

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701036

研究課題名(和文)脂質メディエーターによる骨髄腫細胞の制御

研究課題名(英文)Bioactive lipid ;Concened with MM

研究代表者

田中 裕子(Tanaka, Yuko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70449130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は、現在でも治癒が見込まない疾患であり新たな治療戦略の構築が求められている。スフィンゴシン1リン酸(sphingosine-1 phosphate;S1P)は、脂質メディエーターとして細胞の増殖・分化などと密接に関わることが明らかになり、またS1P受容体アゴニストfingolimodが登場し今後はS1Pと疾患の関与を解明し新たな治療のターゲットとなることが期待される。骨髄腫におけるS1Pの役割を明らかにすることは、複雑な骨髄腫の病態の解明や新たな治療に繋がる可能性があり、本研究では細胞株や患者検体などを用いS1Pの骨髄腫細胞の増殖、進展への関与を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：multiple myeloma (MM), which is one of B-lymphocyte neoplasma, is not curable disease in spite of establishing new therapeutic strategy. Therefore it is necessary to develop more excellent treatment for the disease. To that end, it is required to elucidate pathophysiology in a new beginning. In pathology of multiple myeloma, the role of sphingosine-1 phosphate (S1P) is not revealed yet. On the other hand the function of S1P for cell biology gradually becomes clear. S1P plays an important role of cell proliferation, survival, apoptosis, and migration. Indeed S1P is known to be concerned with the cell proliferation and developing of malignant tumors. In this study we try to reveal the relevance with MM and S1P for developing new therapeutic strategy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：multiple myeloma sphingosine-1 phosphate fingolimod

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(multiple myeloma; MM)は、プロテオソーム阻害剤やレナリドミドなど免疫調節薬といった新規薬剤が治療に加わり治療成績が著しく向上した。しかし、長期予後に関しては現在も治癒が見込めない疾患であることに変わりはなく、新たな治療戦略の構築が求められている。そこで我々は、骨髄腫では殆どその役割が解明されていない脂質メディエータであるスフィンゴシン 1リン酸(sphingosine-1 phosphate;S1P)に注目し、その病態への関与を明らかにすることを考えた。S1Pは、リゾリン脂質の一つであり細胞膜にある受容体を介して細胞の生存、増殖、アポトーシスに関与することが判明している。このような性質から生理活性脂質、脂質メディエーターとも呼ばれている。S1Pは、スフィンゴ脂質で細胞膜の構成成分であるスフィンゴミエリンの代謝産物スフィンゴシンからスフィンゴシンキナーゼ(SK)により合成される。これまで細胞膜の一構成成分としか見られていなかったスフィンゴ脂質であるが、その代謝産物を介して細胞の生理活性に深く関与することが明らかになってきた。近年 S1P 受容体のアゴニスト fingolimod が新たな機序の免疫抑制薬として多発性硬化症の治療薬として販売が開始された。S1P と疾患との関わりを明らかにすることで、新たな治療戦略に繋がる可能性がある。難治性である MM の新規治療の糸口を探索するため本研究を計画した。

2. 研究の目的

MM における S1P やそれを介したシグナル伝達役割を探求する。また fingolimod やSK 阻害剤による MM 腫瘍細胞の抑制効果を検証し、シグナル伝達の機序も明らかにしていく。

3. 研究の方法

- 骨髄腫細胞株 (RPMI8226, MM1S, MM1R) を用いて fingolimod と SK 阻害剤 (SKI-I と ABC294640, SKI-I) を各々添加時の MM 細胞への抗腫瘍効果を検討した。

- 血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて S1P 添加時と SK 阻害剤や fingolimod 投与時の走化性を測定した。

- 倫理委員会で同意を得たプロトコールに基づき同意が得られた MM 患者血清を用いて血清 S1P を ELISA 法で測定し、健常者との比較をする。

4. 研究成果

- 骨髄腫細胞株に対する S1P 及び SK の作用 (fingolimod と SK 阻害剤の効果について)

骨髄腫細胞株 (RPMI8226, MM1R, MM1S) に S1P 受容体アゴニスト fingolimod, SK 阻害剤 (ABC294640, SKI-I) を添加し培養した。その

結果いずれの細胞株とも各薬剤の濃度依存性に細胞増殖の抑制効果を認めた。図 1 に RPMI8226 での増殖抑制を示す。

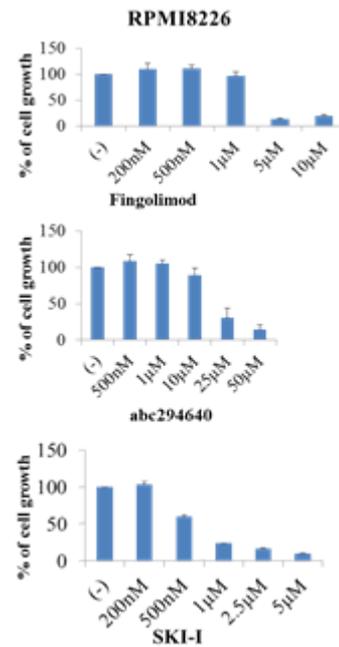


図 1 .RPMI8226 に対する各薬剤の抗腫瘍効果

- S1P は細胞の遊走を促進する

臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用した S1P 添加時の細胞の遊走の有無を確認した。Boyden chamber (Corning) のキットを用いた。図 2 に示したごとく、S1P 添加により細胞遊走は促され、一方 fingolimod や SKI-I, ABC294640 の添加でその遊走が阻止された。先に示された fingolimod や SK 阻害剤による抗腫瘍効果は細胞遊走の抑制も一因である可能性が示唆された。

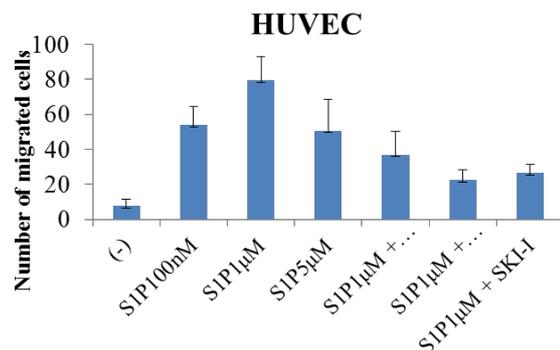


図 2.S1P 添加または S1P と fingolimod,SK 阻害剤添加時の HUVEC の遊走抑制効果

- MM 患者での血清 S1P のバイオマーカーとし

での検討

悪性腫瘍の細胞レベルではS1P濃度の上昇やSKの活性上昇が知られているが、患者体内でのその動態は不明である。MM細胞株の実験結果よりS1Pが骨髄腫の増殖に影響している可能性が示唆された。MMの病態は分子生物学的機序や骨髄環境の関連など腫瘍の発症、進展に関わる複雑な病態が明らかになっているが、それを十分反映したバイオマーカーが十分存在しない。S1PがMMでの新たなバイオマーカーとして有用か患者血清を用いて検討した。

当院倫理委員会の承認に基づき同意を得た2013年まで診断されたMM患者14例の血清でS1P濃度をELISA法キット(Sphingosine 1-phosphate assay kit, echlon.inc)を用いて測定した。対照として健常者血清16例のS1Pを測定した。その結果MM患者ではS1Pの血清濃度が健常者と比べ有意に増加していた(図3)。

骨髄腫細胞は、サイトカインであるvascular endothelial growth factor (VEGF)を産生しその増殖を促すことが知られている。一方S1Pは、VEGFにより活性化したSKによりその産生が促進し、細胞内のS1P濃度が上昇するとされている。骨髄腫でのS1Pは細胞内外での動態は明らかでないが、血清濃度が上昇していることから、VEGFなどの作用により細胞内に増加したS1Pが細胞外に放出され、さらに細胞の増殖や血管形成などに作用することで、骨髄腫の進展を促しているという病態が考えられた。

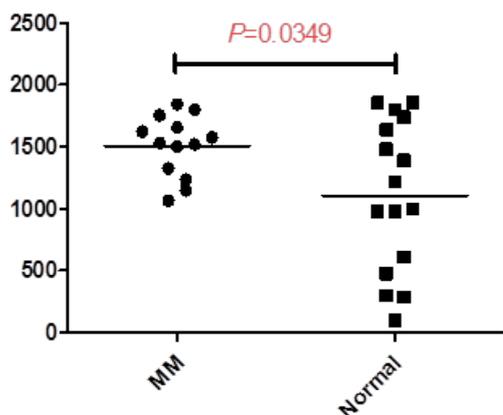


図3. MMと健常者での血清S1P濃度の比較

また、MM患者での貧血、骨病変、高Ca血症、腎障害の症状の有無、ISSによる予後分類で血清S1P濃度を比較した。この結果貧血の有無のみでS1Pの2群間の有意差を認めたと(図4)。またISSでは病期が進行するほどS1P濃度が低下する傾向があった。病勢の進行とともにS1Pが低下する可能性が示唆された、今後症例を増やしS1Pのバイオマーカーとしての有用性を確立する意義を更に検証する必

要があると考えられた。

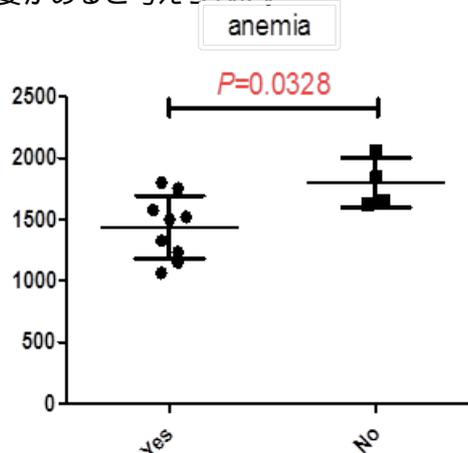


図4. MM患者での貧血の有無でのS1P濃度

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. Combining the ABL1 kinase inhibitor ponatinib and the histone deacetylase inhibitor vorinostat: a potential treatment for BCR-ABL-positive leukemia. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Kitahara T, Tanaka Y, Ohyashiki K. PLoS One. 2014 Feb 28;9(2):e89080. DOI: 10.1371/journal.pone.0089080 (査読あり)

2. Activity of histone deacetylase inhibitors and an Aurora kinase inhibitor in BCR-ABL-expressing leukemia cells: Combination of HDAC and Aurora inhibitors in BCR-ABL-expressing cells. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Cancer Cell Int. 2013 Apr 4;13(1):32. DOI: 10.1186/1475-2867-13-32. (査読あり)

3. Efficacy of ponatinib against ABL tyrosine kinase inhibitor-resistant leukemia cells. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Ohyashiki K. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7;435(3):506-11. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.05.022. (査読あり)

4. Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation.

Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kitahara T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Cancer Biol Ther. 2013 Oct 7;15(2). DOI: 10.4161/cbt.26725. (査読あり)

5. Activity of omacetaxine mepesuccinate against ponatinib-resistant BCR-ABL-positive cells. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Katagiri S, Kitahara T, Ohyashiki

K. Blood. 2013 Oct 24;122(17):3086-8. doi:
10.1182/blood-2013-04-494773. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1.田中裕子、岡部聖一、伊藤良和、田内哲三、
大屋敷一馬「Serum sphingosine-1 phosphate
is possible to be an available biomarker
for multiple myeloma」第 76 回日本血液学
会学術集会 2013 年 10 月 11 日 ロイトン札
幌(札幌市)

2.Yuko Tanaka,Seiichi Okabe, Tetsuzo
Tauchi 「 Therapeutic Potential of
Targeting Sphingosine-1 Phosphate and
Sphingosine Kinases in Multiple Myeloma
Cells」第 55 回アメリカ血液学会総会 2013
年 12 月 13 日 New Orleans

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 裕子(Yuko Tanaka)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 70449130