

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22819

研究課題名(和文)新規治療法開発を論じた多発性骨髄腫におけるMyD88の病態修飾機構の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the role of MyD88 in multiple myeloma

研究代表者

中村 元(Nakamura, Hajime)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10792666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：MyD88(Myeloid differentiation primary response gene 88)はNF- κ Bシグナル伝達経路関連因子をコードする遺伝子で、変異が生じるとNF- κ B経路が恒常的に活性化され、リンパ増殖疾患を発症するとされている。しかし多発性骨髄腫(MM)においてMyD88がその病態生理に与える影響は不明であった。本研究結果からMyD88遺伝子変異はMMにおいて稀であるものの、その発現亢進が有意な予後不良因子であることを明らかにした。さらに、MyD88選択的阻害剤であるST2825がMMにおいて活性酸素種(ROS)依存的なアポトーシスを誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで報告のないMMにおけるMyD88の機能解析を行い、細胞増殖や転移浸潤に及ぼす影響を明らかにし、最終的に新規のMM治療戦略の開発を目指した。その結果として、MyD88及びその阻害剤であるST2825がMMの新規治療戦略に繋がる可能性を示した。様々な新規治療薬の開発を以てしても未だ治癒の難しい再発難治性MM患者の予後改善に寄与することが期待され、将来的にその他の癌腫への応用も考慮され、本研究が社会へ波及する効果は大きいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is a key regulator of nuclear factor kappa B (NF- κ B), plays an important role in tumorigenesis in lymphoid malignancies such as Waldenstrom's macroglobulinemia (WM). However, its biological function in multiple myeloma (MM), which is a malignant plasma cell disorder like WM, remains unexplored. We first demonstrated that higher expression MyD88 was significantly correlated with poor survival in patients with MM. Interestingly, bioinformatic analysis also revealed that MyD88 gene alteration, which is recognized in nearly 80% of patients with WM, was extremely rare in MM. In addition, ST2825 suppressed cell growth followed by apoptosis. Furthermore, ST2825 induced intracellular reactive oxygen species (ROS) in MM cells, and N-acetyl-L-cysteine, which is known as a ROS scavenger, significantly decreased the number of apoptotic MM cells evoked by ST2825 treatment. In summary, this study provides novel treatment strategies to conquer MM.

研究分野：臨床腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 ST2825 MyD88

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)は形質細胞の単クローン性増殖と、その産物である単クローン性免疫グロブリン(M蛋白)の血清・尿中増加が特徴の悪性疾患である。本邦では人口10万人あたり約5人の発症率で、年間死亡者数は約4,000人であり、全造血器腫瘍の約10%を占めると報告されている。かつてはメルファランとプレドニゾロンを併用するMP療法が治療の中心であったが、その後数多くの新規薬剤が開発され、治療選択肢が広がり予後の延長に寄与してきた。しかしながら、これらの治療をもってしてもMMの根治は困難であり、多くの場合再発を繰り返してやがて難治性となる。したがって、特に再発難治(RR)例に対してより深い奏功の得られる新規治療薬の開発は急務である。近年、MMの類縁疾患である原発性マクログロブリン血症(WM)にMyD88 L256P遺伝子変異が高頻度で認められることが報告された一方で、MMにおけるMyD88に関する研究報告は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MyD88のMMにおける病態進展に与える影響を明らかにし、将来的にはMyD88を標的分子として治療薬開発を目指すこととした。本研究結果により、MMにおいてMyD88を介した新規治療戦略開発に繋げることができれば、RRMM患者の予後改善に寄与する可能性があり、将来的にその他の癌腫への応用も考慮され、本研究課題の遂行が社会へ波及する効果は大きいと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、これまで知見のないMMにおけるMyD88の発現様式や病態進展に与える影響について解析を行い、最終的には新規治療薬の開発を目指した。具体的な研究計画は以下に記載する。

(1)MMにおけるMyD88の発現解析：申請者は*in silico*の解析から、MMにおいてMyD88の発現が有意に亢進していることを申請時点で既に見出している。今後は、GEO等の他のデータセットを用いて、同様の発現亢進の有無について解析を進める。また、複数のMMの細胞株においても同様にMyD88の発現亢進が認められるかを、CD138陽性細胞をコントロールに設定して、qPCRおよびWestern blot(WB)により比較検討を行う。さらに、当院で治療歴のあるMMの患者検体を用いてMyD88の免疫染色を行い、発現亢進の有無や生命予後に与える影響を後方視的に解析する。

(2)MM細胞におけるMyD88が細胞増殖ならびに転移浸潤に及ぼす影響とその機序の解析：siRNAを用いて複数のMM細胞株においてMyD88のknock down(KD)を行う(loss of function)。同時に発現ベクターを用いてMyD88を過剰発現させる(gain of function)。発現の変化はqPCRならびにWBで評価する。この発現変化が細胞増殖にどのように影響するかを解析するため、MyD88のKD後にWST-1 assayを行い、cell viabilityを評価する。STEAP1のKD後にcell viabilityに変化が認められた場合、その機序解析の一環として、フローサイトメトリー法を用いて、Annexin V染色によりアポトーシスの有無の検出や、Propidium Iodide(PI)染色により細胞周期解析を行う。また、遊走能や浸潤能へ与える影響を解析するため、MyD88をKDもしくは過剰発現させたMM細胞株において、wound-healing/transwell invasion assayを行って評価する。さらに、STEAP1のKDもしくは過剰発現によって発現が亢進あるいは抑制される分子をPCR arrayやRNA seqを用いて抽出を試みる。

(3)MyD88の発現が薬剤感受性に及ぼす影響の解析：MyD88をKDもしくは過剰発現させたMM細胞株において、すでに臨床応用されている抗腫瘍薬に対する薬剤感受性の変化をWST-1 assayで検討する。さらにMyD88阻害薬であるST2825と各種抗腫瘍薬との併用効果についても同様に評価する。相乗効果が確認できる薬剤の組み合わせを同定できた場合には、MMマウス皮下腫瘍モデルを用いてその治療効果を解析する。

4. 研究成果

上述の研究計画に沿って、MMにおけるMyD88の発現様式や病態進展に与える影響について解析を行った。具体的に得られた研究成果を以下に記載する。

(1)MyD88の発現亢進はMM患者において有意な予後不良因子である。

上述のようにMyD88はWM患者において高頻度に変異が認められることから、類縁疾患であるMMにおいても同様の変異を有することを予想した。cBioPortalを用いて205例のMM患者においてMyD88に変異を有するかを検討した。興味深いことに予想と反して、205例中MyD88に変異を有したのはわずか1例のみであった。さらに、GEOのデータセット解析の結果から、症候性MMではMyD88の発現上昇が認められ、MyD88の発現が亢進したMM患者では全生存期間と無イベント生存期間のいずれも有意に短縮することが示された。

(2)MyD88選択的阻害剤ST2825は濃度依存性にMM細胞の細胞増殖を阻害する。

MyD88選択的阻害剤であるST2825がMM細胞株の増殖に与える影響に関して検討した。RPMI8226とU266において、ST2825は濃度依存的な細胞増殖阻害効果を示した。続いてsiRNAを用いてMyD88をknockdownし、同様に細胞増殖能に及ぼす影響について検討したが、control siRNAを

導入した際と比較して細胞増殖能に変化は見出されなかった。このことから ST2825 が MyD88 非依存的に細胞増殖能低下に寄与する可能性を示した。

(3)ST2825 は MM 細胞においてアポトーシスを誘導する。

ST2825 により引き起こされる細胞増殖能低下の機序を明らかにするため、Annexin/7AAD 染色を用いたフローサイトメトリー法によりアポトーシスの評価を行った。RPMI8226 と U266 において、ST2825 の処理により有意にアポトーシス細胞の増加が認められた。Western blot では ST2825 による処理により cleaved PARP が認められ、アポトーシスの存在を裏付ける結果であった。

(4)ST2825 は MM 細胞において活性酸素種(ROS)の発生を惹起する。

これまで複数の抗腫瘍薬において ROS の産生による細胞毒性が報告されていることから、ST2825 により ROS の発生が惹起されるかを、フローサイトメトリー法により検討した。RPMI8226 において ST2825 処理により濃度依存的な ROS の発生が認められた。さらに、抗酸化物質である N-アセチルシステインにより、ST2825 処理により誘導されるアポトーシス細胞の割合が低下し、ST2825 に起因するアポトーシスは ROS 依存的である可能性が示された。

これらの研究結果から、ST2825 が MM の将来的な新規治療薬となる可能性を示し、現在論文投稿中である。

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 Hajime Nakamura, Kohichi Takada, Kazuyuki Murase, Hiroshi Ikeda, Satoshi Iyama, Tatsuo Manabe, Masayoshi Kobune	4. 巻 62
2. 論文標題 Multiple Myeloma with Hyperammonemia Treated with Novel Agents: A Case Series of Three Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 775-778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.0010-22	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
---------	---------