

令和元年5月9日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07178

研究課題名(和文)酸化ストレスによる多発性骨髄腫病態修飾機序の解析および新規治療法の開発

研究課題名(英文)Reactive oxygen species play roles in multiple myeloma pathogenesis

研究代表者

高田 弘一 (Kohichi, Takada)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90398321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞の細胞膜タンパクとして同定されたSTEAP1は、様々な癌腫で過剰発現し、ROS産生を惹起する可能性が報告されている。本研究では、多発性骨髄腫(MM)におけるSTEAP1およびROSがMMの病態生理に与える影響を解析した。STEAP1高発現群が有意にその予後が不良であった。STEAP1をknock-downすることにより細胞内ROS産生が低下し、migration, invasionおよび骨髄ホーミング能が抑制された。STEAP1抑制によってROS産生が低下する機序としてNRF2の関与が示唆された。本研究から、STEAP1がMM治療の標的分子になり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究は、解析されていないSTEAP1-ROSがMMの転移・浸潤、ならびに骨髄ホーミングに関与していることを明らかにした。MM細胞のROS産生低下を誘導可能な薬剤としてSTEAP1抑制薬あるいはNRF2賦活剤がMMの治療薬として有用である可能性が示唆された。以上より、新規MM治療薬開発に貢献でき、臨床的意義が高い。さらに、同研究成果はさまざまな癌腫にも応用可能であり、本研究の社会貢献度は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 (STEAP1), identified in prostate cancer cells as a cell surface protein, is over-expressed in a subset of human cancers. In cases of Ewing sarcoma, STEAP1 augmented cell proliferation and invasion and was accompanied by increased reactive oxygen species (ROS) levels. Here, we characterized the biological impact of STEAP1 and ROS in multiple myeloma (MM) pathogenesis. STEAP1 expression negatively correlated with OS as determined from a publicly accessible gene expression profile data set. A loss-of-function approach in cultured MM cell lines revealed that STEAP1 silencing suppressed migration, invasion and bone marrow homing through inhibition of ROS production. Mechanistically, the inhibition of STEAP1 was associated with increased expression of anti-oxidant molecules regulated by the transcription factor, nuclear erythroid 2-related factor (NRF2), in MM cells. This study identified STEAP1 as a therapeutic target for MM.

研究分野：臨床腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 STEAP1 活性酸素種 転移 浸潤 骨髄ホーミング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進行に伴い、世界的に多発性骨髄腫(MM)の発生率は増加の一途にある。本邦においても国立がん研究センターの2015年がん統計予測によれば、罹患数は8,600人、死亡者数は4,200人以上にもものぼると推定されている。本疾患の治療成績は新規薬剤の導入により改善してきているが、未だ治癒を期待できる治療法はなく、予後不良な疾患である。よって、より有効な新規治療法の開発が待たれている。MMでは、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルが活性化され、細胞増殖能を亢進させていることから、MM治療において同シグナルは治療標的として極めて重要である (Takada K, Sci Transl Med 2012, Cancer Res 2014)。一方、鉄は酸素運搬・DNA合成など細胞の生存維持に必須の元素である。多くの癌細胞では細胞増殖能およびDNA合成亢進に伴い、鉄要求度が増加している。申請者は、鉄代謝関連分子発現多寡がMM患者の生存期間(OS)に与える影響を網羅的に解析した。その結果、ferroportin(FPN)のmRNA発現低下群(Takada K, Oncotarget 2016)およびSix Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1(STEAP1)のmRNA発現増加群が有意に予後不良であることを見出した(図1)。実際に申請者は、MM細胞株および患者細胞で、FPNの発現低下(Takada K, Oncotarget 2016)ならびにSTEAP1の発現亢進を確認している(図2)。FPNは、唯一細胞内の鉄を排出する分子である。したがって、MM細胞では細胞内鉄濃度が増加していることが推測されたため、細胞内 $Fe^{2+}$ をlive cell imagingで観察したところ、正常末梢血単核球(PBMC)に比較してMM細胞株では細胞内 $Fe^{2+}$ 濃度が増加していた。細胞内過剰鉄は活性酸素種(ROS)を誘導する可能性がある。一方、STEAP1にはferric oxidoreductase構造があるが、鉄の吸収・還元に関与していないことが報告されている。しかしながら、STEAP1発現上昇もその機序は不明であるがROS産生を増強させ得る可能性が報告されている。そこで、フローサイトメトリーを用いてROSを検討した結果、MM細胞では高濃度のROSが検出された。以上の検討結果より、MMでは細胞内過剰鉄ならびにSTEAP1発現上昇によりROSが過剰に産生されている可能性が示唆された。しかしながら、その機序やROSがMMの病態生理に関与しているか否かはこれまで検討されていない。固形がんにおいてROSは、転移・浸潤を増強する因子の一つとして同定されている。

### 2. 研究の目的

本研究では鉄ならびにSTEAP1によるROS産生亢進機構を解析し、ROSがMM細胞の転移・浸潤能、骨髄へのホーミングを促進させるか否かを検討するとともに、ROSがWntシグナルへ与える影響を明らかにすることを目的とする。さらに、酸化ストレスを軽減することが抗MM転移療法として有用であることの検証をin vivo scaffold systemを用いて行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) STEAP1発現多寡によるMM患者の予後解析

MAQC-II Project MM data set (publicly available gene expression data set) を用いてSTEAP1発現多寡によるMM患者の予後の差異をKaplan-Meier法を用いて算出した。

#### (2) qRT-PCRを用いたSTEAP1 mRNA発現量の検討

MM細胞株およびMM患者CD138陽性細胞からTRIzol (Invitrogen) を用いてRNAを抽出する。SuperScript VIL0 cDNA合成キット (Invitrogen) を用いてcDNAを作製する。cDNAを用いてSTEAP1発現量をqRT-PCR法で定量した。

#### (3) 鉄キレート剤あるいは抗酸化剤によるROS産生抑制

MM細胞株を鉄キレート剤(deferasirox(DFX)など)あるいはNAC, DPI処理した際の、ROS濃度の変化をCellROX Deep-Red (life technology)を用いてフローサイトメトリーで測定した。

#### (4) sh-cont-GFPおよびsh-STEAP1-GFP細胞株の樹立

既報と同様に(Takada K, Blood 2009), MM細胞にレンチウイルスシステムを用いてsh-cont-GFPまたはsh-STEAP1-GFPを感染させ、GFP陽性細胞をflow cytometerでsortingした。

#### (5) ROS抑制による転移・浸潤能低下の解析

浸潤能に関しては $2 \times 10^5$ のMM細胞をMatrigel Boyden chamber (BD Biosciences) に蒔き、24時間培養した後、微小孔フィルターを通じて裏面に移動した細胞が付着したセルカルチャーインサートを100%メタノール液に6分間入れて固定し、蒸留水で洗浄した後、Giemsa染色液で40分間染色する。フィルターをインサートから切り離し、フィルター裏面に接着している細胞が上面になるようにスライドガラスに接着し包埋した。プレパラートを倍率400倍で観察し、フィルター1枚に接着して細胞数を無作為に3ヵ所計算し、その平均を求める。一方、migrationに関しては $2 \times 10^5$ のMM細胞をtranswell chamber (Corning Costar)のupper chamberに蒔き、chamberの膜を通過し得た細胞の数をカウントすることによって評価した。

#### (6) ROSによって誘導される転移・浸潤能亢進を担う分子の同定

Real-time PCR for RT<sup>2</sup> Profiler PCR arrayを用いて解析した。

#### (7) in vivo scaffold systemによる骨髄ホーミングの解析

既報に準じて、 $2 \times 10^6$  BMEC-60またはHS5細胞を50  $\mu$ g/ml fibronectinでコーティングしたpoly-e-caprolactone polymeric scaffoldsと共にプレートで2週間培養後、5-week-old non- $\gamma$ -irradiated CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-JCr1 male miceに移植する。移植2週間後にルシフェラーゼラベルしたMM細胞をマウス尾静脈より静注した。その後、経時的にwhole body

imaging を LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) を用いて行った。

(8) マウス xenograft 全身播種モデルによる転移・浸潤亢進の検討

NOG マウスの尾静脈よりルシフェラーゼラベルした MM 細胞を静注し、NAC 投与群および非投与群で MM 細胞の播種の差異を whole body imaging で検討した。担癌マウスの complete necropsy を行い、組織学的に全身への転移を評価した。血管新生の評価は、抗 CD34 抗体を用いた免疫染色法で行った。

(9) コンピューター支援ソフトを用いた STEAP1 阻害分子のバーチャルスクリーニング

Autodock を用いてデータベース ZINC 中の化合物を STEAP1 分子にドッキングし、結合エネルギーの低いものをリード化合物として選出を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) STEAP1 発現量が予後に与える影響

*in silico* 解析の結果、STEAP1 高発現群の予後が有意に不良であった (図 1)。

(2) MM 細胞株および患者 MM 細胞における STEAP1 の発現

MM では STEAP1 mRNA の発現が亢進していた (図 2)。

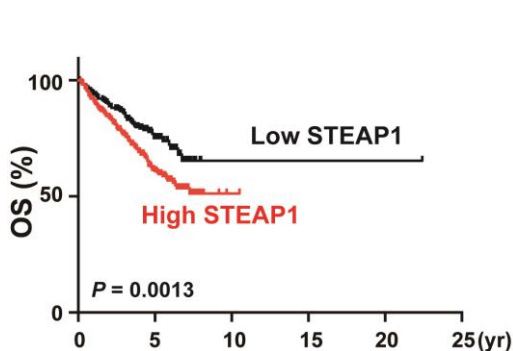


図1 STEAP1 expression determine clinical outcome

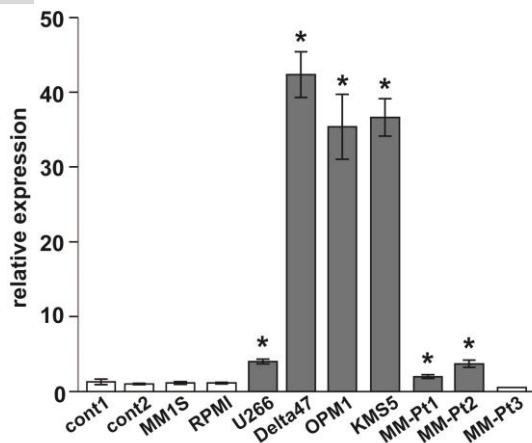


図2 STEAP1 expression in MM

(3) STEAP1 発現と MM 細胞内 ROS

MM 細胞内 ROS は si\_STEAP1 導入で有意に低下した (図 3)。同様に、U266-sh-STEAP1 細胞においてもコントロール (U266-sh-cont) と比較して細胞内 ROS は低下していた。

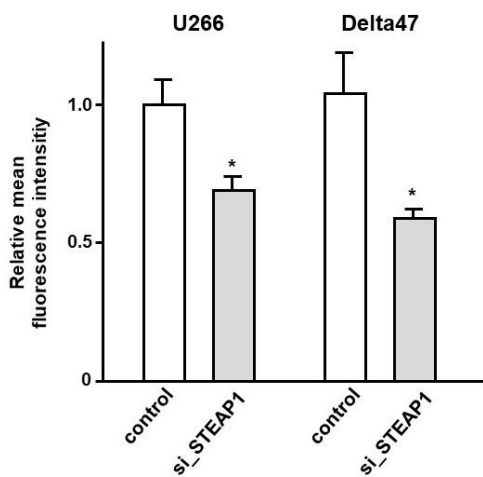


図3 ROS production is decreased by STEAP1 inhibition

(4) STEAP1 K/D が migration および invasion 能に与える影響

STEAP1 K/D による ROS の低下によって U266-sh-STEAP1 細胞の migration および invasion 能は低下した。

(5) ROS 抑制または STEAP1 K/D による Wnt シグナル下流遺伝子の変化

U266 細胞に抗酸化剤である DPI で処理したところ Wnt シグナルに特異的であることが証明されている Axin2 の mRNA が有意に低下した。STEAP1 K/D によっても Axin2 は低下し、Wnt 特異的のルシフェラーゼ活性も抑制されていた。

(6) MM 細胞の骨髄ホーミング

マウス xenograft ならびに scaffold system を用いて検討した結果、U266-sh-STEAP1 細胞では U266-sh-cont 細胞と比較し、有意に骨髄ホーミングが減少していた。

(7) STEAP 下流の分子

U266-sh-STEAP1 / U266-sh-cont 細胞を用いて PCR array を行った結果、STEAP1 の下流に NRF2 が存在している可能性を見出した。

(8) STEAP1 阻害分子のバーチャルスクリーニング

Autodock を用いてデータベース ZINC 中の化合物を STEAP1 分子にドッキングし、結合エネルギーの低いものをリード化合物として選出を試みたが、STEAP1 阻害分子となり得る分子の同定は困難であった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

(1) Yoshida M, Horiguchi H, Kikuchi S, Iyama S, Ikeda H, Goto A, Kawano Y, Murase K, **Takada**

- K, Miyanishi K, Kato J, Kobune M. miR-7977 inhibits the Hippo-YAP signaling pathway in bone marrow mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2019 14(3):e021320. doi: 10.1371/journal.pone.0213220. 査読あり
- (2) Nakamura H, Takada K, Arihara Y, Hayasaka N, Murase K, Iyama S, Kobune M, Miyanishi K, Kato J. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 protects against increased oxidative stress via a nuclear erythroid 2-related factor pathway in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther* 2018 doi: 10.1038/s41417-018-0056-8. 査読あり
  - (3) Sakurada A, Miyanishi K, Tanaka S, Sato M, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Nakabeppu Y, Kobune M, Kato J. An Intronic Single Nucleotide Polymorphism in the MUTYH Gene Is Associated with Increased Risk for HCV-induced Hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med* 2018 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.010. 査読あり
  - (4) Sato M, Miyanishi K, Tanaka S, Sakurada A, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Kobune M, Kato J. Increased Duodenal Iron Absorption through Upregulation of Ferroportin 1 due to the Decrement in Serum Hepcidin in Patients with Chronic Hepatitis C. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018 doi: 10.1155/2018/2154361. 査読あり
  - (5) Ibata S, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Miura S, Horiguchi H, Murase K, Iyama S, Takada K, Miyanishi K, Kato J. High expression of nucleoporin 133 mRNA in bone marrow CD138+ cells is a poor prognostic factor in multiple myeloma. *Oncotarget* 2018, 9(38): 25127-25135. doi: 10.18632/oncotarget.25350. 査読あり
  - (6) Arihara Y, Takada K, Kamihara Y, Hayasaka N, Nakamura H, Murase K, Ikeda H, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. *Oncotarget* 2017, 8(39):65889-65899. doi: 10.18632/oncotarget.19508. 査読あり
  - (7) Uemura N, Kikuchi S, Sato Y, Ohnuma H, Okamoto K, Miyamoto H, Hirakawa M, Sagawa T, Fujikawa K, Takahashi Y, Okuda T, Minami S, Takahashi M, Okamoto T, Takada K, Miyanishi K, Takayama T, Kato J. A phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and S-1 (mDCS) chemotherapy for unresectable advanced gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017, 80(4):707-713. doi: 10.1007/s00280-017-3404-8. 査読あり
  - (8) Hatake K, Ogura M, Takada K, Taniwaki M, Zhang F, Fujita T, Ando K. Ofatumumab combined with chlorambucil for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: a phase I/II, open-label study in Japan. *Int J Hematol* 2017, 106(2):240-247. doi: 10.1007/s12185-017-2233-1. 査読あり
  - (9) Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, Kikuchi S, Osuga T, Nakakura H, Kamihara Y, Hayasaka N, Usami M, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Activated p53 with Histone Deacetylase Inhibitor Enhances L-Fucose-Mediated Drug Delivery through Induction of Fucosyltransferase 8 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS One* 2016, 11(12):e0168355. doi: 10.1371/journal.pone.0168355. 査読あり
  - (10) Ibata S, Sato T, Kuroda H, Nagamachi Y, Iyama S, Fujimi A, Kamihara Y, Konuma Y, Yoshida M, Tatekoshi A, Hashimoto A, Horiguchi H, Ono K, Murase K, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Hirayama Y, Kato J. A phase II trial of small-dose bortezomib, lenalidomide and dexamethasone (sVRD) as consolidation/maintenance therapy in patients with multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016, 78(5):1041-9. 査読あり
  - (11) Kamihara Y, Takada K, Sato T, Kawano Y, Murase K, Arihara Y, Kikuchi S, Hayasaka N, Usami M, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Kato J. The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ $\beta$ -catenin signaling in human multiple myeloma. *Oncotarget* 2016, 7(39):64330-41. doi: 10.18632/oncotarget.11830. 査読あり
  - (12) Osuga T, Takimoto R, Ono M, Hirakawa M, Yoshida M, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Sato Y, Tamura F, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2016, 13;108(8). doi: 10.1093/jnci/djw210. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 中村元、高田弘一、早坂尚貴、在原洋平、宮西浩嗣、加藤淳二。  
STEAP1 を標的とした新規大腸癌治療法の開発。  
JDDW 2018 (第 60 回消化器病学会大会)。2018 年 11 月 1 日～4 日：兵庫県神戸市
- (2) Arihara Y, Takada K, Kawano Y, Hayasaka N, Nakamura H, Kikuchi S, Kamihara Y, Murase K, Ikeda H, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Kato J.  
p53-restoring small molecule CP-31398 induced apoptosis via induction of reactive oxidative species in human multiple myeloma.

European Hematology Association 2017. 2017 Jun 23~24: Spain, Madrid.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：加藤淳二

ローマ字氏名：KATO JUNJI

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：20244345

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰