、単剤投与で完全寛解(CR)を達成した症例も報告されており、一定の奏効率が示されている。また現在急性骨髄性白血病(AML)において、DaunorubicinとCytarabineとの併用による臨床試験が進行中である。

これらの報告および我々の解析結果より、DOT1LはMMにおける新たな治療標的となり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、多発性骨髄腫におけるDOT1L阻害剤の抗腫瘍効果メカニズムの全体像を解明し、臨床応用につなげることを目的とする。多発性骨髄腫におけるDOT1Lの役割および治療標的としての有用性を明らかにしたのは本研究が世界初であり、学術的独自性の高い研究と考える。予想される結果および意義として以下の2点が挙げられる。

(1) DOT1L阻害剤の臨床応用の推進

多発性骨髄腫の治療抵抗性・再発の原因として、骨髄腫幹細胞の存在や骨髄間質細胞との相互作用が考えられる。これらに対するDOT1L阻害剤の有効性を明らかにすることで、臨床応用へ向けたさらなる基盤的知見を得ることができる。また*in vivo*マウスモデルを用いたDOT1L阻害剤の投与実験により、有効性や安全性に関する知見を得ることができる。

(2) DOT1Lの新たな標的分子の同定と、他がん腫への発展的応用に繋がる可能性

これまでの研究で応募者は、DOT1L阻害がH3K79ジメチル化(H3K79me2)に与える影響をクロマチン免疫沈降シーケンズ(ChIP-seq)解析することで、IRF4-MYCシグナルの抑制を見いだした。研究をさらに発展させるため抗DOT1L抗体を用いたChIP-seq解析の予備実験を進めており、これによりDOT1Lの標的遺伝子をゲノム網羅的に解明することが可能になる。また本研究では、DOT1L阻害剤耐性を克服しうる標的の探索も行う。一方で、DOT1LはMLL関連白血病、DOT1L高発現の肺癌・乳癌、MYCN増幅の神経芽細胞種においても治療標的となり得ることがこれまでに報告されている。本研究の知見は、これら他がん種に対する抗DOT1L治療の発展にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 多発性骨髄腫におけるDOT1Lプロファイルの網羅的解析

骨髄腫細胞株(RPMI-8226, MM.1S)を用いて、DOT1L結合領域およびH3K79me2をChIP-seqにより解析する。DOT1L阻害処理による遺伝子発現の変化をRNAシーケンズ(RNA-seq)により、オ

ーブックロマチン領域の変化を Assay for Transposase Accessible Chromatin Sequencing (ATAC-seq)により解析する。これらのデータを統合して、骨髄腫細胞における DOT1L 標的遺伝子の全体像を明らかにする。

(2) DOT1L 阻害剤感受性・抵抗性と相関する遺伝子変異の解析

応募者はこれまでに、同一患者由来の異なるサブクローンから樹立された骨髄腫細胞株である、KMS-12BM (感受性株)と KMS-12PE (抵抗性株)の DOT1L 阻害剤への感受性の違いに着目し(先頁図参照) がん関連遺伝子のターゲットシークエンスを行った。その結果、ヒストン修飾酵素の変異が薬剤感受性を規定している可能性を見出した。この知見を発展させるため、複数の DOT1L 阻害剤感受性株と抵抗性株に対して全エクソンシークエンスを行い、薬剤感受性に関わる遺伝子変異を探索する。

(3) DOT1L 阻害剤への抵抗性を克服する新規治療標的の探索

DOT1L 阻害剤に感受性および抵抗性の骨髄腫細胞株を用いて、DOT1L 阻害剤処理下で shRNA ライブラリスクリーニングを行う。生き残った細胞集団から RNA を回収し、シークエンス解析することで、DOT1L 阻害剤への感受性・抵抗性を規定する遺伝子を探索する。抵抗性に関与すると推測される遺伝子産物の阻害剤が入手可能であれば、DOT1L 阻害剤との併用による抗腫瘍効果を検証する。

(4) 骨髄腫幹細胞に対する DOT1L 阻害剤の抗腫瘍効果の検証

骨髄腫幹細胞の明確な定義は確立されていないが、複数の先行研究で CD138 陰性分画に存在すると報告されている。骨髄腫細胞株から CD138 陰性細胞を Flow cytometry により分離し、DOT1L 阻害剤(SGC0946, EPZ-5676)の抗腫瘍効果を *in vitro* で検証する。DOT1L 阻害剤処理後、あるいは shRNA レンチウイルスベクターによって DOT1L をノックダウン後に、SCID マウスに移植して *in vivo* 腫瘍形成能を評価する。

(5) 骨髄間質細胞との共培養下での DOT1L 阻害剤の有効性の検証

多発性骨髄腫臨床例から樹立した骨髄間質細胞あるいは骨髄間質細胞株(UBE6T-7)と、骨髄腫細胞株を CytoSelect 細胞共培養システムで共培養し、DOT1L 阻害剤(SGC0946, EPZ-5676)の抗腫瘍効果を検証する。

(6) *in vivo* での DOT1L 阻害剤の前臨床試験

骨髄腫細胞株を SCID マウスに皮下注射して xenograft を作成し、EPZ-5676 を充填したアルゼット浸透圧ポンプを埋め込み、DOT1L 阻害剤を持続腹腔内投与することで、その抗骨髄腫効果を評価する。

4. 研究成果

まず我々は MM の治療標的としてヒストンメチル化酵素に着目し、CRISPR/Cas9 knockout screen のデータを解析した。その結果、骨髄腫細胞株の生存が他のがん細胞株と比較して DOT1L に有意に依存し、かつ DOT1L を高発現していることを見出した。よって MM はその生存のために DOT1L に特異的に依存していることが明らかとなった。

MM における DOT1L プロファイルの網羅的解析を行うために、骨髄腫細胞株(RPMI-8226, MM.1S)を用いて、DOT1L 結合領域および H3K79me2 を ChIP-seq により解析したところ、IRF4 遺伝子のスーパーエンハンサー領域に DOT1L および H3K79me2 がエンリッチしていることが明らかとなった。よって DOT1L が MM の生存のためのキー遺伝子である IRF4 を特異的に制御しているために、MM の生存が DOT1L に強く依存していると考えられた。

最新の MM の治療は免疫治療が主流である。また MM において DOT1L 阻害によりインターフェロニンシグナルが上昇することも明らかとなっている。よって免疫系が DOT1L 阻害剤の感受性や抵抗性にも関与することが示唆されたため、我々は特に自然免疫系にも着目し、研究を進めた。我々は MM において DOT1L 阻害が免疫反応を上昇させる機序の一つとして、内在性レトロウイルス遺伝子の再活性化を見出した。

さらに他のヒストンメチル化修飾にも着目し、ヒストン H3 リジン 27 メチル化酵素(EZH2)とヒストン H3 リジン 9 メチル化酵素(G9a)の共阻害も MM において免疫反応を上昇させることを見出した。解析を進めたところ、EZH2 と G9a を共阻害することで、骨髄腫細胞の内在性レトロウイルス遺伝子を再活性化し、その結果、インターフェロニンシグナルが活性化され、抗腫瘍効果につながることを明らかにし、論文化した。

一方で DOT1L の阻害に関しても、免疫反応の上昇により抗原提示や免疫治療の効果を増強することを見出した。近日中にこれらの成果を学術雑誌に投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Maruyama R, Nishiyama N, Ohtani H, Sudo G, Toyota M, Sasaki H, Yamamoto E, Kai M, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual EZH2 and G9a inhibition suppresses multiple myeloma cell proliferation by regulating the interferon signal and IRF4-MYC axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-020-00400-0	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 Dual inhibition of EZH2 and G9a suppresses multiple myeloma cell proliferation by affecting interferon signaling
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 The anti-myeloma effect of dual EZH2 and G9a inhibition
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 Development of a new epigenetic immunotherapy for multiple myeloma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 Development of a new combinational epigenetic treatment for multiple myeloma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 EZH2とG9aの共阻害はインターフェロンシグナルの活性化とIRF-4-MYC axisの抑制により多発性骨髄腫細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第121回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 Dual inhibition of EZH2 and G9a suppresses multiple myeloma cell proliferation by affecting interferon signaling
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 多発性骨髄腫における新規エピジェネティック併用療法の開発
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 Kazuya Ishiguro
2. 発表標題 Development of a new combinational epigenetic therapy of multiple myeloma
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 多発性骨髄腫に対するDOT1L阻害の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第5回がんゲノム・エピゲノム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒一也
2. 発表標題 多発性骨髄腫に対するDOT1L阻害の抗腫瘍効果の解析
3. 学会等名 第120回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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