

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16805

研究課題名(和文) IAP阻害剤による新規多発性骨髄腫治療の開発

研究課題名(英文) Simultaneous XIAP and cIAP1/2 inhibition by AZD5582 induces apoptosis in multiple myeloma

研究代表者

菊地 尚平(Kikuchi, Shohei)

富山大学・附属病院・特命助教

研究者番号：80515792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)のもつ抗アポトーシス作用は、治療抵抗性に関与する。IAPは、アポトーシス誘導を阻害し、その好発現は、予後不良因子となる。本研究では、IAPのうち最も強力に抗アポトーシスに関わるXIAP阻害能を有するAZD5582に着目し、検討した。AZD5582は、単剤で、MM細胞株に対して細胞増殖抑制効果を示し、アポトーシス誘導効果を示した。その効果は、骨髄微小環境に関するIL-6添加下でも認められた。さらには、プロテアソーム阻害剤カルフィルゾミブとの併用においても相乗効果が認められた。ほか既治療薬とも相乗効果が認められ、MMにおける新規治療薬として有望な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治困難な多発性骨髄腫診療において、あらたにIAP阻害剤の治療可能性を示した。治療標的としてのIAPにおいては、とくにXIAPが重要な治療標的であること示した。アポトーシス誘導は、ほか癌腫にも応用可能な有効な治療標的であり、IAPを標的としたあらたな治療薬開発の可能性を広げた。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins is associated with poor prognosis. Among IAPs, XIAP has the strongest anti-apoptotic function with direct binding activity to caspases and cIAP1 and cIAP2 are positive regulator of NF- $\kappa$ B signaling. A novel dimeric IAPi, AZD5582, have high binding potency to XIAP, enabling to simultaneously inhibit XIAP and cIAP1/2. AZD5582 monotherapy showed cell growth inhibition for all MM cell lines, MM1S, RPMI8226, U266 and KMS-5 and induced apoptosis. AZD5582 further showed anti-proliferation effect under the IL-6 additional condition. AZD5582 combined with carfilzomib therapy showed a synergistic effect. Enhanced apoptosis was also observed in combination therapy. Synergistic effect was further observed with other conventional therapeutics. Simultaneous XIAP and cIAP1/2 inhibition by the dimeric IAPi AZD5582 is promising. This study provides a rationale of AZD5582 as a new treatment strategy in monotherapy and in combination therapy.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 アポトーシス IAP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアソーム阻害剤や IMiDs の登場により多発性骨髄腫 (MM) の治療成績は向上したが、再発・難治症例では、根治は困難である。抗 CD38 抗体 Daratumumab の臨床応用により、再発症例に対しても、治療成績の向上がみられるが、いまだ十分ではない。Bortezomib 耐性などいくつかの治療抵抗要因が研究されているが、MM 細胞のもつ抗アポトーシス効果は治療抵抗性の一つの要因と考えられている。MM 細胞のもつ抗アポトーシス効果の解除は、MM において、重要かつ有望な治療標的の一つである。

近年細胞のもつ抗アポトーシス機構として、アポトーシス阻害因子 (IAP) が注目されている。アポトーシス誘導には、おもに FAS や TRAIL により誘導される Extrinsic 経路とミトコンドリアを介する Intrinsic 経路が存在するが、IAP である cIAP や XIAP はそのいずれにも関与し、IAP 阻害剤はアポトーシス誘導を目的とした治療薬として臨床応用が期待されている。いくつかの癌腫においては、cIAP の過剰発現が確認され、腫瘍細胞の cIAP の動員が合理的な治療標的として期待されている。多発性骨髄腫においても、おもに cIAP 阻害剤である LCL-161 が、前臨床段階および臨床試験で検討されたが、期待された抗腫瘍効果を示すことはできなかった (1)。多発性骨髄腫においては、cIAP 以外の IAP アイソザイムの阻害が、重要である可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、IAP アイソザイムのうち、最も強力な抗アポトーシス作用をもつ XIAP に着目した。これまで、親和性の問題から、XIAP を効率的に阻害しうる IAP 阻害剤はなかったが、今回新たに XIAP 阻害能を有する AZD5582 を用いて、多発性骨髄腫における IAP 阻害剤の抗腫瘍効果について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) MM 細胞における IAP アイソザイムの発現解析

MM における IAP 各アイソザイムの生物学的意義を検討するため、Public open の Gene expression profiling data を用いて、多発性骨髄腫、健常ドナー、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS) の RNA レベルの発現を比較検討する。さらには、MM 細胞株を用いて、蛋白レベルでの各発現を検討し、治療ターゲットとしての妥当性を検討する。

#### (2) IAP 阻害剤の IAP アイソザイム阻害効果の検討

IAP 阻害剤を用いて、XIAP、cIAP-1、cIAP-2 の各アイソザイム阻害効果を Immunoblotting 法により検討する。

#### (3) IAP 阻害剤単独による MM 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

IAP 阻害剤単剤における MM 細胞株に対する腫瘍増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて検討し、IAP 阻害効果と細胞増殖抑制効果の関連を検討する。さらに、FACS 解析および Immunoblotting 法をもちいて、IAP 阻害剤によるアポトーシス誘導の有無を検討する。

#### (4) IL-6 添加下での XIAP 発現および IAP 阻害剤の効果の検討

骨髄支持細胞等骨髄微小環境は、IL-6 等のサイトカイン分泌を介して、MM 細胞の生存に寄与している。骨髄腫診療において、骨髄微小環境サポートの克服は、重要な治療課題の一つである。さらに、XIAP 発現の発現は、IL-6 にも関与しており、IL-6 添加下での XIAP 発現および IAP 阻害剤の効果の検討した。Recombinant IL-6 添加下での XIAP の発現変化を Immunoblotting により検討し、IL-6 添加下での IAP 阻害剤の細胞増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて検討した。

#### (5) プロテアソーム阻害剤との併用効果の検討

プロテアソーム阻害剤は、MM 診療のキードラッグの一つであるが、ER ストレス誘導剤でもある。ER ストレス下のアポトーシス誘導シグナルは、強力なアポトーシス誘導をもたらすことが知られており、同経路の誘導は、強力な抗腫瘍効果が期待される。プロテアソーム阻害剤との併用により、より強調されたアポトーシス誘導が期待され、カルフィルゾミブとの相乗効果を MTT アッセイにより細胞増殖抑制効果を比較し検討した。さらに、アポトーシス誘導効果を FACS 解析および Immunoblotting 法により解析した。さらに、既存治療薬との相乗効果も併せて、MTT アッセイにより検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MM 細胞における IAP isozyme 発現の差異の検討

MM 細胞における IAP の生物学的意義を検討するため、MM、健康ドナー、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS) 症例の各 IAP Isozyme の遺伝子レベルの発現を公開されている Gene expression profiling data (GSE6691, GSE2113) を用いて解析した。ヒト MM 細胞において、XIAP の発現レベルは、健康者あるいは MGUS 症例と有意差がなかった。一方 cIAP においては、cIAP-1 の発現レベルは、健康者より発現が低く、cIAP-2 においては、発現の高い傾向があった。(Figure 1)

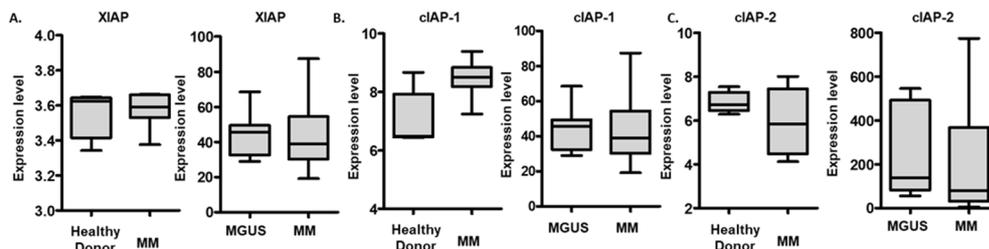


Figure 1

MM 細胞株を用いた検討では、XIAP は、全細胞株で発現が認められたが、cIAP に関しては、細胞株間で発現の差異が認められた (Figure 2)

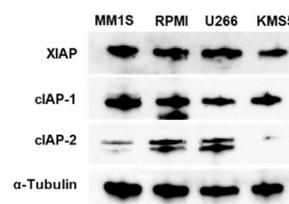


Figure 2

##### (2) IAP 阻害剤による各 IAP isozyme 阻害効果の検討

AZD5582 および Birinapant による IAP 各 isozyme 阻害効果を Immunoblotting にて検討した。AZD5582 は、XIAP および cIAP-1/2 に対して、蛋白レベルでの発現低下を認めた。Birinapant は、cIAP-1/2 に対して、阻害効果を示したものの、XIAP に対しては、20  $\mu$ M の高用量暴露においても、発現の低下を示さなかった。(Figure 3)

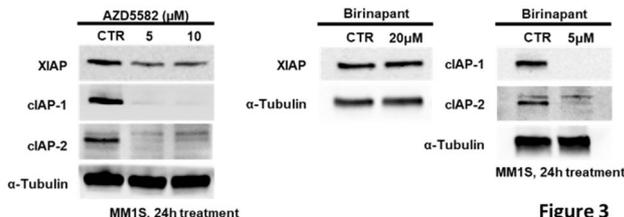


Figure 3

##### (3) IAP 阻害剤による MM 細胞株に対する細胞増殖抑制の検討

AZD5582 および Brinapant の MM 細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討した。XIAP 阻害能を有する AZD5582 は、各 MM 細胞株に対して、細胞増殖抑制効果を示したが、Birinapant は、100  $\mu$ M の高濃度暴露においてのみ細胞増殖抑制効果が認められ、20  $\mu$ M 以下では、IC50 に到達しなかった。(Figure 4, 5)

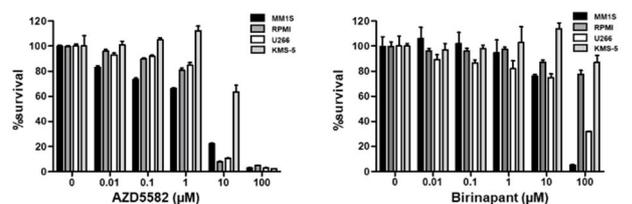


Figure 4

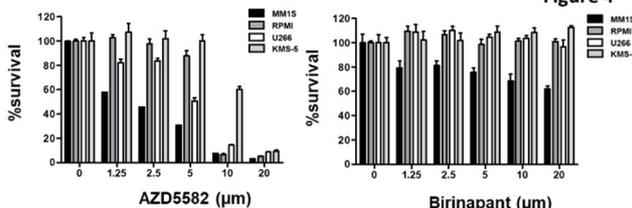


Figure 5

( 4 ) AZD5582 による細胞増殖抑制効果の機序の検討

MM 細胞株 MM1S および RPM1 を用いて、AZD5582 による細胞増殖抑制効果が、アポトーシス誘導によるものかを FACS 解析および Immunoblotting により検討した。FACS 解析により AZD5582 濃度依存性および時間依存性に、アポトーシス細胞を示す 7-AAD、Annexin V 二重陽性細胞比率の増加が認められた。( Figure 6 ) さらに、Immunoblotting により、PARP、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 の各 Full length の発現低下が認められた。( Figure 7 ) 以上の結果から、AZD5582 による細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導によることが示された。

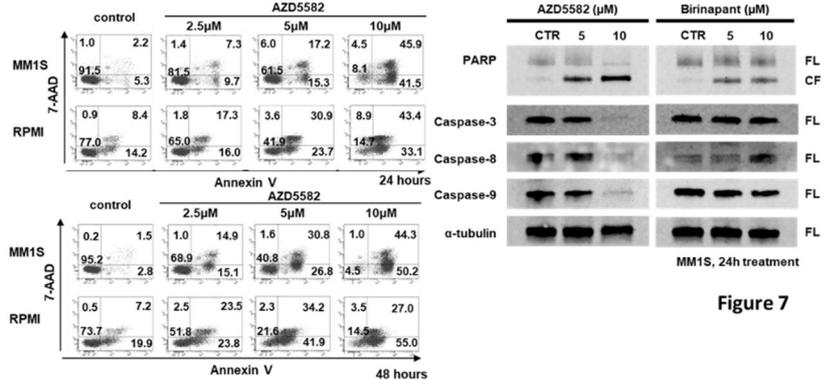


Figure 6

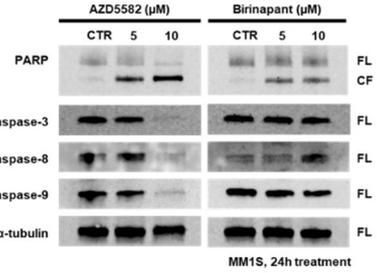


Figure 7

( 5 ) IL-6 添加下での XIAP 発現および AZD5582 の細胞増殖抑制効果の検討

骨髄支持細胞は、IL-6 や IGF-1 などサイトカイン分泌により MM 細胞の生存を支持している。IL-6 は、XIAP の発現にも関与することから、IL-6 添加下での XIAP の発現および AZD5582 の細胞増殖抑制効果を検討した。

IL-6 添加により XIAP の発現は上昇した。( Figure 8A ) このことから、骨髄微小環境による IL-6 の産生が、XIAP の発現亢進を介して、MM 細胞の生存に寄与している可能性が推測された。IL-6 添加下での AZD5582 の細胞増殖抑制効果を検討したが、AZD5582 は、IL-6 添加下においても細胞増殖抑制効果を維持した。( Figure 8B )

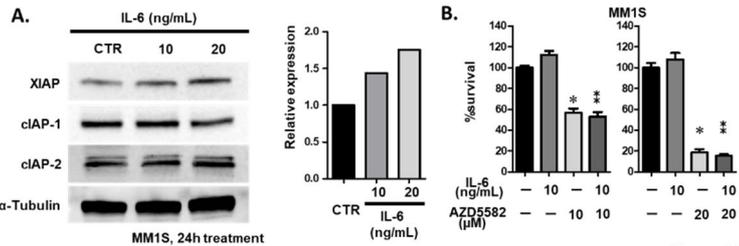


Figure 8

( 6 ) プロテアソーム阻害剤との相乗効果の検討

MM 診療において臨床応用されているプロテアソーム阻害剤との相乗効果を検討した。プロテアソーム阻害剤は、プロテアソーム阻害により ER ストレスを高め、ER ストレス依存性のアポトーシスを誘導する。IAP 阻害との二重阻害によりより強調されたアポトーシス誘導効果がみられるかを検討した。細胞増殖抑制試験において、プロテアソーム阻害剤カルフィルゾミブ (CFZ) は、AZD5582 との併用において、より強力な細胞増殖抑制効果を示し、Combination index の算出より相乗効果が認められた。( Figure 9A ) さらに、強調された細胞増殖抑制効果の機序を検討したところ、FACS 解析において、7-AAD および AnnexinV 陽性のアポトーシス細胞の増加が、さらには Immunoblotting 法により、Cleaved PARP の発現増強および Caspase-3、-8、-9 の Full length の発現低下が認められ、より強力なアポトーシスが誘導されていることが示された。

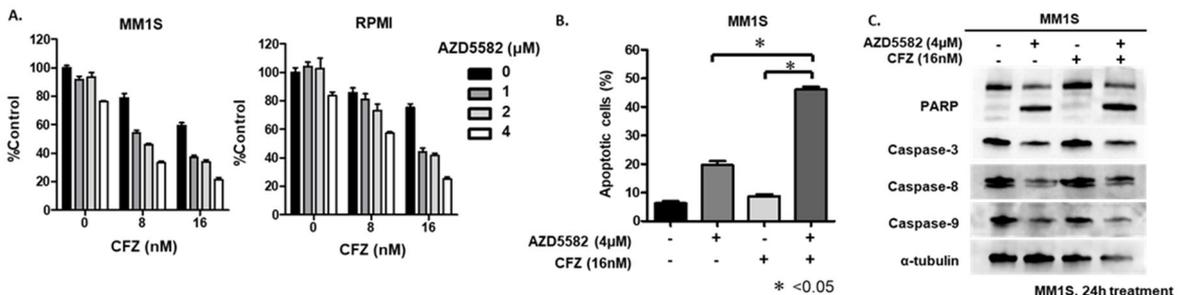


Figure 9

### ( 7 ) Conventional drug との相乗効果の検討

臨床応用可能性を検討するため既存の治療薬との相乗効果を検討した。AZD5582 は、カルフィルゾミブ以外のプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブおよびイクサゾミブとの併用においても、細胞増殖抑制試験において、相乗効果を示した。( Figure 10A, B ) さらに、HDAC 阻害剤であるパノビノスタット、アルキル化剤メルファランとの併用においても、相乗効果を示し、既存治療薬との併用効果の有効性が期待された。( Figure 10B, C )

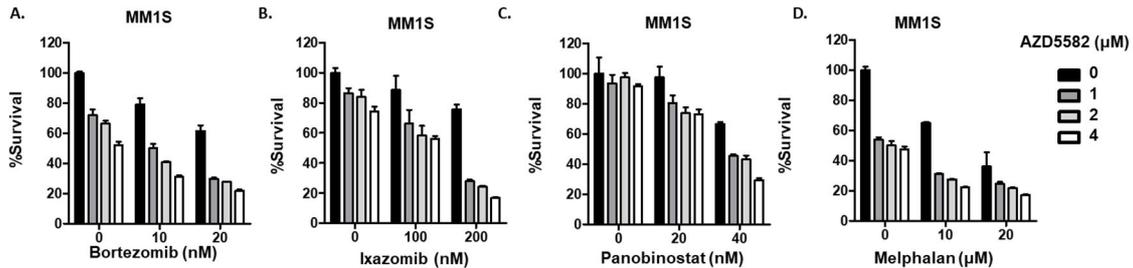


Figure 10

上記の結果より、MM 細胞に対して、c IAP 阻害に加えて XIAP 阻害を用いることで、アポトーシス誘導による細胞増殖抑制効果が得られることが示された。AZD5582 による抗腫瘍効果は、プロテアソーム阻害剤カルフィルゾミブとの併用において、より効率的なアポトーシス誘導を示し、アポトーシス誘導を標的とした新規 MM 治療の可能性を示した。

### 参考文献

( 1 ) Chesi M, Mirza NN, Garbitt VM, et al. IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. Nat Med 2016;22:1411-1420

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|