

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461429

研究課題名(和文) PDK1制御による多発性骨髄腫の疾患形成分子異常と腫瘍環境支持の包括的制御

研究課題名(英文) The functional involvement of PDPK1 in the pathophysiology of multiple myeloma

研究代表者

黒田 純也 (KURODA, JUNYA)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子生物学的異常が多様で複雑な多発性骨髄腫において普遍的にPDPK1 (PDK1)と、その下流キナーゼであるRSK2が活性化し、腫瘍細胞の増殖や生存に重要な役割を担うこと、PDPK1/RSK2経路の活性化は病態形成の初期から進行期まで普遍的に認められることを見出した。また、PDPK1の過剰発現はmiR-375のepigenetic制御異常による発現低下が原因であることを明らかにした。今後、骨髄腫に対するmiR-375/PDPK1/RSK2標的治療の開発を展開するうえで、礎となる研究結果であるとともに、他の造血器悪性腫瘍にも対象を拡大し研究を展開中である。

研究成果の概要(英文)：This research identified that the constitutive activation of PDPK1/RSK2 signaling pathway is universal in multiple myeloma which is highly heterogenous in terms of their molecular abnormalities. We also identified that the activation of PDPK1/RSK2 signaling is present from the disease initiation phase to the end stage disease, indicating its functional involvement of both disease development and disease progression in multiple myeloma. Indeed, PDPK1/RSK2 regulates myeloma cell survival and proliferation. In addition, we discovered that the abnormal repression of miR-375 by epigenetic dysregulation, such as hypermethylation or hypoacetylation, underlies as the causative of PDPK1 over/expression and its auto-activation in myeloma cells. As the abnormal regulation of miR-375/PDPK1/RSK2 axis is the universally observed in myeloma patients of varied disease stages, novel strategies to manipulate miR-375/PDPK1/RSK2 axis is desired to be developed in future.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 PDPK1 RSK2 miR-375 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

MMは形質細胞を起源とし、多彩な全身症状を合併する造血器悪性腫瘍である。造血器悪性腫瘍においては悪性リンパ腫について2番目に発症頻度の高い疾患で、高齢者における発症頻度が高く、その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な難治性疾患で、従来、平均生存期間は約3年とされてきたが、近年、thalidomideやlenalidomideなどの免疫修飾薬、プロテアソーム阻害剤であるbortezomib (BTZ)などの新規薬剤の開発・臨床応用により治療予後は大幅に改善し、既存の抗がん剤と新規薬剤を同時、あるいは連続的に併用することによって、平均生存期間は5-7年程度に延長した。しかしながら、現在もMMの完治は困難であり、最終的にはあらゆる治療戦略に対して抵抗性を獲得し、MM自身の進行、随伴症の悪化により致命的転帰をたどることに変わりはない。更なる治療予後の改善を求めらるにあたっては、分子病態の解明と至適分子標的の同定による治療薬の開発が、今後の抗MM治療戦略開発の柱となる重要、かつ喫緊の課題と言える。MMの克服には「高度のinter-patient diversityとintra-clonal heterogeneityを有する多様な分子病態」と「骨髄腫瘍環境の支持」の両者を同時にブロックしうる治療法の開発、すなわち、各種の分子異常と腫瘍環境に効果が集約する細胞シグナル伝達分子を同定し、治療標的とすることが理想的である。従前の研究において申請者の研究グループは、骨髄腫細胞ではRSK2 N末端がRASやAKTなど上流シグナルの活性、各種の染色体異常や遺伝子変異に関わらず検討したすべての骨髄腫細胞株11株、ならびに患者由来骨髄腫細胞の約80%で活性化しており、RSK2がcyclin D、MYC、MCL1など骨髄腫の病態形成に必須の分子を重複して制御することが明らかにしたが、さらに最近、予備的検討において、セリン・スレオニンキナーゼであ

るPDPK1がMM細胞株において恒常的に活性化しており、骨髄腫細胞においてRSK2 N末端、AKT両分子の活性化を制御していることを見出した。

2. 研究の目的

MMにおける普遍的治療標的シグナル媒介因子の同定による多様な分子病態と骨髄環境支持のダブルブロック治療戦略の開発を目的に、PDPK1活性化のMMにおける病態形成・分子標的・予後予測バイオマーカーとしての意義を明らかにし、PDPK1制御により多様な疾患形成分子異常の包括的制御を可能とする治療戦略開発の可能性について研究する。

3. 研究の方法

MMにおけるPDPK1活性化の臨床的意義の検討

PDPK1、ならびに関連シグナル分子の活性化と新規薬剤時代の予後、治療経過との関連を検討する。具体的にはMM症例100症例を目標に患者由来骨髄腫細胞のPDPK1活性化状態の検討を行い、生存期間、治療薬剤別治療奏効度との関連について明らかにし、PDPK1活性化の臨床的意義を明らかにする。

骨髄腫細胞株におけるPDK1の機能的意義の検討

(1) MM細胞株におけるPDK1活性化状態、上流シグナル分子との関連の検討

10-15種のMM由来細胞株について、PDK1の活性化状態を検討し、染色体異常パターン、RAS, RAF, FGFR3遺伝子異常、MEK, ERK活性化状態との関連について明らかにする。

(2) RNA干渉(RNAi)によるPDPK1阻害の効果の検討

RNAiによりPDPK1の発現抑制を行い、PDPK1のMM由来細胞株の生存、増殖における意義を明らかにする。

(3) PDPK1特異的小分子阻害剤によるPDPK1阻害の効果の検討

小分子阻害剤により、PDPK1 の活性抑制を行い、PDK1 の MM 由来細胞株の生存、増殖における意義を明らかにする。

患者由来骨髄腫細胞における PDK1 機能的意義の検討

MM 患者由来の骨髄腫細胞を CD138 ラベリングにより Mini Max システムを用いて単離し PDPK1 活性化の意義を明らかにする。

(1) PDPK1、リン酸化 PDK1、ERK、AKT、RSK2 活性化状態の Western Blot (WB)法による検討

(2) Interleukin-6 添加培養液中での PDPK1 阻害剤による細胞増殖抑制効果の検討

In vivo MM モデルにおける PDPK1 の機能的意義の検討

(1) MM 細胞親株、ならびに PDK1 抑制亜株を、

麻酔下に免疫不全マウス(NOD/SCID マウス)の大腿骨骨髄に膝関節から移植する。骨髄腫瘍環境での意義を明らかにするためには、直接的に骨髄内移植を行うことが重要である。

(2) 親株、PDK1 抑制亜株における骨髄内生着効率、ならびに増殖効率について検討する。

4. 研究成果

本研究課題では、高度難治性造血器悪性腫瘍である多発性骨髄腫において、普遍的に治療標的となりうる分子制御異常の同定に取り組んだ。その結果、骨髄腫細胞では、セリン・スレオニンキナーゼである PDPK1(PDK1) と、その下流キナーゼである RSK2 が cyclin D、c-Myc、IRF4 などの活性を制御し、腫瘍細胞の増殖や生存に重要な役割を担うこと、PDPK1/RSK2 経路の活性化は約 90%以上の症例において病態形成の初期から進行期まで普遍的に認められる現象であることを見出した。現在、さらに PDPK1 の *in vivo* での MM 病態形成についてより精確な機能的意義を解明すべく MM モデル動物での検討に挑戦中である。一方、PDPK1 恒常的活性化は PDPK1 の発現亢進と分子内自己リン酸化によるものであること、PDPK1 の過剰発

現は miR-375 の発現低下が原因であることを見出した。また、miR-375 の発現低下はメチル化やアセチル化異常などエピジェネティック異常が重複して誘導していること、こうした異常は病初期から普遍的に認められるものであること、miR-375 発現低下は PDPK1 に加え、JAK2 や IGF-1R などの分子の発現も制御することで病態形成の根幹を担う異常であることも見出した。また、本研究では、こうした異常は脱メチル化剤やヒストン脱アセチル化阻害剤などのエピジェネティック治療薬により制御可能な可能性も示された。一方、循環血液中の tumor-derived circulating DNA における PDPK1 発現や、circulating miR-375 の検討を進めたが、これらの診断バイオマーカーの臨床応用は適切ではないことが示され、あくまで治療標的としての研究の発展が望ましいことが方向性として示された。今後、骨髄腫に対する miR-375/PDPK1/RSK2 標的治療の開発を展開するとともに、他の造血器悪性腫瘍にも対象を拡大し、本経路の機能的意義、治療標的としての可能性について研究を展開中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Tatekawa S, Chinen Y, Ri M, Narita T, Shimura Y, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Kobayashi T, Kawata E, Uoshima N, Taki T, Taniwaki M, Handa H, Iida S, Kuroda J. Epigenetic repression of miR-375 is the dominant mechanism for constitutive activation of the PDPK1/RPS6KA3 signaling axis in multiple myeloma. *Br J Haematol*, in print (2017). 査読あり.

2. 黒田純也、立川章太郎. RSK2、PDPK1 を標的とした骨髄腫治療開発. 日本臨床 74 巻増刊号 5「多発性骨髄腫学」.180-184, 2016. 査

読なし.

3. 黒田純也. 細胞シグナル伝達を標的とした多発性骨髄腫治療戦略の今後. 臨床血液. 55(3), 295-303, 2014. 査読あり.

4. Chinen Y, Kuroda J, Shimura Y, Nagoshi H, Kiyota M, Yamamoto-Sugitani M, Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M. Phosphoinositide protein kinase PDPK1 is a crucial cell signaling mediator in multiple myeloma. *Cancer Res*, 74;7418-7429, 2014. 査読あり.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Tatekawa S, Chinen Y, Shimura Y, Matsumura-Kimoto Y, Nagoshi H, Kobayashi T, Kawata E, Narita T, Ri M, Handa H, Uoshima N, Iida S, Kuroda J. The Abnormal Repression of Mir-375 Expression By Overlapping Epigenetic Dysregulations in Myelomas. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting and Exposition (San Diego, USA) 平成 28 年 12 月 3-6 日 (2016)

2. Tatekawa S, Chinen Y, Shimura Y, Kimoto-Matsumura Y, Nagoshi H, Kobayashi T, Kawata E, Narita T, Ri M, Handa H, Uoshima N, Iida S, Kuroda J. The epigenetic dysregulation of miR-375 for PDPK1 overexpression/activation in multiple myeloma. 第 78 回日本血液学会学術総会(横浜). 平成 28 年 10 月 13-15 日(2016)

3. 立川章太郎、知念良顕、志村勇司、名越久朗、古林 勉、木元弥生、河田英里、成田朋子、李 政樹、半田 寛、魚嶋伸彦、飯田真介、黒田純也. 多発性骨髄腫における miR-375 のエピジェネティック異常による PDPK1 発現亢進. 第 41 回日本骨髄腫学会学術集会(徳島). 平成 28 年 5 月 28-29 日(2016)

4. Tatekawa S, Kuroda J, Chinen Y, Shimura Y, Nagoshi H, Kobayashi T, Kawata E, Uoshima N, Handa H, Taniwaki M. The Epigenetic Repression of Mir-375 Is the Dominant

Mechanism for the Constitutive Activation of PDPK1/RSK2 Signaling Axis in Multiple Myeloma. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting and Exposition (Orland, USA) 平成 27 年 12 月 5-8 日 (2015)

5. Tatekawa S, Chinen Y, Shimura Y, Nagoshi H, Kobayashi T, Kawata E, Uoshima N, Handa H, Kuroda J, Taniwaki M. The molecular mechanism of PDPK1 overexpression in multiple myeloma. 第 77 回日本血液学会学術総会(金沢). 平成 27 年 10 月 16-18 日(2015)

6. 立川章太郎、知念良顕、志村勇司、名越久朗、古林 勉、河田英里、魚嶋伸彦、半田 寛、黒田純也、谷脇雅史. 多発性骨髄腫における PDPK1 発現の分子メカニズム. 第 40 回日本骨髄腫学会学術集会(熊本). 平成 27 年 5 月 16-17 日(2015)

7. Chinen Y, Kuroda J, Shimura Y, Nagoshi H, Kiyota M, Yamamoto-Sugitani M, Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M. 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDPK1) Is a Pivotal Cell Signaling Mediator in Multiple Myeloma. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting and Exposition (San Fransisco, USA) 平成 26 年 12 月 6-9 日 (2014)

8. Chinen Y, Kuroda J, Shimura Y, Nagoshi H, Kiyota M, Sugitani M, Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 is a crucial cell signaling mediator in multiple myeloma. 第 76 回日本血液学会学術総会(大阪). 平成 26 年 10 月 31-11 月 2 日(2014)

〔図書〕(計 3 件)

1. 志村勇司、黒田純也. 多発性骨髄腫の病態メカニズムと治療標的を整理する. 多発性骨髄腫 新規治療薬の使い方・考え方. 19-24, 先端医学社、東京. 2017.

2. 黒田純也、名越久朗. 骨髄腫の進行をもたらす骨髄腫細胞の分子病態. 生存・増殖シグ

ナル. 多発性骨髄腫 Updating 第 10 巻.

127-136, 医薬ジャーナル社、大阪. 2017.

3. 黒田純也. 多発性骨髄腫の遺伝子異常と細胞シグナル異常. 造血器腫瘍アトラス.(改訂第 5 版)(谷脇雅史、横田昇平、黒田純也編)、日本医事新報社、東京、370-375, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 黒田 純也(Kuroda, Junya)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：70433258