

博士論文 (要約)

Small-molecule HDAC and Akt inhibitors suppress tumor growth and enhance immunotherapy in multiple myeloma (HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬は多発性骨髄腫において腫瘍増殖を抑制し、腫瘍免疫を賦活化する)

平 野 光 人

多発性骨髄腫の治療は、多くの治療薬が出現しているものの、再発難治例が一定の割合で発症し、予後に悪影響を及ぼす。よって、再発・難治性多発性骨髄腫の治療法の開発は急務である。

再発・難治性多発性骨髄腫に対する治療法として、私はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬に着目した。HDAC はクロマチン構造におけるヒストンの脱アセチル化を行う酵素であり、遺伝子発現を構成的に調節する。HDAC 阻害が腫瘍の増殖に寄与する異常なエピジェネティックな変化を逆転させ、腫瘍の免疫原性を高めることが報告されている。過去の報告では、HDAC 阻害薬が、白血病細胞株の NKG2D (Natural killer group 2, member D) リガンドの発現を上昇させることが示唆されている。腫瘍細胞の NKG2D リガンドは、NK 細胞の NKG2D 受容体と相互作用することで、NK 細胞を活性化させることが知られている。NK 細胞などの免疫細胞を活性化させて治療する戦略は、多発性骨髄腫を含む多くの悪性腫瘍で注目されている。また、NK 細胞は、抗体薬の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) においても重要な役割を果たす。NKG2D リガンドには、主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 関連 A 鎖 (MICA) および B 鎖タンパク質 (MICB) と UL16 結合タンパク質 (ULBP) などが含まれる。

私は、フローサイトメトリーにて、HDAC 阻害薬が骨髄腫の MICA/B、ULBP などの NKG2D リガンドと CD38 の発現を増強することを確認した。また mRNA レベルで、MICA の発現を増強させることを確認した。さらに、ドラツムマブとエロツズマブなどの抗体医薬の ADCC 活性を増強させることを見出した。また、HDAC 阻害薬は NK 細胞の直接細胞殺傷効果を増強させた。GenomicScape に収載されている 414 例の初発多発性骨髄腫患者のデータを調べたところ、MICA の発現が高い患者群は、低い患者群に比べて、有意に予後良好であることが示唆された。このように、HDAC 阻害薬によって MICA の発現を増強させることは、再発難治例を含めた骨髄腫患者の治療に有用であることが示唆された。

IKZF1 (IKAROS family zinc finger 1) と IKZF3 (IKAROS family zinc finger 3) は MICA の負の制御因子として知られている。私は、HDAC 阻害薬が IKZF1 や IKZF3 に対してどのように影響するかを検証した。その結果、HDAC 阻害薬は mRNA レベルで IKZF1 や IKZF3 の発現を低下させることがわかった。

免疫調節薬 (IMiDs) の 1 種であるレナリドマイドは、骨髄腫細胞に発現するセレブロン (CRBN) が不可欠である。CRBN は IMiDs の主要なメディエーターであり、CRBN の遺伝子変化は、IMiDs 耐性患者においては、しばしば頻繁に検出され IMiDs 耐性に寄与すると考えられている。私は、レナリドマイド耐性患者に対する治療法を検討するため、骨髄腫の CRBN を RNA 干渉によってノックダウン (KD)、または CRISPR-Cas9 を使ってノックアウト (KO) した細胞株を使用した。CRBN を KD した RPMI8226、H929、KD/KO した OPM-2 は、レナリドマイド存在下でも生存し、細胞の増殖を認めた。

レナリドマイド耐性は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK-3) のリン酸化の亢進によ

っても引き起こされる。多発性骨髄腫では PI3K / Akt 経路が異常に活性化されており、GSK-3 は Akt によってリン酸化される(p-GSK-3)と活性を失い、c-Myc を分解することができない。従って、p-GSK-3 の増加は c-Myc の安定化に寄与し、骨髄腫細胞の生存とレナリドマイド抵抗性をもたらす。

私は、CRBN を KD/KO した骨髄腫細胞株(RPMI8226、H929、OPM-2)にレナリドマイドを暴露すると、GSK-3 のリン酸化が亢進し、c-Myc の発現が増強することを見出した。また、HDAC 阻害薬は CRBN KD/KO 細胞に対しても、mRNA レベルで MICA の発現を上げ IKZF1 の発現を抑制した。以上のことから、HDAC 阻害薬は CRBN 非依存性の経路で、mRNA レベルで作用することが示唆された。

さらに私は、HDAC 阻害薬が CRBN を KO した OPM-2 に対し、タンパク質レベルで GSK-3 のリン酸化を抑制し、c-Myc の発現を低下させることを確認した。HDAC 阻害薬は mRNA レベルでも c-Myc の発現を低下させた。また、HDAC 阻害薬を上記骨髄腫細胞株に暴露したところ、いずれの骨髄腫細胞株に対しても細胞殺傷効果を示した。

次に、私は Akt 阻害薬の抗骨髄腫作用を検証した。Akt 阻害薬は骨髄腫細胞株に対し、タンパク質レベルで GSK-3 のリン酸化の抑制と c-Myc の発現を低下させた。Akt 阻害薬も、骨髄腫細胞株に対して細胞殺傷効果を示した。また、HDAC 阻害薬と Akt 阻害剤を併用した場合、一部の骨髄腫細胞株に対して、相乗的な細胞殺傷効果を示した。また、ウェスタンブロットやフローサイトメトリーにて HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬によるアポトーシスの誘導について検証した。HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬は、単剤でもアポトーシスを誘導したが、併用によってより強くアポトーシスを誘導した。

さらに、HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬の併用は、タンパク質レベルで著明な GSK-3 のリン酸化の抑制と c-Myc の発現を低下させた。レナリドマイドは CRBN KD/KO 細胞において c-Myc の発現を増強することから、HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬は、c-Myc の発現増強によるレナリドマイド抵抗性を克服できると考えられた。

また、HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬の併用は、親株の骨髄腫細胞株に加え、複数の薬剤耐性株(CRBN KD/KO 細胞、ボルテゾミブ耐性株、ドキシソルビシン耐性株、デキサメタゾン耐性株)に対しても細胞殺傷効果を示した。次に、私は GSK-3 阻害薬(CHIR 99021)と HDAC 阻害薬、Akt 阻害薬の組み合わせによって、HDAC 阻害薬、Akt 阻害薬の細胞殺傷効果がどのように変化するかを検証した。CHIR 99021 は GSK-3 β の機能を特異的に抑制することで GSK-3 の働きを阻害する。その結果、CHIR 99021 と組み合わせた場合は、組み合わせていない場合と比較して、HDAC 阻害薬も Akt 阻害薬も、細胞殺傷効果が減弱することを明らかになった。この事実は GSK-3 が、HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬が骨髄腫細胞に示す細胞殺傷効果の中で、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これらの結果を基に、私は HDAC と PI3K の二重阻害薬である CUDC-907 に着目した。PI3K は Akt の上流にあるため、CUDC-907 は HDAC 阻害薬と Akt 阻害薬の特性を兼ねていると考えられた。フローサイトメトリーにて、CUDC-907 が骨髄腫細胞株の

MICA/B、ULBp の発現を上昇させていることを明らかにした。また、mRNA レベルでも MICA の発現を上昇させ、IKZF1、IKZF3、c-Myc の発現を低下させた。さらに、ダラムマブとエロツズマブの ADCC 活性を増強させた。CUDC-907 は CRBN ノックアウト細胞に対しても、mRNA レベルで、MICA の発現を上昇させ、IKZF1、IKZF3、c-Myc の発現を低下させた。さらに、タンパク質レベルにおいても、GSK-3 のリン酸化の抑制、c-Myc の発現を低下させた。

CUDC-907 の細胞殺傷効果について検証したところ、親株の骨髓腫細胞株に加え、CRBN KD/KO 細胞株、ボルテゾミブ耐性株、ドキソルビシン耐性株、デキサメタゾン耐性株に対して有意な殺細胞殺傷効果を示した。

また私は、OPM-2 CRBN KO 細胞を使用したマウスモデルに対し、CUDC-907 の有用性を検証した。CUDC-907 は DMSO に溶かし、PEG300 と Tween80 と蒸留水と混合した。コントロールは、DMSO、PEG300、Tween80、蒸留水を混合して作製した。その結果、CUDC-907 投与群はコントロール投与群と比較して、腫瘍増殖を抑える可能性が示唆された。

さらに私は、未治療およびレナリドマイド耐性を含む再発・難治性の骨髓腫患者から採取した検体を用いて、CUDC-907 の効果を検証した。CUDC-907 は未治療 5 例と再発難治 6 例の患者由来の細胞に対しても細胞殺傷効果を示した。これらの結果から、CUDC-907 はレナリドマイド耐性を含む再発・難治性の骨髓腫患者に対しても有効である可能性が示唆された。

結論として、HDAC と、PI3K または Akt を阻害することによって、骨髓腫細胞の生存に不可欠な c-Myc を相乗的に抑制することを明らかにした。また、HDAC 阻害による NKG2D リガンドの発現の増強は、抗体療法の効果を増強する可能性が示唆された。

以上のことから、HDAC 阻害薬、Akt 阻害薬および CUDC-907 は、レナリドマイド耐性を含む再発・難治性骨髓腫にとって有望な治療法である可能性が示唆された。