

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08740

研究課題名（和文）ヒストンメチル化酵素MMSETを標的とした多発性骨髄腫に対する新規治療薬の開発

研究課題名（英文）The development of a novel therapeutic agent targeting MMSET histone methyltransferase in multiple myeloma

研究代表者

古川 雄祐（Furukawa, Yusuke）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00199431

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）：MMSET活性ドメイン・精製ヌクレオソーム・抗ヒストンH3-K36me2抗体を用いたALPHAによって理化学研究所の低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、さらにMMSET陽性骨髄腫細胞株に対する選択性・H3-K36メチル化抑制・MMSET標的遺伝子の発現抑制からRK-0080552をMMSET阻害剤の候補化合物として同定した。マウス骨髄腫モデルにおいて、RK-0080552は骨髄腫細胞の増殖を抑制し、マウスの生存期間を対象群に比べて有意に延長した。治療群から採取した腫瘍組織においてH3K36メチル化とIRF4発現の抑制が認められ、抗腫瘍作用はMMSET阻害によると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMSETを強発現する多発性骨髄腫は治療抵抗性で、治療成績の改善にはMMSETを特異的標的とする新薬の開発が必須と考えられる。しかしながらMMSETを特異的に阻害する薬剤については、現在のところ基礎研究レベルでもほとんど報告がなく、本研究は非常に高いプライオリティと臨床的意義を有する。今後、安全性試験と薬物動態試験を実施して前臨床POCを取得し、GMP基準での化合物の製造に関する具体的方針を固め、製薬企業とタイ・アップして臨床治験へ展開することが可能なレベルにスキップ・アップしたい。

研究成果の概要（英文）：The prognosis of multiple myeloma (MM) has continuously improved via development of a series of novel molecular targeted drugs; however, the prognosis is still poor in cases with high-risk cytogenetic abnormalities (HRCA). Among HRCA, t(4;14) is the second most common abnormality with the prevalence of 15% in newly-diagnosed MM patients. MM cells carrying t(4;14) gain the resistance to several anti-MM drugs through the high expression of MMSET histone methyltransferase. We performed high-throughput screening in RIKEN small molecular compound libraries and identified RK-0800552 as a first-in class MMSET inhibitor. RK-0800552 exerted selective cytotoxicity against t(4;14)-positive MM cells in vitro and in vivo and showed a synergistic effect with pomalidomide in vitro and prolonged the survival of recipient mice in a murine t(4;14)-positive MM model without obvious side effects. RK-0800552 may be a candidate for a novel therapeutic agent for high-risk MM patient with t(4;14).

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 ハイリスク染色体異常 分子標的療法 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫はBリンパ球分化の最終段階に位置する形質細胞が腫瘍化した疾患で、通常の抗癌剤には反応が不良なことから、難治性腫瘍の代表とされている。日本骨髄腫学会の集計によるとアルキル化薬と副腎皮質ホルモン剤を中心とする治療を受けた患者の生存期間中央値は約3年、5年生存率は約30%であった（Ozaki et al. BCJ 5: e349, 2015）。2000年代中盤からプロテアソーム阻害剤や免疫調節薬（サリドマイドとその誘導体）などの効果的な新薬が登場し、生存期間中央値は約6年・5年生存率は約50%に延長しているが、生存曲線に tail plateau は得られず、治療戦略のさらなる向上が必要である。

多発性骨髄腫の薬剤抵抗性の要因として、染色体転座の有無とタイプが重要である。高リスク染色体異常の存在は、病期分類においても進行期の規定要因の1つで、明らかな予後不良因子となっている（Palumbo et al. JCO 33: 2863, 2015）。高リスク群骨髄腫患者の生存期間中央値は、2000年代のデータでも約2年と短く、さらなる対策が急務である（Chng et al. Leukemia 28: 269, 2014）。高リスク染色体異常には t(4;14)、t(14;16)、del(17p)の3つが含まれるが、t(4;14)が最も高頻度で全体の10~15%に検出される。

t(4;14)陽性骨髄腫細胞においては転座の結果、免疫グロブリン重鎖のエンハンサーによってヒストン H3K36 メチル化酵素 KMT3/MMSET の転写が活性化されており、発症・進展さらには治療抵抗性の原因となっている（Furukawa and Kikuchi, IJH 104: 281, 2016）。MMSET の異常発現によってヒストン H3K36 の過剰なメチル化およびヒストン H3K27 のメチル化パターンの改変がおこる（Popovic et al. PLoS Genet. 10: e1004566, 2014）。その結果、1）アポトーシス抵抗性、2）骨髄間質細胞への接着増強、3）DNA修復能の亢進などの転写プログラムが活性化され、抗がん剤や放射線に対する抵抗性が付与される（Pei et al. Nature 470: 124, 2011; Zhang et al. Cancer Discov. 9: 1306, 2019）。実際、MMSET を強発現する多発性骨髄腫においては、大量化学療法+造血幹細胞移植を行っても予後が改善しない（Corre et al. Leukemia 32: 2636, 2018）。また t(4;14)陽性クローンはプロテアソーム阻害剤や免疫調節薬などの新薬でも完全に排除することが出来ないため、MMSET を特異的標的とする新薬の開発が希求されることである。申請者らは shRNA によって MMSET 発現を抑えると、t(4;14)陽性骨髄腫細胞の増殖が抑制されると共に、種々の抗がん剤に対する感受性が亢進することを見いだした（Kikuchi et al. JCI 125: 4375, 2015）。したがって MMSET に対する特異的阻害剤は、t(4;14)陽性骨髄腫に対して直接作用と他の薬剤に対する感受性の亢進による相乗的な治療効果を発揮すると期待される。

2. 研究の目的

上記の背景より本研究においては、MMSET を特異的に阻害する薬剤を開発し、t(4;14)を有する難治性多発性骨髄腫の治療成績の向上に貢献することを目的とした。MMSET 特異的阻害剤の開発意義は明らかであるが、現在のところ基礎研究レベルでもほとんど報告がない。その理由として、MMSET タンパク質の構造解析を目的として結晶化を試みるも非常に困難であったことから、活性中心が構造的にファジィであり、化合物が結合しにくい可能性が推測された（Umehara T, personal communication）。この難点を克服するため、エピジェネティック創薬関連の実績と化合物改変のスキル、さらに具体的シーズを有する理化学研究所と有機的に連携して研究開発を進めた。

3. 研究の方法

1) 低分子化合物ライブラリーからの MMSET 阻害剤候補の選択

MMSET 活性ドメイン・精製ヌクレオソーム・抗ヒストン H3-K36me2 抗体を用いた ALPHA（Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay）を用いて理化学研究所の低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、MMSET 阻害剤の候補となる化合物を選択する。

2) MMSET 阻害効果の細胞レベルでの確認

MMSET 阻害効果を MMSET 陽性骨髄腫細胞株（KMS-11, KMS-26, KMS-28, KMS-34）に対する増殖阻害にて確認する。選択性を検証するため、MMSET 陰性骨髄腫細胞株（MM1S, RPMI8226, U266）で同様の実験を行う。さらに、ウエスタン法にて H3-K36 メチル化の抑制と H3-K27 メチル化の上昇を調べ、細胞レベルで MMSET 活性を抑制しうることを確認する。MMSET の標的遺伝子（cyclin D2, IRF-4, ITGB7, SLAMF7, 53BP1, Bcl-2, IGF-1 など）の特異的抑制を DNA マイクロアレイおよび real-time RT-PCR にて確認する。

3) 候補化合物の MMSET 阻害効果をマウス骨髄腫モデルにて確認

細胞レベルで validate された MMSET 阻害剤について、MMSET 陽性骨髄腫細胞株を移植したマウスを用いて治療効果の検証を行う。申請者らは免疫不全マウスを用いた多発性骨髄腫モデル系を確立しており、本研究も同様に実施する（Kikuchi et al. JCI 125: 4375, 2015; Kikuchi et al. Cancer Res. 78: 1766, 2018）。同時に血液検査（CBC・電解質・肝機能・腎機能）や心エコーを実施して安全性を確認する。

4. 研究成果

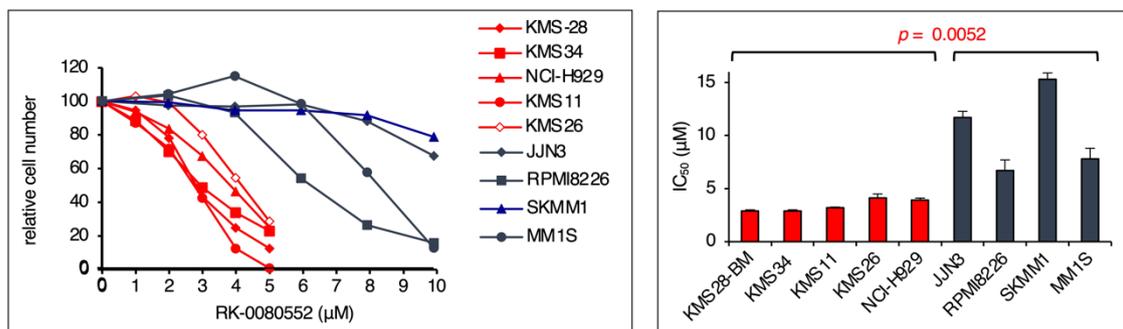
1) 低分子化合物ライブラリーからの MMSET 阻害剤候補の選択

申請者らは、MMSET 活性ドメイン・精製ヌクレオソーム・抗ヒストン H3-K36me2 抗体を用いた ALPHA (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay) によって理化学研究所の低分子化合物ライブラリーに含まれる約 60,000 化合物をスクリーニングし、一次ヒット化合物を 36 個同定した。この初期ヒット候補化合物群について、精製 MMSET のヒストンメチル化活性阻害をウエスタン法にて確認し、さらに MMSET と構造の類似するヒストンメチル化酵素 G9a および SETD2 を阻害しない 4 化合物 RK-0090552, RK-0180118, RK-0200003, RK-9189029-0-01 を選択した。この 4 化合物について、熱安定性試験 (リアルタイム熱シフトアッセイ) および等温滴定カロリーメトリーによる解離定数解析を行い、MMSET との直接的な結合を確認した。

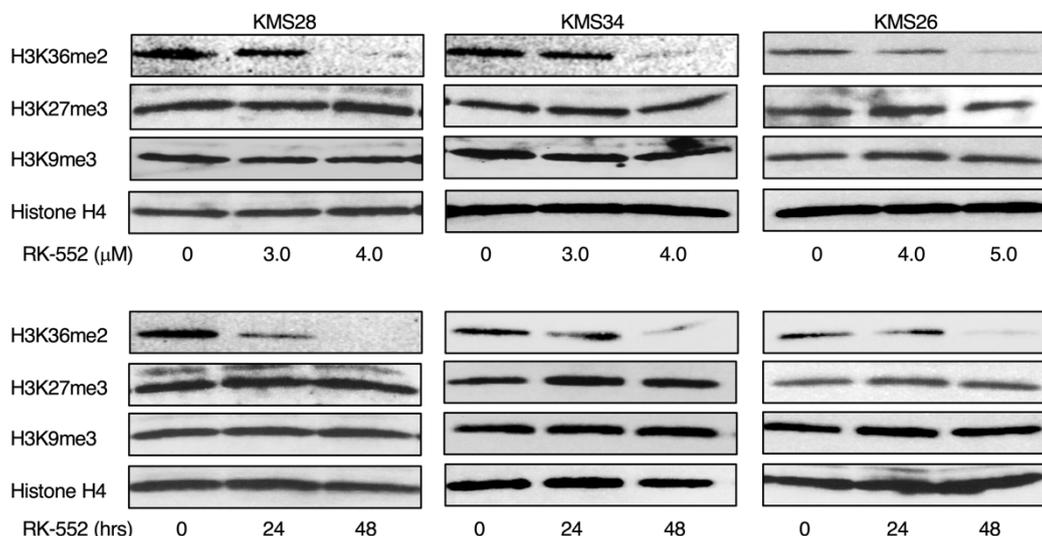
Compounds	IC ₅₀ (μM)		
	MMSET	G9a	SET7/9
RK-0080552	0.11	1.2	>50
RK-0180118	0.12	1.3	>50
RK-0200003 (streptonigrin)	0.12	0.98	>50
RK-9189029-0-01 (DA3003-1)	3.2	0.16	0.17

2) MMSET 阻害効果の細胞レベルでの確認

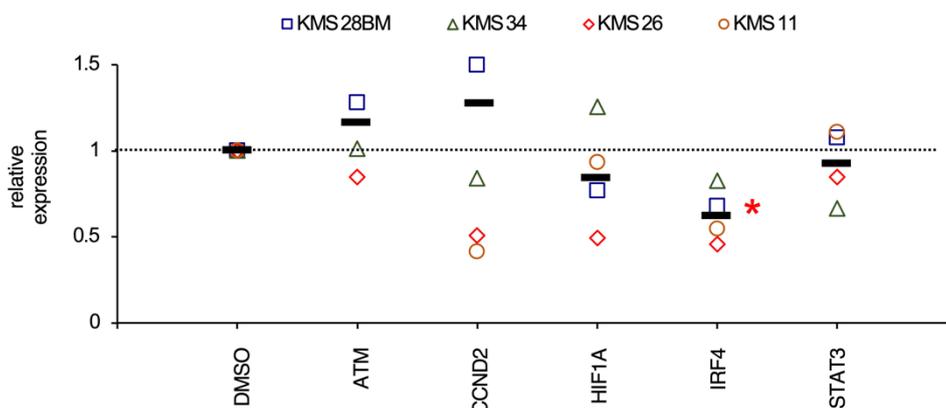
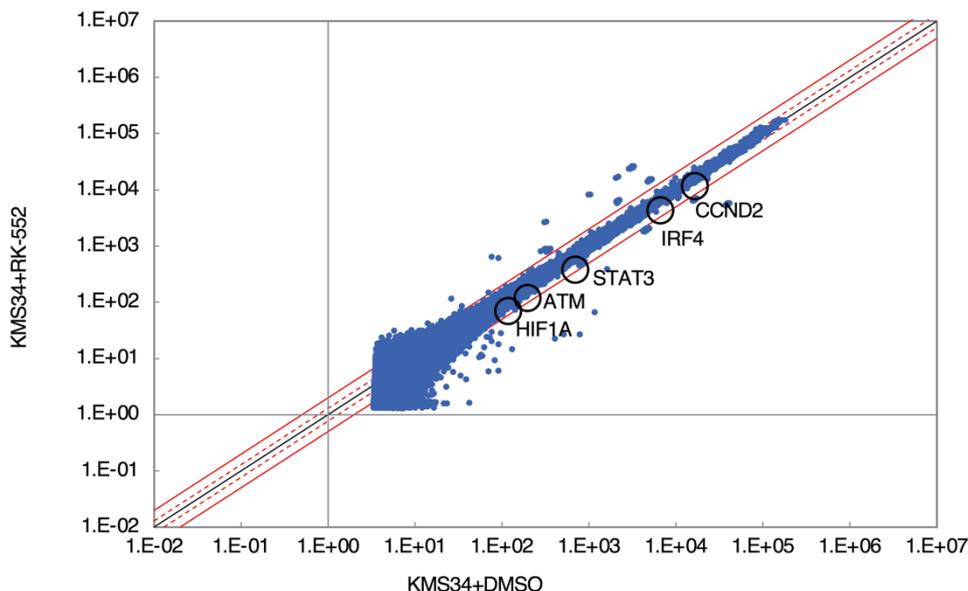
上記の 4 化合物が細胞レベルで MMSET を阻害し、MMSET を強発現する t(4;14)陽性骨髄腫細胞を選択的に抑制することを確認した。5 種類の MMSET 陽性骨髄腫細胞株 (KMS-11, KMS-26, KMS-28, KMS-34, NCI-H929) を使い、MMSET 陰性骨髄腫細胞株 (MM.1S, RPMI8226, JIN3, SKMM1) を対照として、候補化合物の増殖抑制効果を定量的に解析した。その結果、RK-0900552 が最も低濃度で MMSET 陽性細胞株を抑制し (IC₅₀ < 5 μM)、かつ MMSET 陰性細胞株に対する IC₅₀ は 5~10 μM 以上と選択性を有することが分かった。



そこで RK-0900552 を使い、ウエスタン法にて H3K36 メチル化の抑制と H3K27 メチル化の上昇を確認した。一方、H3K9 や H3K4 のメチル化に対する影響は少なく、RK-0900552 が細胞レベルで MMSET 活性を抑制しうること、また他のヒストンメチル化酵素に対する抑制はほとんど起こらないことが推測された。

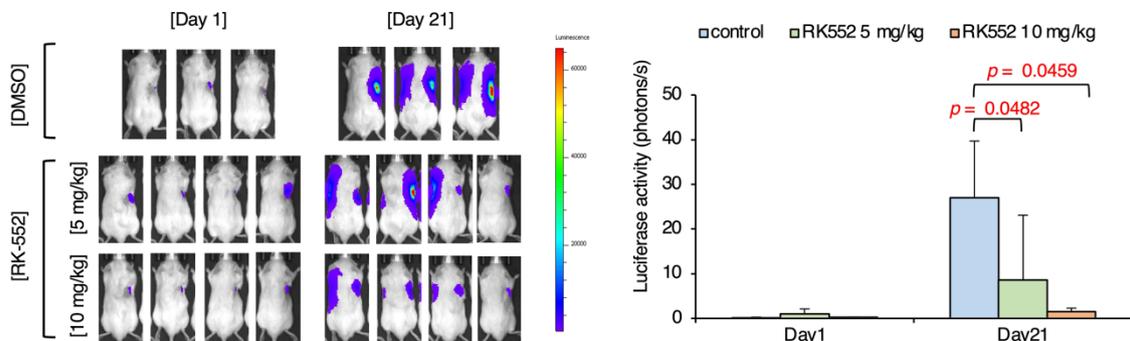


さらに MMSET の標的遺伝子として知られる IRF4, Cyclin D2, STAT3, ATM, HIF1A の発現を特異的に抑制することを DNA マイクロアレイならびに real-time RT-PCR にて確認した。



3) 候補化合物の MMSET 阻害効果をマウス骨髄腫モデルにて確認

引き続き、RK-0900552 の治療効果を MMSET 陽性骨髄腫細胞株を移植したマウス骨髄腫モデルにて検証した。RK-0900552 10 mg/kg を投与したマウスにおいて、移植骨髄腫細胞の明らかな増殖抑制が認められた。これらのマウスにおいて血液検査 (CBC・電解質・肝機能・腎機能) や経時的体重測定を行ったが、明らかな異常は認められなかった。



4) 今後の方針

理化学研究所との共同研究で、RK-0900552 と MMSET の複合体 X 線結晶構造解析を行う。その結果得られた立体構造情報を、標的蛋白質への親和性・標的選択性・リガンド効率等の評価に生かして、より強い活性と高い特異性を有する誘導体を設計する。RK-0900552 に関してはラットおよび非齧歯類動物 (イヌ・サル) を用いた安全性試験と薬物動態試験を実施して前臨床 POC を取得し、特許を出願する。その後、GMP 基準での化合物の製造に関する具体的方針を固め、製薬企業とタイ・アップして臨床治験へ展開することが可能なレベルにスキップ・アップする。

5. 発表論文

1. Osada N, Kikuchi J, Koyama D, Kuroda Y, Yasui H, Levenson JD, Furukawa Y. mTOR inhibitors sensitize multiple myeloma cells to venetoclax via IKZF3- and Blimp-1-mediated BCL-2 upregulation. **Haematologica** 106: 3008-3013, 2021.
2. Kuroda Y, Yashima-Abo A, Koyama D, Kikuchi J, Mori S, Ito T, Furukawa Y. Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma. **Leukemia** 35: 1506-1510, 2021.
3. Kuroda Y, Koyama D, Kikuchi J, Mori S, Ichinohe T, Furukawa Y. Autophagic degradation of NOXA underlies stromal cell-mediated resistance to proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma. **Leukemia Res.** 111: 116672, 2021.
4. Koyama D, Kikuchi J, Kuroda Y, Ohta M, Furukawa Y. AMP-activated protein kinase activation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR-ABL protein in CML cells. **Cancer Sci.** 112: 194-204, 2021.
5. Tago K, Ohta S, Aoki-Ohmura C, Funakoshi-Tago M, Sashikawa M, Matsui T, Miyamoto Y, Wada T, Oshio T, Komine M, Matsugi J, Furukawa Y, Ohtsuki M, Yamauchi J, Yanagisawa K. K15 promoter-driven enforced expression of NKIRAS exhibits tumor suppressive activity against the development of DMBA/TPA-induced skin tumors. **Sci. Rep.** 11: 20658, 2021.
6. Funato K, Abe T, Kurita R, Watanabe Y, Nakamura Y, Miyata S, Furukawa Y, Satake M. Identification of characteristic proteins at late-stage erythroid differentiation *in vitro*. **Human Cell** 34: 745-749, 2021.
7. Kikuchi J, Kodama N, Takeshita M, Hijima T, Ikeda S, Kobayashi T, Kuroda Y, Uchiyama M, Osada N, Bogen B, Yasui H, Takahashi N, Miwa A, Furukawa Y. EMD originates from hyaluronan-induced homophilic interactions of CD44 variant-expressing MM cells under shear stress. **Blood Adv.** 7: 508-524, 2022.
8. Yamamoto N, Kikuchi J, Furukawa Y, Shibayama N. Fast *In-vitro* screening of FLT3-ITD inhibitors using silkworm-baculovirus protein expression system. **PLoS One** 17: e0261699, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Koyama Daisuke, Kuroda Yoshiaki, Yasui Hiroshi, Levenson Joel D., Furukawa Yusuke	4. 巻 106
2. 論文標題 mTOR inhibitors sensitize multiple myeloma cells to venetoclax via IKZF3- and Blimp-1-mediated BCL-2 upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 3008-3013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2021.278506	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 Kuroda Yoshiaki, Yashima-Abo Akiko, Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Mori Shigehisa, Ito Shigeki, Furukawa Yusuke	4. 巻 35
2. 論文標題 Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1506-1510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-020-01035-x	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 Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Mori Shigehisa, Ichinohe Tatsuo, Furukawa Yusuke	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagic degradation of NOXA underlies stromal cell-mediated resistance to proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 106672-106672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.leukres.2021.106672	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 Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Ohta Masatsugu, Furukawa Yusuke	4. 巻 112
2. 論文標題 AMP activated protein kinase activation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR ABL protein in CML cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 194 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14698	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 Yamamoto Naoki, Kikuchi Jiro, Furukawa Yusuke, Shibayama Naoya	4. 巻 17
2. 論文標題 Fast in-vitro screening of FLT3-ITD inhibitors using silkworm-baculovirus protein expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 261699-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0261699	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 Tago Kenji, Ohta Satoshi, Aoki-Ohmura Chihiro, Funakoshi-Tago Megumi, Sashikawa Miho, Matsui Takeshi, Miyamoto Yuki, Wada Taeko, Oshio Tomoyuki, Komine Mayumi, Matsugi Jitsuhiro, Furukawa Yusuke, Ohtsuki Mamitaro, Yamauchi Junji, Yanagisawa Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 K15 promoter-driven enforced expression of NKIRAS exhibits tumor suppressive activity against the development of DMBA/TPA-induced skin tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20658-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00200-1	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 Funato Koji, Abe Takaaki, Kurita Ryo, Watanabe Yoshihisa, Nakamura Yukio, Miyata Shigeki, Furukawa Yusuke, Satake Masahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of characteristic proteins at late-stage erythroid differentiation in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 745-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00503-5	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------