

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461432

研究課題名(和文) 治療法の進歩からとり残された高リスク骨髄腫に対する新しいコンセプトによる創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery based on novel concept for overcoming high-risk myeloma which is still intractable despite of recent progress in the treatment

研究代表者

服部 豊 (Hattori, Yutaka)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：20189575

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)：新規薬剤の登場により骨髄腫の予後は改善したが、高リスク症例の予後は未だに不良であり、髄外病変形成は深刻な問題である。当研究では、高リスク骨髄腫細胞に各種cadherinを含む上皮間葉系遺伝子が高発現し、SCIDマウスへの造腫瘍性を有することを見出した。さらに、高リスク骨髄腫治療薬として、従来の免疫調節薬(IMiDs)とは異なる薬理作用を有する新規ブタルイミド誘導体TC11の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Despite of the use of newly developed drugs, multiple myeloma (MM) with high-risk cytogenetic changes revealed significantly poor prognosis. Most patients acquired drug resistance and developed extra-medullary diseases. We found that N-cadherin and other mesenchymal genes were highly expressed in t(4;14)-positive high-risk MM patients, and E-cadherin and other epithelial genes were expressed in MM patients with normal karyotype. Those cadherin-positive MM cells demonstrated tumorigenicity to SCID mice. We also developed a new immunomodulatory drug (IMiDs), TC11, which showed anti-tumor activity via cereblon-independent pathway unlike previously developed IMiDs. In addition, we tried structural modification of TC11 and succeeded in significantly increasing water-solubility of TC11.

研究分野：血液内科学

キーワード：内科 薬学

1. 研究開始当初の背景

近年、造血幹細胞移植法の普及や分子標的薬の開発により、造血器腫瘍の予後は著しく改善した。多発性骨髄腫や骨髄異形成症候群はいまだに治癒困難な致死性造血器腫瘍とされる。とくに、*TP53*遺伝子が在位する17番染色体欠失(*del17*)や*t(4;14)*を有するハイリスク症例は未だに手の施しようがなく、その治療薬の開発はunmet clinical needと考えられる。一方、ハイリスク症例の予後が不良である原因として、治療抵抗性と髄外病変形成は深刻な臨床的問題である。

我々は、上皮特異的な遺伝子群が多くの骨髄腫細胞に発現していることを見出し、骨髄腫はもはや造血器腫瘍というより固形癌に近い特性を有していると考えられる。さらに、ハイリスク骨髄腫の多くは髄外病変を形成するが、これは固形癌の遠隔転移に似た現象ではないかと考え、固形癌の遠隔転移に關与するEpithelial mesenchymal transition(EMT)関連遺伝子発現を検索した。その結果、ハイリスク骨髄腫細胞株におけるEMT関連遺伝子群の発現が捕らえられた。これらの事実から、ハイリスク骨髄腫では、骨髄腫細胞が上皮系あるいは間葉系細胞の形質を獲得し、骨髄外病変形成や薬剤抵抗性に陥り、患者は手の打ちようがなく死に至るのではないかという作業仮説を立てた。

一方、当研究グループは、ハイリスク骨髄腫細胞に対して強いアポトーシス誘導をきたす新規フタルイミド体TC11を見出した

(Shiheidō H et al. PLoS One 7:e44889, 2012, Shiheidō H et al. PLoS One 7:e38878, 2012)。

さらに分担研究者の柳川らは、各種化合物の結合蛋白質をクローニングするIn Vitro Virus (IVV)法を開発し、TC11がmitosisに必須のnucleophosmin (NPM)1および α -tubulinに直接結合することを見出した(Shiheidō H et al. PLoS One 7:e44889, 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、上述のように現代の骨髄腫治療の障壁となっているハイリスク骨髄腫の克服を目指す。そのために、1)新しい概念に基づく病態解明、2)克服薬スクリーニングシステムの確立、3)創薬シーズの活用を遂行する。

3. 研究の方法

(1)新しい概念による病態解明

骨髄腫細胞株パネルを用いて、EMT 関連遺伝子および蛋白質発現を検索し、分子遺伝学的異常、薬剤耐性、SCID マウスへの造腫瘍性などとの関連を検索する。

さらに、造血細胞がどのような外部刺激を受けてEMT現象を起こすのかについて検討する。

(2)克服薬スクリーニングシステムの確立

骨髄腫細胞株パネルにさらに各種治療薬に対する感受性データや microarray データなどを追加し、スクリーニング後の分子薬理機構解明に役立つシステムを形成した。

(3)創薬シーズの開発

ハイリスク染色体異常陽性細胞を用いて、その増殖抑制を指標に薬物ライブラリーをスクリーニングする。これにより、ハイリスク骨髄腫克服薬を開発する。

4. 研究成果

(1)新しい概念による病態解明

・*t(4;14)*陽性細胞では間葉系遺伝子発現が亢進しており、その中でもN-cadherinは重要なバイオマーカーになりうると考えられた。一方、正常核型骨髄腫細胞では上皮系遺伝子群の発現が亢進しているものがありE-cadherinがバイオマーカーになりうる。

・さらに、これらのcadherin群を発現する骨髄腫細胞株はSCIDに皮下形質細胞種を形成し、ヒト患者における髄外病変形成との相関が推測された。

・Cadherin群発現骨髄腫細胞は、抗がん剤

や IMiDs に抵抗性を示す傾向があった。さらに、レナリドミド等治療薬への長期暴露や酸性下長期培養により、一部の細胞では E-cadherin の発現が上昇し、造血細胞の上皮系移行の惹起因子となることが判明した。

・ t(4;14)転座を有するハイリスク骨髄腫細胞では、N-cadherin が過剰発現している。我々はその臨床的意義を明らかにするために、骨髄腫患者検体を用いた免疫組織学的検討を開始した。

(2) 克服薬スクリーニングシステムの確立

・ 正常核型を有する骨髄腫細胞は、IMiDs、proteasome inhibitor のほか、古典的抗がん剤一般に感受性を示した。一方、t(4;14) や del17 などのハイリスク染色体異常を有する細胞の中には IMiDs に反応を示さないものもあった。

(3) 創薬シーズの開発

・ ハイリスク骨髄腫克服薬の開発も開始し、上皮間葉系移行をきたした骨髄腫細胞にも有効な新規フタル酸誘導体である TC11 を見出した。さらに、研究期間中に TC11 の水溶液への可溶化に成功した。

・ 近年、免疫調節薬(IMiDs)は、E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である cereblon に結合することによって、基質の分解や細胞内輸送に変化をきたし、腫瘍細胞死や催奇形性をもたらすとされる。しかし、TC11 は cereblon には結合せず、これらの機能を阻害することによって TP53 が欠失するハイリスク骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導する。すなわち、TC11 は cereblon 非依存的にハイリスク骨髄腫細胞死を誘導し催奇形性への懸念も払拭できると推測され、可溶化により実用化に向け前進することができた。

・ TC11 処理による遺伝子発現の変化を micro array を用いて検索した。その結果、細胞周期の G2/M 制御遺伝子の発現が上昇し、G2/M 停止を来すことが推測された。

・ 我々はジテルペン化合物ライブラリーのスクリーニングも行い、コマロビキノンおよびその誘導体の中にハイリスク骨髄腫細胞のアポトーシス誘導を来す化合物を見出している。

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 3 件)

Matsushita M, Otsuka Y, Tsutsumida N, Tanaka C, Uchiumi A, Ozawa K, Suzuki T, Ichikawa D, Aburatani H, Okamoto S, Kawakami Y and Hattori Y.

Identification of novel HLA-A*24:02-restricted epitope derived from a homeobox protein expressed in hematological malignancies. PLoS One 2016 Jan 19;11(1):e0146371. (査読有り)

Matsushita M, Ozaki Y, Hasegawa Y, Terada F, Tabata N, Shiheido H, Yanagawa H, Oikawa T, Matsuo K, Du W, Yamada T, Hozumi M, Ichikawa D, and Hattori Y. A novel phthalimide derivative, TC11, has preclinical effects on high-risk myeloma cells and osteoclasts. PLoS One. 2015 Jan 24;10(1):e0116135. (査読有り)

Hattori Y, Ikeda Y, Suzuki Y, Ichikawa D, Matsushita M. Codon 72 Polymorphism of TP53 Gene Is a Novel Prognostic Marker for Thalidomide Therapy in Multiple Myeloma. Br J Haematol 2014 Jun;165(5):728-731. (査読有り)

[学会発表] (計 11 件)

Sato M, Fujimori K, Kitabatake S, Okayama M, Daiju Ichikawa D, Suto Y, Iwasaki G, Kiuchi F, Yamaguchi T, Ueda A, Aida S, Nakayama H, Matsushita M, & Hattori Y.

Komaroviquinone-derivatives, revealed anti-tumor effect on high-risk multiple myeloma cells in vitro as well as in vivo. 58th AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition. San Diego, CA, USA. 2016/12/3.

Sato M, Kitabatake S, Ichikawa D, Suto Y, Iwasaki G, Kiuchi F, Yamaguchi T, Ueda A, Aida S, Matsushita M, & Hattori Y. Structural optimization and anti-tumor activities of komaroviquinone to high-risk myeloma. 臨床血液 2016, 57(9):293(1419). 第 78 回日本血液学会 学術集会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2016/10/6.

Yamaguchi T, Ichikawa D, Ueda A, Aida S, Matsushita M, Hattori Y. Novel Komaroviquinone derivatives with anti-protozoal activity inhibited growth of high-risk myeloma cells in vivo. 第 75 回日本癌学会学術総会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2016/10/6.

佐藤真梨子、北畠翔太郎、藤森宏太、市川大樹、須藤豊、岩崎源司、木内文之、山口 高史、植田有美、曾田宗司、松下麻衣子、服部 豊. ハイリスク多発性骨髄腫に対する新規 komaroviquinone 誘導体による克服薬の開発 第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム(日本薬学会生物系薬学部会)東京都渋谷区日本薬学会 長井記念館 2016/9/3

Hozumi M, Ichikawa D, Matsushita M, Kamiyama E, Yanagawa H, Tabata N, Kitabatake S, Ueda A, Yamaguchi T, Sato M, Hattori Y.

Drug Design for Overcoming High-Risk Myeloma and Identification of Novel Binding Proteins to Immune-Modulatory Drugs. 57th AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition. Orlando, FL, USA. 2015/12/5.

Kasuga M, Ikeda M, Shingaki S, Miyazaki K, Meshituka S, Yoshiki Y, Abe Y, Tsukada N, Hattori Y, Suzuki K. Clinical significance of 11;14 translocation in myeloma, AL amyloidosis and mantle cell lymphoma. 臨床血液 2015, 56(9):497(1613). 第 77 回日本血液学会 石川県金沢市 石川県立音楽堂 2015/10/17.

Hozumi M, Matsushita M, Ichikawa D, Ozaki Y, Hasegawa Y, Terada F, Yanagawa H, Tabata N, Shiheido H, Oikawa T, Matsuo K, Yamada T, Wenlin Du W, Kitabatake S, Ueda A, Hattori Y. Identification of New IMiDs-Binding Proteins and Nonteratogenic Drug Design for High-Risk Myeloma. 臨床血液 2015, 56(9):260(1376). 第 77 回日本血液学会 石川県金沢市 石川県立音楽堂 2015/10/16.

北畠翔太郎、松下麻衣子、市川大樹、尾崎由枝、長谷川由佳、寺田路子、柳川弘志、田嶋典子、始平堂弘和、及川司、松尾光一、山田健人、杜雲林、穂積暢史、植田有美、服部豊. ハイリスク多発性骨髄腫に対する新規治療薬の開発 第16回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム(日本薬学会生物系薬学部会)東京都渋谷区日本薬学会 長井記念館 2015/6/13

Hattori Y, Matsushita M, Tabata N,
Shiheido H, Yanagawa H, Hozumi M,
Ueda A, Kitabatake S, Ichikawa D.
Development of a Novel Phthalimide
Derivative, Preclinical Effects on
High-risk Myeloma Cells and
Osteoclasts. 56th AMERICAN
SOCIETY of HEMATOLOGY Annual
Meeting and Exposition. San
Francisco, CA, USA. 2014.12 (online
publication).
Inoue J, Ikeda M, Shingaki S,
Miyazaki K, Meshitsuka S, Abe Y,
Tsukada N, Hattori Y, Suzuki K. The
clinical significance of decreasing
CD138-positive myeloma cells in bone
marrow. 臨床血液 2014,
55(9):312(1306). 第76回日本血液学会
大阪府大阪市 大阪国際会議場
2014/11/1.
Hozumi M, Ikeda Y, Suzuki Y,
Matsushita M, Ichikawa D, Hattori Y.
Clinical and biological significance of
codon 72 polymorphism of TP53 gene
in multiple myeloma. 臨床血液 2014,
55(9):298(1292). 第76回日本血液学会
大阪府大阪市 大阪国際会議場
2014/10/31.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：フェニルフタルイミド修飾体及びそ
れを有効成分とする抗癌剤
発明者：服部豊、柳川弘志ほか
権利者：同上
種類：特許
番号：2016-207402
出願年月日：2016年10月21日
国内外の別：国内

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〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 豊 (HATTORI, Yutaka)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：20189575

(2) 研究分担者

柳川 弘志 (YANAGAWA, Hiroshi)
慶應義塾大学・薬学部・訪問教授
研究者番号：40327672

山田 健人 (YAMADA, Taketo)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：60230463

須貝 威 (SUGAI, Takeshi)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：60171120

木内 文之 (KIUCHI, Fumiyuki)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：60161402