Title	新たな概念によるハイリスク骨髄腫の予後不良に関わる分子機構の探索と克服薬の開発
Sub Title	Exploitation of molecular mechanisms and development of overcoming drugs from new perspectives for high-risk myeloma with poor prognosis
Author	服部, 豊(Hattori, Yutaka) 山田, 健人(Yamada, Taketo)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	骨髄腫の悪性形質に対して下記の知見を得た。①レナリドミド耐性細胞を樹立し、エクソソーム分泌およびインテグリン発現が薬剤耐性に関与する。髄外病変検体のRNA sequence解析からシグナル伝達を同定した。②新規フタルイミド体TC11は、チューブリン重合阻害とNPM1恒常的リン酸化によりmitotic catastropheを引き起こす。天然物コマロビキノン誘導体GTN057はチロシンキナーゼ阻害作用を有する。ドラッグリポジショニングによるオートファジー阻害薬の開発も行った。③患者検体の病理組織学的検討を行い、E-cadherin陰性化が髄外病変形成と予後不良のバイオマーカーになりうる。 We obtained following research results on malignant phenotype of myeloma. ①Molecular pathogenesis: We established lenalidomide-resistant cell lines and found that increased exosome secretion and integrin-mediated cell adhesion play roles in drug resistance. RNA sequence revealed signal transducing molecules which may associated with formation of extramedullary disease. ②Drug development: Novel phthalimide, TC11, induced mitotic catastrophe by inhibition of tubulin polymerization and constitutive phosphorylations of NPM1. GTN057, a derivative of natural compound komaroviquinon, inhibited c-MET/HGFR kinase activity in myeloma cells. We also challenging isolation of autophagy inhibitors by drug repositioning. ③New biomarker: Immunohistopathological examination of myeloma patients' samples revealed that negative change of E-cadherin expression in myeloma cells is associated with formation of extramedullary disease and poor prognosis.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2020～2022 課題番号 : 20K08763 研究分野 : 血液内科学、腫瘍学、分子生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K08763seika

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０８７６３

研究課題名（和文）新たな概念によるハイリスク骨髄腫の予後不良に関わる分子機構の探索と克服薬の開発

研究課題名（英文）Exploitation of molecular mechanisms and development of overcoming drugs from new perspectives for high-risk myeloma with poor prognosis

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）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄腫の悪性形質に対して下記の知見を得た。①レナリドミド耐性細胞を樹立し、エクソソーム分泌およびインテグリン発現が薬剤耐性に関与する。髄外病変検体のRNA sequence解析からシグナル伝達を同定した。②新規フタルイミド体TC11は、チューブリン重合阻害とNPM1恒常的リン酸化によりmitotic catastropheを引き起こす。天然物コマロビキノン誘導体GTN057はチロシンキナーゼ阻害作用を有する。ドラッグリポジショニングによるオートファジー阻害薬の開発も行った。③患者検体の病理組織学的検討を行い、E-cadherin陰性化が髄外病変形成と予後不良のバイオマーカーになりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
骨髄腫が治癒困難であるかの問いに関し、治療抵抗性の獲得と髄外病変形成という具体的な臨床上の問題点を挙げて、その分子病態解明と克服を目指した創薬研究を展開してきた。その結果、悪性化を決定する分子群やEMT様現象やエクソソームといった新たな細胞機能を提示し、将来の克服薬としての新規候補化合物も複数同定することができた。このことは、造血器腫瘍である骨髄腫の病態解明に、新たな切り口を提案するものであり、その学術的独創性は高い。同時に、以上の成果は不治の造血器腫瘍とされる骨髄腫の予後推測や治療法決定に直結するものであり、患者の救済の観点からその社会的意義も高い。さらに他の癌腫にも応用できるものである。

研究成果の概要（英文）：We obtained following research results on malignant phenotype of myeloma. ① Molecular pathogenesis: We established lenalidomide-resistant cell lines and found that increased exosome secretion and integrin-mediated cell adhesion play roles in drug resistance. RNA sequence revealed signal transducing molecules which may associated with formation of extramedullary disease. ②Drug development: Novel phthalimide, TC11, induced mitotic catastrophe by inhibition of tubulin polymerization and constitutive phosphorylations of NPM1. GTN057, a derivative of natural compound komaroviquinon, inhibited c-MET/HGFR kinase activity in myeloma cells. We also challenging isolation of autophagy inhibitors by drug repositioning. ③New biomarker: Immunohistopathological examination of myeloma patients' samples revealed that negative change of E-cadherin expression in myeloma cells is associated with formation of extramedullary disease and poor prognosis.

研究分野：血液内科学、腫瘍学、分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫　薬剤耐性　上皮間葉転換　天然物　チロシンキナーゼ阻害

１．研究開始当初の背景

近年の細胞治療法の進歩や新規薬剤の開発により、急性白血病や悪性リンパ腫の多くが治癒可能となってきた。その一方で、難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫は、未だに治癒困難である。このような予後不良の原因は、骨髄腫の治癒を妨げる薬剤耐性の獲得、髄外病変形成、腫瘍免疫からの回避といった悪性形質にある。その分子病態については、たとえばサリドマイド類耐性には cereblon 遺伝子の変異などの報告があるが、情報は限られている（Gooding S, Blood, 2021 137:232）。一方、治療薬についてはサリドマイド類、プロテアソーム阻害薬、抗体医薬が広く使われるようになったが、とくにハイリスク染色体異常を有する症例は、薬剤耐性化や髄外病変形成を来しやすく、いまだに予後不良である。さらに、高齢者に多い疾患であることから、治療薬の毒性軽減も重要課題である。

２．研究の目的

本研究では、骨髄腫がなぜ難治性で致死的造血器腫瘍なのかを明らかにするために、治療抵抗性の獲得および髄外病変形成という臨床上の問題点を掲げて、分子レベルでその病態を解明する。同時に、臨床検体を用いて、治療の障壁となる髄外病変形成のバイオマーカーも見出してゆく。さらに、ハイリスク染色体異常陽性細胞にも有効な克服薬の開発を目指し、天然物由来化合物および既存薬のライブラリーをスクリーニングし、分子薬理作用についても考察を加える。

３．研究の方法

薬剤耐性機構を解明するために、レナリドミド長期暴露細胞を 4 種樹立した。cereblon およびその基質群の発現を検討する。さらにトランスクリプトーム解析により、耐性細胞で共通して上昇する遺伝子セットやそれに含まれる遺伝子を明らかにする。また、耐性細胞によるエクソソーム分泌の変化、ならびにエクソソーム分泌亢進に関わりかつ薬剤耐性を引き起こす遺伝子を明らかにする。髄外病変については、同一患者由来の骨髄および髄外病変として胸水由来のペア細胞を入手し、RNA sequence により両者における遺伝子発現の相違を検討する。また、我々は髄外病変由来細胞株における上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子発現を見出している。そこで、とくに E-cadherin に着目して、骨髄ならびに髄外病変由来の患者検体におけるその発現を病理組織学的に検討し、髄外病変に関わる新たなバイオマーカーの開発を目指す。

創薬研究については、天然物 komaroviquinon およびその誘導体ライブラリーをスクリーニングし、さらに抗腫瘍効果が高く、かつ正常細胞への毒性が低い化合物を目指して最適化も行う。これまでに候補化合物として GTN057 を見出し、in vitro および in vivo での抗骨髄腫作用を確認している。マウス体内での薬物動態を検索するとともに、LC/MS/MS を用いて、代謝物を明らかにしてゆく。また、GTN057 は、c-MET チロシンキナーゼ阻害作用を有していることを突き止めているが、EGF 受容体や FGF 受容体など他の受容体チロシンキナーゼへの影響やシグナル伝達阻害作用についても検討する。一方、骨髄腫細胞は多量の M 蛋白を産生することから proteotoxic な状態にあると考えられる。そこで、ミスフォールド蛋白の分解に関わるオートファジーに着目し、既存薬ライブラリーからオートファジー阻害薬のスクリーニングを行う。実際には骨髄腫増殖抑制を来す薬剤のうち、LC3 turnover 法によりオートファジー後期阻害を来す薬剤を選別する。

４．研究成果

①骨髄腫の悪性化を決定する病態の分子レベルでの検討

レナリドミド長期暴露による同薬耐性細胞を 4 種樹立し、結合分子である cereblon およびその基質群の発現を検討した。KMS21R 細胞では、cereblon 発現の低下および IKFZ1/3 やその下流の c-MYC、IRF4 の発現の上昇を認めた。しかし、それ以外の耐性細胞では cereblon および基質群の発現変化を認めなかったことから、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、耐性細胞では integrin β5 およびβ7 の発現が高いことを見出した。さらに、integrin 阻害剤処理により感受性が回復したことから、細胞接着とレナリドミド耐性との関連が明らかになった(Hattori Y, et al. Int J Hematol. 2022;115:605)。なお、耐性細胞を一ヶ月間レナリドミド除去下で培養しても、レナリドミドへの感受性が回復することはなかった。すなわち、integrin を介した薬剤耐性機構は不可逆的と推測された。

次に、耐性株におけるエクソソーム分泌について検討した(Yamamoto T, et al. Blood Adv 2022; 6(8):2480)。いずれの耐性株も親株に比べてエクソソーム放出が著明に亢進していることがわかった。さらに、耐性株由来のエクソソームは、レナリドミド感受

性細胞に薬剤耐性能を伝播するとともに、耐性化した細胞では培養皿への接着能が促進しており､エクソソーム関連薬剤耐性では細胞接着仲介薬剤耐性(CAM-DR)が重要と考えられた。次に、RNA sequence を行い、耐性株では親株に比べ細胞内小胞輸送に関わる SORT1 および LAMP2 の発現が上昇していることを見出した。これら 2 遺伝子のノックダウン細胞では、エクソソーム分泌の低下、レナリドミドへの感受性の回復、接着能の消失が確認された。

同一患者の骨髄および髄外病変（胸水）より樹立した骨髄腫細胞株ペア 2 種を用いて、髄外病変で高発現する遺伝子についてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、髄外病変で発現が上昇し、かつデータベース解析で予後不良に関連する遺伝子として、*RGS-1* と *SDC4* 遺伝子を見出した。RGS-1 は G タンパク質シグナル伝達調節因子の一つであり、SDC4 はヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種である。共に細胞内増殖シグナル伝達を増強することによって髄外病変形成に関わることが推測された。

② 難治性骨髄腫克服を目指した創薬研究

天然物 komaroviquinon 誘導体群から､腫瘍増殖抑制作用が強い化合物を数種分離しているが、さらに正常のマウス骨髄細胞には毒性が低い最適化化合物として GTN057 を見出した。我々は偶然、GTN057 が HGFR/c-MET のチロシンキナーゼ活性を抑制することを見出した。GTN057 は、EGF や FGF 受容体シグナル伝達には影響を及ぼさず YxxxYY motif を有するキナーゼ群を選択的に阻害すると考えられた。GTN057 は、活性酸素種産生、抗腫瘍血管新生作用も有しており、pleiotropic な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。また、GTN057 腹腔内単回注射後のマウス体内の薬物動態を検索した。LC/MS/MS 解析により代謝産物の検出を試み、そのうち GTN054 は強い腫瘍増殖抑制効果を示すことも判明した。すなわち、GTN057 は直接作用のみならず prodrug としても抗腫瘍効果を発揮することが推測された（Okayama M, et al. Cancer Medicine 2023 *in press*）。

骨髄腫細胞は過剰な M 蛋白産生により proteotoxic な状態にあると考えられる。その結果生じたミスフォールド蛋白を分解するオートファジー経路は、創薬研究の標的として興味がもたれる。まず、既存の骨髄腫治療薬のオートファジーへの作用を検討したところ、薬剤によって種々の反応を示すことが分かった。さらに、ドラッグリポジショニングにより、新たなオートファジー阻害薬の開発も進行中である。

③骨髄腫患者の予後を推測するバイオマーカーの検索。

我々はこれまでに、骨髄腫細胞株において E および N-cadherin が高発現していることを見出している。その臨床的意義を明らかにするために、骨髄腫患者の骨髄ならびに髄外病変の検体を用いて病理組織学的検討を行った｡その結果､E-cadherin 陰性症例は、陽性例に比べて有意に髄外病変を形成する頻度が高く、予後不良であった。また一部の症例において髄外病変では E-cadherin 陰性細胞が選択的に増殖していることも見出した（Hirao M, et al. F1000 Research 2022; 11:245.）。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Hattori Y, Futo T, Uozaki R, Ichikawa D, Yamaguchi Y, Yamamoto T, Matsushita M, Hirao M	４．巻 115
２．論文標題 Integrin β5 and β7 expression in lenalidomide‐resistant multiple myeloma cells	５．発行年 2022年
３．雑誌名 International Journal of Hematology	６．最初と最後の頁 605-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-022-03297-w	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 Yamamoto T, Nakayama J, Yamamoto Y, Kuroda M, Hattori Y, Ochiya T.	４．巻 6(8)
２．論文標題 SORT1/LAMP2-mediated Extracellular Vesicle Secretion and Cell Adhesion Are Linked to Lenalidomide Resistance in Multiple Myeloma	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Blood Advances	６．最初と最後の頁 2480-2495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021005772	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 Hirao M, Yamazaki K, Watanabe K, Mukai K, Hirose S, Osada M, Tsukada Y, Kunieda H, Denda R, Kikuchi T, Sugimori H, Okamoto S, Hattori Y.	４．巻 -
２．論文標題 Negative E-cadherin expression on bone marrow myeloma cell membranes is associated with extramedullary disease.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 F1000 Research 2022 Feb 28; 11:245.	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/ f1000research.109551.1	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 －

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Kaneko R, Hattori Y, Matsusita M, Ichikawa D
２．発表標題 Effect of Multiple Myeloma Therapeutics on Autophagy Pathway
３．学会等名 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
４．発表年 2021年

１．発表者名
Sugiyama H, Kaneko S, Fujihashi K, Shibata S, Matsumoto Y, IImura N, Endo S, Inoue M, Ichikawa D, Matsushita M, Yamazaki K, Hirao M, Hattori Y.

２．発表標題
Drug repositioning revealed ambroxol induced myeloma cell death by inhibiting autophagy.

３．学会等名
The 84th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology

４．発表年
2022年

１．発表者名
Kurita K, Matsushita M, Tamura K, Ichikawa D, Suto Y, Iwasaki G, Hattori Y.

２．発表標題
Development of komaroviquinone-derivatives that induce immune cell death of multiple myeloma.

３．学会等名
The 84th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology

４．発表年
2022年

１．発表者名
服部豊

２．発表標題
造血器腫瘍に対する治療のstate-of-the-arts　多発性骨髄腫

３．学会等名
日本薬学会生物系薬学部会主催　第22回Pharmaco-Hematologyシンポジウム（招待講演）

４．発表年
2022年

１．発表者名
唐崎翼、小山遼太郎、杉山裕夢、臼井凜、栗田昂希、市川大樹、松下麻衣子、山崎皓平、平尾磨樹、服部豊

２．発表標題
髄外病変で高発現するリプログラミング因子がもたらす骨髄腫の病態への寄与

３．学会等名
日本薬学会生物系薬学部会主催　第22回Pharmaco-Hematologyシンポジウム

４．発表年
2022年

１．発表者名 栗田昂希、臼井凜、杉山裕夢、唐崎翼、市川大樹、松下麻衣子、服部豊
２．発表標題 多発性骨髄腫に対して免疫原性細胞死を誘導するコマロビキノン誘導体の開発
３．学会等名 日本薬学会生物系薬学部会主催　第22回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
４．発表年 2022年

１．発表者名 大月萌賀、松下麻衣子、須田ゆきの、斎藤朔、市川大樹、服部豊
２．発表標題 多発性骨髄腫に対するKU-MEL-9を標的とした免疫療法の開発
３．学会等名 日本薬学会生物系薬学部会主催　第22回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
４．発表年 2022年

１．発表者名 臼井凜、唐崎翼、栗田昂希、杉山裕夢、市川大樹、松下麻衣子、平尾磨樹、服部豊
２．発表標題 Len長期暴露細胞株の樹立とインテグリンβ-5及びインテグリンβ-7の薬剤耐性への関与
３．学会等名 第47回日本骨髄腫学会学術集会
４．発表年 2022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
研究分担者	山田　健人 (Yamada Taketo) (60230463)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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