

平成 22 年 4 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790673
 研究課題名 (和文) 多発性骨髄腫におけるレナリドマイド耐性の機序解析とそれに基づく新規併用療法の開発
 研究課題名 (英文) Analysis of lenalidomide-resistance in multiple myeloma

研究代表者
 安井 寛 (YASUI HIROSHI)
 札幌医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：40448593

研究成果の概要： 多発性骨髄腫におけるレナリドマイド耐性の機序解析を行うため、レナリドマイド感受性骨髄腫細胞株から、レナリドマイド抵抗性の細胞株を樹立した。これら細胞株間の遺伝子発現の相違を DNA アレイにより解析し、レナリドマイドによる抗骨髄腫効果とレナリドマイド抵抗性の機序とを検討した。これらの機序解析は、レナリドマイド抵抗性を克服する新規併用療法を開発するにあたり、有用な情報となると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学、多発性骨髄腫、サリドマイド誘導体

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、形質細胞の悪性腫瘍である。予後は極めて不良であり、標準化学療法での平均生存期間が3-4年、自家幹細胞移植を併用した大量化学療法で4-5年と若干の延長をみるものの、その経過中に治療抵抗性を獲得するため、治癒を得ることは極めて困難である。近年、このような状況の中、遺伝子情報やシグナル伝達に基づく新規治療薬の開発が欧米を中心に活発に行われており、2003年にプロテアソーム阻害剤ボルテゾミ

ブ、2006年にサリドマイド誘導体レナリドマイド(lenalidomide)が、それぞれ骨髄腫治療薬として米国当局の承認を受けた。

これまで申請者らは、骨髄腫のトランスレーショナルリサーチを推進するハーバード大学ダナファーバー癌研究所ジェロムリッパ骨髄腫センター(米国マサチューセッツ州ボストン。統括者：Kenneth Anderson教授)において、多数の創薬の臨床前試験に携わりその結果を報告してきた。

特に、同センターで行われたレナリドマイドの臨床前試験の結果、レナリドマイド

が骨髄腫細胞に直接作用しアポトーシスを誘導すること、骨髄微小環境をも治療標的とし骨髄ストローマ細胞から分泌されるIL-6 や VEGF 分泌を抑制すること、T リンパ球や NK 細胞の骨髄腫細胞に対する細胞障害活性を誘導することなどが明らかとなった。その結果、レナリドマイドは同センターによる臨床試験を経て、2006 年米国当局に骨髄腫治療薬として認可されるに至った。

しかしながら、単剤での効果は十分とはいえ、その効果を上げるべくさまざまな併用療法が検討されている。例えば、同センターの臨床前試験によって明らかになったデキサメサゾンによるレナリドマイドの抗腫瘍効果の増強は、臨床試験においても、デキサメサゾン単剤と比べて、有意な効果持続期間と生存期間の延長を認めている。

しかしながら、レナリドマイドの骨髄腫に対する抗腫瘍効果の機序は、未だ不明な点が多い。さらに、レナリドマイドに対する抵抗性の獲得についても、その機序は未だ明らかではない。新規治療薬レナリドマイドの抗腫瘍効果の機序と、耐性獲得の機序とを明らかにすることにより、レナリドマイド耐性を克服しうる、より有効な併用療法の開発が進められ、その結果、難治性である多発性骨髄腫の予後を改善することが期待されている。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫は、治療経過中に治療抵抗性を獲得するため、治癒困難な悪性疾患である。その予後を改善するためには、薬剤耐性を克服するブレイクスルーが求められており、その一つとして、新規薬剤の開発と、それを用いた有効な併用療法の探求が求められている。2006 年米国当局に認可された新規薬剤レナリドマイドは骨髄腫患者に対して有望な成績をあげているが、単剤での効果は十分とはいえ、その効果を上げるべくさまざまな併用療法が検討されている。

当研究の目的は、未だ明らかとなっていないレナリドマイド誘導体レナリドマイド (lenalidomide) に対する治療抵抗性の標的分子を遺伝子発現プロファイリングなどの分子生物学的手法により見出し、その結果、レナリドマイド抵抗性の機序を明らかにし、それを克服しうる併用療法を検討することである。

近年、わたしたちは、今までにないモノクローナル抗体の開発や、エピジェネティックな解析に基づくメチル化阻害剤の骨髄腫治療への応用を検討している。レナリドマイド抵抗性の機序を明らかにすることで、これら新

規薬剤どうしの全く新しい併用療法も検討していきたいと、その基盤的なメカニズムの解析を進めるべく、当研究を行っている。

3. 研究の方法

(1) 各種骨髄腫細胞株におけるレナリドマイド感受性を評価するため、当科にある複数の骨髄腫細胞株 (RPMI8226, U266, OPM1, OPM2, MM1S, INA-6などを含む) に対するレナリドマイドの細胞障害活性をWST-8アッセイにより解析した。

(2) 次に、DNAアレイなどの遺伝子プロファイルの手法を用いて、薬剤感受性と関係する遺伝子セットを探索した。

初めに、レナリドマイド高感受性の骨髄腫細胞株を親株としたレナリドマイド耐性株を樹立した。高感受性株にレナリドマイドを長期暴露することで樹立されたレナリドマイド耐性株と、その親株との遺伝子発現の違いを Whole Human Genome array 4x44k を用いて解析した。

次に、レナリドマイド高感受性の骨髄腫細胞株において、レナリドマイド処理前後の遺伝子発現の変化を調べることで、レナリドマイドにより発現が変化しうる遺伝子セットを Whole Human Genome array 4x44k を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 初めに、各種骨髄腫細胞株すなわち、RPMI8226, U266, OPM1, OPM2, MM1S, INA-6を含めた複数の骨髄腫細胞株に対して、レナリドマイド 0.1-10 μM を投与し、48 時間および 72 時間培養した。細胞障害活性を WST-8 アッセイで評価した結果、細胞株 A (特許申請を検討しており、細胞株の名前は伏せさせていただきます) が、他の細胞株に対してレナリドマイド高感受性であることが明らかとなった。

(2) 次に、レナリドマイド高感受性細胞株 A にレナリドマイド 10 μM を長期暴露させ、継代した結果、レナリドマイド耐性の細胞株 (細胞株 A-R と表示させていただきます) が樹立された。親株である細胞株 A と、レナリドマイド耐性細胞株 A-R にレナリドマイド 0.1-10 μM を投与し 48 時間および 96 時間培養後、レナリドマイドの細胞障害活性を WST-8 アッセイにより評価した。細胞株 A では、レナリドマイド 0.1-10 μM 投与 96 時間後、非投与群と比較して 40-50% の viability の低下を認めたが、細胞株 A-R ではほとんど

viabilityの低下を認めなかった(図1)。この結果、レナリドマイド高感受性細胞株Aを親株とした、レナリドマイド抵抗性細胞株A-Rが樹立されたことが確認できた。

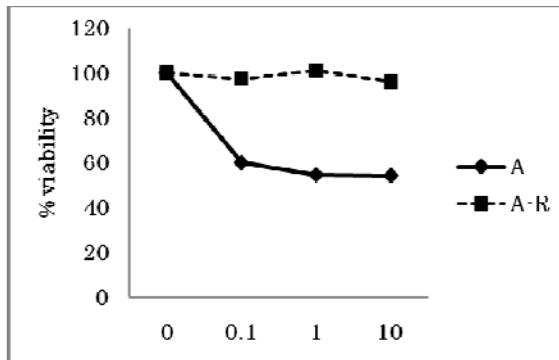


図1：骨髓腫細胞株AおよびA-Rにおけるレナリドマイドの細胞障害活性

(3) 次に、レナリドマイド高感受性細胞株Aとレナリドマイド耐性細胞株A-Rとの違いを明らかにするため、Whole Human Genome array 4x44kを用いて、遺伝子発現マイクロアレイを行い、細胞株Aと細胞株A-Rとの遺伝子発現を比較した。

このうち、細胞株Aに対して細胞株A-Rの発現比が3倍以上であった遺伝子は68あった。そのうち、複数のプローブで発現レベルが3倍以上あり、かつ多発性骨髄腫において発がんや癌進展に関与すると報告されている3遺伝子(B, C, D: 特許申請を検討しており遺伝子名は伏せさせていただく)に注目した。このうちBは、分泌性たんぱく質の一種で、骨髄腫および骨髄ストローマ細胞での高発現が確認されており、その発現増強が骨髄腫の進展に影響を与えることが報告されていることから、レナリドマイド抵抗性にも関与する可能性が示唆される。

次に、細胞株Aに対して細胞株A-Rの発現比が3分の1以下であった遺伝子は、およそ750あった。このうち、influx transporterの1種Eのレナリドマイド耐性株A-Rにおける発現低下は、レナリドマイドの細胞内取り込みを減少させる可能性があることから、耐性獲得のメカニズムと関与している可能性が示唆される。また、がん抑制遺伝子Fは、多発性骨髄腫において遺伝子欠失や遺伝子変異により発現が低下すること、細胞株における発現低下は細胞死感受性を低下させることが報告されているが、レナリドマイド耐性株A-Rにおいても、親株と比べてFの発現が低下していることが確認された。

(4) 次に、レナリドマイド高感受性細胞株Aにおいて、レナリドマイド処理前後の遺伝子発現の変化を調べることで、レナリドマイドにより発現が変化しうる遺伝子セットをWhole Human Genome array 4x44kを用いて解析した。すなわち、細胞株Aにレナリドマイド1μM投与後2, 4, 8時間後、RNAを抽出し、レナリドマイド非投与をコントロールとして、その遺伝子発現の変化を解析した。

レナリドマイドにより発現が増強した遺伝子として、36の遺伝子で3倍以上の発現増強が認められた。このうち、転写因子Gの発現増強は、転写因子Gが多くの抗アポトーシス分子の転写を促すことから、レナリドマイドによる細胞障害活性に代償的に働いていることが推測される。転写因子Gを抑制しうる薬剤を併用することにより、レナリドマイドの抗腫瘍効果を増強する可能性が示唆される。

次に、レナリドマイドにより発現が減少した遺伝子として、3分の1以下であった遺伝子はおおよそ360あった。このうちには、Hideshimaらが以前に報告したIL-6を含め、種々のサイトカインおよびその受容体が含まれていた。レナリドマイドによる細胞障害の機序として、サイトカインの減少が寄与している可能性が確認された。

以上の研究結果に基づき、レナリドマイドによる抗骨髄腫効果の機序と、レナリドマイド抵抗性獲得の機序とをさらに研究することは、レナリドマイド抵抗性を克服しうる新規併用療法の開発にあたり、有用な情報となると考えられる。

本邦においては、早ければ2010年度にも、レナリドマイドが新規骨髄腫治療薬として当局に認可されることが見込まれている。このため、未だ明らかとなっていないレナリドマイド耐性の機序解明とそれに基づく新規併用療法の開発は、急務と考える。このたびの研究を今後も継続することは、日本のみならず国際的にも重要な研究課題であり、その成果は骨髄腫患者の予後に大きなインパクトを与えることが予想される。

レナリドマイドの対象疾患は、米国当局に認可された多発性骨髄腫・骨髄異形成症候群のみならず、他の血液がんや固形癌へと拡大することが予想される。癌治療全体に強いインパクトを及ぼすべく、当研究が見出した成果に基づき、さらに当研究を継続していきたい。

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 12 件)

- ① Nojima M, Maruyama R, Yasui H, Suzuki H, Maruyama Y, Tarasawa I, Sasaki Y, Asaoku H, Sakai H, Hayashi T, Mori M, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(13):4356-64 (査読有)
- ② Okawa Y, Hideshima T, Steed P, Vallet S, Hall S, Huang K, Rice J, Barabasz A, Foley B, Ikeda H, Raje N, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Anderson KC. SNX-2112, a selective hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematological tumors by abrogating signaling via Akt and ERK. *Blood* 2009; 113(4):846-55 (査読有)
- ③ Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Lutz RJ, Yasui H, Okawa Y, Kiziltepe T, Vallet S, Pozzi S, Santo L, Perrone G, Tai YT, Cirstea D, Raje NS, Uherek C, Dälken B, Aigner S, Osterroth F, Munshi N, Richardson P, Anderson KC. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(12):4028-37 (査読有)
- ④ Yasui H, Imai K. Novel molecular-targeted therapeutics for the treatment of cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008; 8(5):470-80 (査読有)
- ⑤ Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Pozzi S, Breitkreutz I, Cirstea D, Santo L, Richardson P, Anderson KC. Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2008;141(5):659-71 (査読有)
- ⑥ Podar K, Raab MS, Tonon G, Sattler M, Barila D, Zhang J, Tai YT, Yasui H, Raje N, Depinho RA, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. Up-regulation of c-Jun inhibits proliferation and induces apoptosis via caspase-triggered c-Abl cleavage in human multiple myeloma. *Cancer Res.* 2007;67(4):1680-1688 (査読有)
- ⑦ Kiziltepe T, Hideshima T, Ishitsuka K, Ocio EM, Raje N, Catley L, Li CQ, Trudel LJ, Yasui H, Vallet S, Kutok JL, Chauhan D, Mitsiades CS, Saavedra JE, Wogan GN, Keefer LK, Shami PJ, Anderson KC. JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double strand breaks, activates DNA damage response pathways, and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. *Blood* 2007;110(2):709-18 (査読有)
- ⑧ Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, Dutta J, Yasui H, Rooney MD, Carrasco DE, Zheng M, He H, Tai YT, Mitsiades C, Anderson KC, Carrasco DR. Targeting the {beta}-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(18): 7516-7521 (査読有)
- ⑨ Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, Okawa Y, Ikeda H, Vallet S, Pozzi S, Ishitsuka K, Ocio EM, Chauhan D, Anderson KC. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(6):1718-27 (査読有)
- ⑩ Vallet S, Raje N, Ishitsuka K, Hideshima T, Podar K, Chhetri S, Pozzi S, Breitkreutz I, Kiziltepe T, Yasui H, Ocio EM, Shiraishi N, Jin J, Okawa Y, Ikeda H, Mukherjee S, Vaghela N, Cirstea D, Ladetto M, Boccadoro M, Anderson KC. MLN3897, a novel CCR1 inhibitor, impairs osteoclastogenesis and inhibits the interaction of multiple myeloma cells and osteoclasts.

Blood 2007;110(10):3744-52. (査読有)

- ⑪ Hideshima T, Catley L, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Tai YT, Vallet S, Kiziltepe T, Ocio E, Ikeda H, Okawa Y, Hideshima H, Munshi NC, Yasui H, Richardson PG, Anderson KC. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 2007;138(6):783-91 (査読有)
- ⑫ Neri P, Tassone P, Shammas M, Yasui H, Schipani E, Batchu RB, Blotta S, Prabhala R, Catley L, Hamasaki M, Hideshima T, Chauhan D, Jacob GS, Picker D, Venuta S, Anderson KC, Munshi NC. Biological pathways and in vivo antitumor activity induced by Atiprimod in myeloma. *Leukemia* 2007; 21(12):2519-2526 (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 安井 寛. 多発性骨髄腫における DNA 異常メチル化の網羅的解析と、新規メチル化標的遺伝子 RASD1. 第70回日本血液学会総会、口演、京都、2008年10月10日
- ② 安井 寛. 多発性骨髄腫における細胞死抵抗性とDNAメチル化の役割. 第32回日本骨髄腫研究会総会、口演、東京、2007年11月10日
- ③ Yasui H. Genomic screening for genes silenced by DNA methylation in multiple myeloma. 35th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sep-15-2007, Prague, Czech Republic

6. 研究組織

研究代表者

安井 寛 (YASUI HIROSHI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：40448593