

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2012年5月7日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591219

研究課題名(和文) 前駆細胞をターゲットとした多発性骨髄腫の新たな分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular-targeting therapy for multiple myeloma against its progenitor cells

研究代表者

木崎 昌弘 (KIZAKI MASAHIRO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20161432

研究成果の概要(和文): 多発性骨髄腫は治癒の難しい難治性造血器腫瘍であり、新たな治療法の開発が望まれている。最近の幹細胞生物学の進歩により、治癒を目指すためには、骨髄腫前駆/幹細胞(myeloma stem/progenitor cell: MSPC)を標的にした治療法の開発が必須である。本研究においては、MSPCの増殖に必須のNF-κB阻害活性を有する生理活性物質1-acetoxychavicol acetate (ACA)を構造展開させTM233を合成した。TM233はACAよりも強力なNF-κB阻害活性を有し、骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導した。さらに、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞のアポトーシスも誘導し、将来の臨床応用が期待された。さらに、金製剤オーラノフィン(JAK/STAT系シグナルとNF-κB阻害を介して骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導した。骨髄腫前駆細胞の同定に関して種々検討した結果、*in vitro*および*in vivo*においてclonogenic骨髄腫細胞はCD138陰性の形質細胞分画の中に存在することが明らかになった。今後は、さらにMSPCに対するTM233やオーラノフィンなどの生理活性物質の直接的な効果を検証する予定である。

研究成果の概要(英文): Multiple myeloma is a refractory hematological malignancy to cure, and it will be desired new therapeutic approaches. Based on the recent progress of the stem cell biology, it has been considered to develop the new therapy against the myeloma stem/progenitor cells (MSPC) to cure the patients. In the present project, I developed new NF-κB inhibitor, TM233, from natural compound 1-acetoxychavicol acetate (ACA), which has more potent NF-κB inhibition activity than that of ACA and induces apoptosis of myeloma cells. In addition, TM233 induced apoptosis of proteasome inhibitor bortezomib-resistant myeloma cells; therefore TM233 will expected to be future clinical application. Gold compound, auranofin, also induced apoptosis of myeloma cells via inhibition of JAK/STAT and NF-κB signaling pathways. It has been cleared that clonogenic MSPC is existed in CD138-negative plasma cell fraction *in vitro* and *in vivo*. Further studies will be needed to investigate the effect of TM233, auranofin and other natural compounds on MSPC.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫、分子標的療法、前駆細胞、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫はBリンパ球の終末分化した形質細胞が腫瘍化した造血器腫瘍である。その多くは高齢者に発症し、抗がん剤による化学療法や造血幹細胞移植によっても治癒することの難しい難治性造血器腫瘍である。さらに、骨髄腫の分子病態が明らかになるにつれ、それらを基盤としたプロテアソーム阻害剤、サリドマイド、レナリドミドなどの新規薬剤が2000年以降導入されているが、骨髄腫の治癒を目指すことはいまだ難しい状況である。その理由としては、白血病と同様に骨髄腫においても骨髄腫幹細胞/前駆細胞 (myeloma stem/progenitor cell: MSPC) が存在し、細胞周期G₀期に存在するために既存の抗がん剤が効かない事が想定されている。

これまでの研究により骨髄腫細胞にも階層性が存在し、NOD/SCIDマウスに骨髄腫細胞を移植することで骨髄内にクローン性に骨髄腫細胞が増殖することが報告されている。さらに、一次マウスに生着した骨髄腫細胞は、二次マウスにおいても同一クローンが増殖することより、多発性骨髄腫にも自己増殖能を有する細胞集団の存在が考えられている。最近、MatsuiらはCD138陰性細胞の中で、CD20、CD27陽性メモリーB細胞の表現型を有する細胞がクローン性増殖とNOD/SCIDマウスへ生着することを示した。分化した骨髄腫細胞が脱分化する可能性も残されているものの、これまでの研究成果は多発性骨髄腫にも幹細胞あるいは前駆細胞が存在することを示唆している。

一方、申請者は、これまで白血病細胞や骨髄腫細胞は活性酸素(ROS)に感受性を有し、酸化ストレスによる腫瘍細胞の直接的なDNA損傷がアポトーシス誘導に重要であることを見いだした。白血病幹細胞(leukemic stem cell: HSC)もROSに感受性を有し、幹細胞としての特性を維持するのにニッチと呼ばれる特殊な環境が重要であることが明らかにされている。さらに、ニッチとHSCの相互関係においては、ROSによりHSCの自己増殖能やG₀期への静止状態が障害されることが示されている。したがって、MSPCが存在すれば、これらはROSに対する感受性が高いことが予測され、これまでに申請者らが行ってきたROSの誘導による酸化ストレスによる腫瘍細胞のDNA損傷によるアポトーシス誘導に関する知見が応用可能と考えられる。

以上のような背景を鑑みると、多発性骨髄腫のMSPCを標的にした治療法の開発は重要であり、骨髄腫の治癒を目指すためにはこのような概念の新しい治療法の開発が臨まれている。

2. 研究の目的

近年、骨髄腫の分子病態の解明が進み、増殖に必須な転写因子NF-κBや病態形成に必須な骨髄間質細胞から分泌されるIL-6、VEGFなどのサイトカインを標的にした分子標的療法が注目されている。実際、NF-κB阻害剤としてボルテゾミブや血管新生を阻害するサリドマイドが臨床応用されているが、これらは再発難治多発性骨髄腫の約30%の患者にしか反応せず、また末梢神経障害や血液毒性などの時として致命的な有害事象も知られているために、骨髄腫の治癒を目指した新たな治療法の開発は急務である。一方、造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)研究の進歩により、がん幹細胞の概念が耳目を集めている。白血病においても静止期に属する白血病幹細胞(LSC)の存在が明らかになりつつあり、白血病の治癒を目指すために、抗がん剤が作用しないと考えられるLSCをターゲットにした治療法の開発が必須と考えられている。本研究は、LSCの概念と申請者がこれまでに成果をあげてきた多発性骨髄腫に対する分子標的治療薬の開発に関する知見を基に、骨髄腫幹細胞あるいは前駆細胞(MSPC)の存在を明確にし、その生物学的特性を明らかにする。さらに、前駆細胞を標的にした新たな骨髄腫の治療理念を確立し、多発性骨髄腫の治療成績向上に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究を遂行するためにはヒトMSPCの同定とその生物学的特性を明らかにすることが不可欠である。そのために、まず種々の骨髄腫細胞株および患者検体を用いて、CD138⁺分画を分離する系を確立し、既存のマーカーを用いて最も幹細胞としての活性を有する細胞群を同定する。さらに、われわれがすでに明らかにしているROS産生能を有する生理活性物質を用いて、その感受性を明らかにするとともに、さらに詳細なヒトMSPCの生物学的特性を検討する。これらを念頭に以下の方法にて研究を遂行した。

(1)

ヒトMSPCの同定とマウスへの生着能の検討。NOD/SCIDまたはNOGマウスに移植する連続骨髄移植の系においてヒト骨髄腫由来細胞の生着が得られるかの検討。

ヒトMSPCのROSに対する感受性の検討。これまでにわれわれが樹立した詳細な活性酸素種(O₂⁻, H₂O₂, •OH, ¹O₂, HOCl, NO, 脂質ペルオキシラジカル等)を同定するシステムを用いて、MSPCに直接DNA損傷を与える活性酸素種を同定する。対象としてヒトHSCを用いて同様のアッセイを行い、ヒトMSPCとのROSに対する感受性の相違を明らかにする。

ROSにより誘導される転写因子の同定。ヒトMSPCをROS産生生理活性物質で処理した際に発現誘導される種々の転写因子を、cDNAマイクロアレイ法、RNAよりのCGH法により誘導される転写因子を網羅的に解析し、さらに遺伝子応答の変化を多変量的に解析する。これらの中でROSにより誘導されるアポトーシスに密接に関係すると思われる転写因子を明らかにする。

(2)

ヒトMSPC自己増殖におけるNF-kBシグナル伝達経路の関与の検討。NF-kB阻害剤によるヒトMSPC分画の増殖抑制、アポトーシス誘導能を有するかを検討およびヒトMSPCの自己増殖に關与するNF-kBシグナル伝達経路下流の標的分子の網羅的探索。

ヒトMSPC分画を免疫不全マウスに移植し骨髄腫幹細胞としての機能の確認。

骨髄腫マウスモデルの構築とヒトMSPC分画の移植実験。

ROSを産生する生理活性物質の骨髄腫マウスモデルを用いた治療実験とPK, PDの解析。

骨髄腫マウスモデルを用いたin vivo実験より治療薬のsurrogate markerの同定。

4. 研究成果

平成21年度

本年度は、骨髄腫前駆細胞の増殖に必須のNF-kB活性を阻害する新たなNF-kB阻害剤の開発を行った。すでに、申請者は生理活性物質1-acetoxychavicol acetate (ACA)にNF-kB阻害活性があることを見いだしているが、ACAは種々の骨髄腫細胞の増殖を細胞周期G1期に停止させ、アポトーシスを誘導した。臨床応用を目的としてACAを構造展開して得られた化合物について、定量的構造-活性関係解析(QSAR)により、ACAよりもさらにNF-kB活性抑制効果の強い化合物を精製し、いくつかの候補化合物を得る事ができた。

また、金製剤auranofin (AF)は用量依存性に種々の骨髄腫細胞株および患者骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。AFは骨髄腫細胞の増殖に必須なIL-6シグナル下流のJAK2/STAT3のリン酸化を阻害し、STAT3のMcl-1への転写活性を抑制し、骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導する事を見いだした。骨髄腫細胞U266にMcl-1を強制発現させるとAFによるアポトーシス誘導はキャンセルされた。したがって、AFはMcl-1をターゲットとして骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導すると考えられた。さらに、AFはp65の核内移行を阻害する事によりNF-kB阻害活性を有することも合わせて明らかにした。ACAおよびAFによる骨髄腫細胞のアポトーシス誘導には活性酸素(ROS)は関与していなかった。

平成22年度

今年度は、さらに優れたNF-kB阻害剤を開発するためにACAを構造展開し得られた種々の化合物のHL-60細胞の増殖抑制を指標とした定量的構造-活性関係解析(QSAR)にて新たな低分子化合物TM233を合成分離した。TM233は骨髄腫細胞に対してACAよりはるかに優れたNF-kB阻害活性を有し、骨髄腫細胞の細胞死を誘導することにより増殖を抑制した。さらに、その作用機序はNF-kBの細胞質から核への移行阻害であることが明らかになった。興味深いことにTM233はカスパーゼ非依存性に骨髄腫細胞の細胞死を誘導した。

平成23年度

骨髄腫前駆細胞の同定に関して種々検討した結果、in vitroおよびin vivoにおいてclonogenic骨髄腫細胞はCD138陰性の形質細胞分画の中に存在することが明らかになった。また、一般にがん幹細胞の増殖には転写因子NF-kBが重要な役割を果たすことが知られているため、われわれの同定した新規NF-kB阻害剤ACAを構造展開して得られたさらに強力なNF-kB阻害活性を有するTM233の骨髄腫細胞への影響とその作用機構の詳細について本年度はさらに検討した。TM233は骨髄腫細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。NF-kB阻害の他に骨髄腫細胞の増殖に必須なIL-6シグナル伝達経路を阻害することを見いだした。すなわち、TM233はIL-6受容体下流のJAK2およびSTAT3のリン酸化を抑制し、IL-6のシグナルをブロックすることで骨髄腫細胞の細胞死を誘導することを見いだした。

さらに、TM233は実臨床でも用いられているプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ耐性細胞に対しても、その増殖を抑制し細胞死を誘導した。現在、臨床的にはボルテゾミブによる末梢神経障害などの有害事象や耐性化が問題になっており、TM233は新たなNF-kB阻害剤として今後の臨床応用が期待される。今後は、さらに骨髄腫前駆細胞に対するTM233の直接的な効果を検証する予定である。

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6件)

1. Iriuchishima H, Kizaki M, et al: In vivo behavior of multiple myeloma cells and their niche in immunodeficient mice. PLoS ONE 7(2): e30557. doi: 10.1371/journal.pone.0030557, 2012. (査読有)
2. Tozawa K, Sagawa M and Kizaki M: Quinone methide tripterine, celastrol, induces apoptosis in human multiple myeloma

- cells via NF-κB pathway. International Journal of Oncology 39: 1117-1122, 2011. (査読有)
3. Tokuhira M, Kizaki M, et al: Successful treatment of bortezomib with modified schedules up to weekly administration for the patients with refractory/resistance multiple myeloma. Leukemia Research, 35: 591-597, 2011. (査読有)
 4. Nakaya A, Kizaki M, et al: The gold compound auranofin induces apoptosis of human multiple myeloma cells through both down-regulation of STAT3 and inhibition of NF-κB activity. Leukemia Research, 35 (2): 243-249, 2011. (査読有)
 5. Sagawa M, Kizaki M, et al: A new disulfide-linked dimer of a single-chain antibody fragment against human CD47 induces apoptosis in lymphoid malignant cells in vitro and in vivo via the HIF-1α pathway: A possible new agent for B-CLL. Cancer Science, 102 (6): 1208-1215, 2011. (査読有)
 6. Kuramori C, Kizaki M, et al: Capsaicin inhibits the mitochondrial function of prohibitin 2 and induces apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications 379 (2): 519-525, 2009. (査読有)

[学会発表](計5件)

1. 第73回日本血液学会総会(平成23年10月14-16日、名古屋)
Sagawa M, Kizaki M, et al: Quinone methide triptine, celastrol, induces apoptosis in human myeloma cells via NF-κB pathway.
2. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases (平成23年8月15-17日、東京)
Kizaki M: New therapeutic approach for multiple myeloma: Development of novel molecular targeting agents.
3. 51th Annual Meeting of American Society of Hematology (平成21年12月5-8日, New Orleans, USA)
Sagawa M, Kizaki M, et al: Gold compound auranofin (RIDAURA®) induces apoptosis of human myeloma cells by targeting STAT3 and NF-κB pathways, with clinical potential.
4. 12th International Conference on Differentiation Therapy (平成21年11月11-14日, Chicago, USA)

Kizaki M: Gold compound auranofin induces apoptosis of human multiple myeloma cells through both down-regulation of STAT3 and inhibition of NF-κB activity with clinical potential.

5. 第68回日本癌学会総会(平成21年10月1-3日 横浜)

腫瘍別シンポジウム5 造血器腫瘍研究の新展開

木崎昌弘: 形質細胞腫瘍の病態研究と治療開発の最近の進歩

[図書](計3件)

1. 木崎昌弘: 多発性骨髄腫に対する治療の進め方と治療指針。木崎昌弘(編)多発性骨髄腫治療マニュアル。南江堂、東京、pp94-101, 2012.
2. 木崎昌弘: 多発性骨髄腫。血液疾患 最新の治療2011-2013。南江堂、東京、pp228-233, 2010.
3. 木崎昌弘: 多発性骨髄腫。門脇孝、宮地良樹、小室一成(監修) 診療ガイドライン Up-To-Date 2010-2011。メデイカルビュー社、東京、pp616-623, 2010.

6. 研究組織

(1)研究代表者

木崎 昌弘 (KIZAKI, MASAHIRO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20161432

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: