

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09490

研究課題名(和文) 活性酸素による前駆細胞を標的とした多発性骨髄腫に対する治療法開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research for developing new therapeutic approach of multiple myeloma targeting its progenitor cells by reactive oxygen species (ROS)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫において、骨髄腫細胞および骨髄腫前駆細胞の増殖制御には、NF- $\kappa$ Bシグナルが重要であり、骨髄腫前駆細胞では活性酸素(ROS)に対する感受性が高かった。新たに見出したNF- $\kappa$ B阻害活性を有するTM-233は、ROSの産生を介して骨髄腫細胞および前駆細胞の増殖を抑制し細胞死を誘導した。また、細胞周期チェックポイントキナーゼWEE-1阻害薬MK-1775は、DNA損傷を介して骨髄腫細胞の細胞死を誘導した。

以上より、新規NF- $\kappa$ B阻害薬TM-233および細胞周期チェックポイント阻害薬MK-1775は骨髄腫に対する新たな治療薬となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Multiple myeloma is one of the refractory hematological malignant disorder. It has reported that NF- $\kappa$ B signaling is important for the regulation of proliferation of myeloma cells and their stem/progenitor cells. In the present study, it has shown that the sensitivity of reactive oxygen species (ROS) in myeloma cells and their progenitor cells is higher than that of other hematological malignancies. New NF- $\kappa$ B inhibitor TM-233 was inhibited proliferation and induced cell death of myeloma cells and their progenitor cells via production of ROS in dose- and time-dependent manner. In addition, cell cycle checkpoint kinase WEE-1 inhibitor MK-1775 was also induced cell death of these cells via DNA repair process. From these results, new NF- $\kappa$ B inhibitor TM-233 and WEE-1 inhibitor MK-1775 might be possible novel therapeutic agents for the treatment of multiple myeloma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性骨髄腫 前駆細胞 活性酸素 細胞死 細胞周期 NF- $\kappa$ B DNA修復 プロテアソーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫の分子病態の解明が進み、増殖に必須の転写因子 NF- $\kappa$ B や骨髄間質細胞から産生される IL-6、VEGF などの造血因子を標的にした分子標的療法が注目されている。臨床的にもプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブや免疫調節薬(サリドマイド、レナリドミド)が導入されたが、これらの薬剤をもってしても難治例の約 30% にしか反応せず、**多発性骨髄腫の根治を目指した新たな概念の治療法の開発は必須の課題**である。一方、造血幹細胞研究の進展により、骨髄腫幹細胞あるいは前駆細胞を明らかにし、それらを標的にした新たな治療法を開発することが治癒を目指すためには必要である。

B 細胞が終末分化した形質細胞の腫瘍化による多発性骨髄腫においても骨髄腫細胞に階層性が存在することが知られ、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明らかにされている。したがって、多発性骨髄腫においても骨髄腫幹細胞あるいは前駆細胞が存在すると考えられるが、その生物学的特性などは明らかでない点も多い。CD138 陰性細胞分画で、CD20/27 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 マウスへ生着すると報告もあるが、一方で骨髄腫クローンを長期間維持できる細胞は CD38 陽性形質細胞分画に存在すると報告もある。また、自己複製能を持たない前駆細胞においても種々の遺伝子変異により自己複製能が再活性化することが知られており、分化した細胞の腫瘍である多発性骨髄腫においては前駆細胞レベルでの腫瘍化と考える方が妥当である。このように、多発性骨髄腫の源となるべき細胞に関しては議論のあるところであり、これらを明らかにして治療標的を明確にすることは重要な課題である。また、研究の進んでいる白血病幹細胞(LSC)に関しては、細胞自体の解析に加え、それらを取り巻く骨髄微小環境からの解析も重要である。特に、酸化ストレスが骨髄微小環境に及ぼす影響が注目されており、LSC の自己複製能の維持には活性酸素(ROS)による制御が必須であり、酸化ストレスにより造血幹細胞の静止期維持や自己複製能が障害されることが知られている。このような背景より、本研究においては幹細胞生物学の研究動向と、がん幹細胞を標的とする治療の方向性に基づき、多発性骨髄腫の根源とも言うべき骨髄腫前駆細胞の生物学的特性を明らかにし、それらを標的にした治療開発を目的とした研究を展開した。

## 2. 研究の目的

高齢化社会を迎え、増加しつつある難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫の治療成績を向上させることは、臨床的に喫緊の課題である。本研究は、申請者がこれまでに多くの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と ROS による白血病細胞の細胞死研究に関する知見を基に、骨髄腫における **骨髄腫前駆細胞の生物学的特性を明確にし、ROS を介する骨髄腫前駆細胞を標的にした生体侵襲の少ない新たな治療理念を確立**することを目的とする。

多発性骨髄腫の治癒を目指し、クローナルな増殖を示す骨髄腫細胞を供給する骨髄腫幹細胞あるいは前駆細胞の生物学的特徴を明らかにし、それらを標的にした革新的な治療法を確立するために、本研究においては、以下の点を明らかにする。

- (1) ヒト骨髄腫前駆細胞の特性を示す細胞集団を明確に定義し、生物学的特性を明らかにする。
- (2) ROS を介する骨髄腫前駆細胞の増殖制御を規定するシグナル伝達経路を明らかにする。
- (3) 種々の生理活性物質の中で、より骨髄腫前駆細胞に選択性の高い化合物を明らかにする。
- (4) 候補化合物による骨髄腫細胞および前駆細胞の細胞死誘導機構を明らかにする。
- (5) マウスモデルを用いて、*in vivo* における ROS による骨髄腫前駆細胞を標的にした治療の可能性を明らかにする。

以上より、生理活性物質による ROS を介する生体侵襲が少なく、骨髄腫前駆細胞の生物学的特性に基づいた革新的な多発性骨髄腫の治療法開発のための基盤形成を行うことが目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず骨髄腫幹細胞/前駆細胞分画を明確にし、効率よく分離する系を確立する。その上で、**生理活性物質による ROS を介するヒト骨髄腫幹細胞/前駆細胞を標的にした新たな治療法開発のための基盤研究**を行う。研究計画の進め方として、

- (1) ヒト骨髄腫幹細胞/前駆細胞の特性を示す細胞集団を明確に定義し、生物学的特性を明らかにする。
- (2) ROS を介する骨髄腫幹細胞/前駆細胞の増殖制御を規定するシグナル伝達経路を明らかにする。
- (3) 種々の生理活性物質の中で、より骨髄腫幹細胞/前駆細胞に選択性の高い化合物を明らかにする。
- (4) 候補化合物による骨髄腫細胞および前駆細胞の細胞腫誘導機構を明らかにする。
- (5) マウスモデルを用いて、*in vivo* における ROS による骨髄腫幹細胞/前駆細胞を標的にした治療の可能性を明らかにする。

幹細胞/前駆細胞分画に関しては、Hoechst33342 にて SP 分画を分離する系を確立した。SP 分画における CD123,  $\beta$ -catenin, WT-1, CD44 などの種々の既報の幹細胞マーカーの発現を RT-PCR 法を用いて解析し、幹細胞分画として最も重要なマーカーを明ら

かにする。その上で、SP分画に加えて、同意を得た骨髄腫患者より骨髄単核球を分離し、MACSにて分離したCD138+分画より細胞株の解析より得られた幹細胞マーカーとして最も重要と思われる分子を発現する分画を検討した。さらに、骨髄腫前駆細胞の特性を明らかにするために、健康人より得た正常造血幹細胞との遺伝子発現の比較をAffymetrix Human Genome U133A arrayを用いて解析した。正常造血幹細胞と5倍以上の発現の差があった分子については、RT-PCR法およびWestern blot法にて実際の発現を検討した。

種々の活性酸素種( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$ ,  $NO$ , 脂質ペルオキシラジカル等)を測定し、臨床像との関係を詳細に検討することで、ROSの多発性骨髄腫における病態形成の意義について検討した。

さらに、骨髄腫におけるROSを介するシグナル伝達経路を明らかにするために、(1)転写因子、特にNF- $\kappa$ Bを介するシグナル伝達系の解析

(2)ROSによるブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)活性化に関する検討を予定した。

#### 4. 研究成果

平成27年度

本研究は、生体侵襲の少ない生理活性物質などを用いてROSを介するヒト骨髄腫幹細胞/前駆細胞を標的にした新たな治療法を開発し、多発性骨髄腫の治療成績向上の基盤となることを目的として行われた。

これまでに、われわれは新たなNF- $\kappa$ B阻害活性を有する化合物TM-233を東南アジアに自生する植物の根茎より抽出した1'-acetoxychavicol acetate (ACA)を構造展開することで合成した。平成27年度はヒト多発性骨髄腫細胞株および患者細胞よりSP分画あるいはCD138陽性分画より骨髄腫前駆細胞を分離、精製し、TM-233およびWnt/ $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B, JAK/STATなどのシグナル伝達阻害物質の骨髄腫細胞および前駆細胞に及ぼす影響について検討した。骨髄腫前駆細胞として分離した分画に存在する細胞群の生物学的特性を明らかにするために、マルチカラーフローサイトメトリーを用いた表面抗原の詳細な解析と網羅的遺伝子発現解析による正常幹細胞との相違についての検討を行った。

本研究においては、最終的に生理活性物質を中心とした新たな骨髄腫治療の候補となる化合物を探索することも目的とするため、骨髄腫細胞の増殖に必須のシグナルを阻害した際の骨髄腫細胞の動態解析とROSとの関連にも注目し、その候補化合物を明らかにした。また、臨床的には大きな問題となっているプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ耐性のメカニズムの一端とTM-233による耐性克服の可能性について明らかにした。さらに、T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK)を特異的に阻害することにより、ボ

ルテゾミブ感受性骨髄腫細胞のみならず耐性細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することを明らかにした。興味深いことに、TOPK阻害薬は骨髄腫治療に大きな貢献を果たしている免疫調節薬レナリドミド耐性細胞に対しても低濃度でその細胞死を誘導することを明らかにした。

平成28年度

平成28年度は、昨年度の続きわれわれが開発したNF- $\kappa$ B阻害活性を有するTM-233と細胞周期チェックポイントキナーゼWEE-1阻害薬を用いて、ROSを介する骨髄腫細胞および骨髄腫前駆細胞に対する効果の詳細な検討を行った。

TM-233は骨髄腫細胞においてNF- $\kappa$ B p65に直接結合しNF- $\kappa$ B活性を阻害することを明らかにした。TM-233はROSの産生を介してp65に結合するとともに、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。さらに、骨髄腫前駆細胞に対しても同様の機序により、その増殖を抑制した。これらの結果より、TM-233の新たな骨髄腫治療薬としての可能性が示された。

また、細胞周期チェックポイントキナーゼWEE-1阻害薬MK-1775は、骨髄腫細胞の増殖抑制効果を示した。MK-1775は、BCL-2の発現を抑制し、caspase3を活性化した。さらに、H2AXの発現を増加することにより、WEE-1阻害は、骨髄腫細胞におけるROSを介する直接的なDNA損傷効果を有するものと考えられた。

平成29年度

平成29年度は、細胞周期チェックポイントキナーゼWEE-1阻害剤MK-1775の骨髄腫細胞および骨髄腫前駆細胞に対する効果とその分子機構解析を中心に研究を進めた。MK-1775は、骨髄腫細胞においてROSを産生し、直接的なDNA損傷を誘導した。同時に、MK-1775は骨髄腫細胞のmitosisを介しての細胞死誘導も認めた。DNA損傷を誘導する種々の薬剤とMK-1775の併用効果について検討したところ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とMK-1775の併用により、骨髄腫細胞は効果的に細胞死が誘導された。さらに、DNA修復機構に關与するRibonucleotide Reductase largesubunit 1 (RRM1)をノックダウンすることにより骨髄腫細胞はG2/M期に細胞周期が停止し増殖が抑制され、細胞死が誘導された。これらの事実をもとにRRM1阻害活性を有するclofarabineにより骨髄腫細胞の細胞死が誘導される新たな事実を見出した。

今後は、本研究により見出された骨髄腫に対する新たな治療薬候補TM-233, TOPK阻害薬, MK-1775およびclofarabineなどについて、骨髄腫前駆細胞への効果と分子作用機構のより詳細を検討するとともに、マウスモデルを

用いた*in vivo*における効果を検討することにより、さらに臨床応用を目的にした研究を推進したいと考えている。

#### 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 5 件)

1. Sagawa M, Ohguchi H, Harada T, Samur MK, Tai Y-Z, Munishi NC, Kizaki M, Hideshima T, Anderson KC. Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 23(17): 5225-5237, 2017 (査読あり). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0263.
2. Kizaki M and Tabayashi T: The role of intracellular signaling pathways in the pathogenesis of multiple myeloma and novel therapeutic approach. *J Clin Exp Hematop*, 56 (1):20-27, 2016 (査読あり). doi: 10.3960/jslrt.56.20.
3. Misawa T, Aoyama H, Hashimoto Y, Dodo K, Sagawa M, Kizaki M: Structure-activity relationships of benzhydryl derivatives based on 1<sup>2</sup>-acetoxychavicol acetate (ACA) against multiple myeloma cell-growth inhibition via inactivation of NF- $\kappa$ B pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23 (9): 2241-2246, 2015 (査読あり). doi: 10.1016/j.bmc.2015.02.039.
4. Sagawa M, Tabayashi T, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Kizaki M: TM-233, a novel analog of 1<sup>2</sup>-acetoxychavicol acetate (ACA), induces cell death in myeloma cells by inhibiting both JAK/STAT and proteasome activities. *Cancer Science* 106 (4): 438-446, 2015 (査読あり). doi: 10.1111/cas.12616.
5. Watanabe T, Mitsuhashi M, Sagawa M, Ri M, Suzuki K, Abe M, Ohmachi K, Nakagawa Y, Nakamura S, Chosa M, Iida, Kizaki M: Lipopolisaccharide- induced CXCL10 mRNA and six stimulant-mRNA combinations in whole blood: Novel biomarkers for bortezomib responses obtained from a prospective multicenter observation trial for patients with multiple myeloma. *PLoS One* 2015 Jun 26;10(6):e0128662 (査読あり). doi: 10.1371/journal.pone.0128662.

eCollection 2015.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 木崎昌弘: 分子標的療法: ビタミンから創薬へ(招待講演)  
第 79 回日本血液学会学術集会(平成 29 年 10 月 20 日-22 日、東京国際フォーラム、東京)
2. 佐川森彦、大口裕人、原田武志、Samur MK, Tai Y-Z, Munshi NC, 木崎昌弘、秀島輝、Anderson KC: 多発性骨髄腫における Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) の新規治療標的としての有用性  
第 79 回日本血液学会学術集会(平成 29 年 10 月 20 日-22 日、東京国際フォーラム、東京)
3. 多林孝之、田中佑加、高橋康之、富川武樹、佐川森彦、阿南朋恵、渡部玲子、得平道英、木崎昌弘: 細胞周期チェックポイントキナーゼを標的とした多発性骨髄腫に対する新しい治療  
第 79 回日本血液学会学術集会(平成 29 年 10 月 20 日-22 日、東京国際フォーラム、東京)
4. 木崎 昌弘: 造血器腫瘍における治療の進歩: ビタミンから分子標的治療薬へ(招待講演)  
第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会(平成 28 年 7 月 28-30 日、神戸国際展示場・会議場、神戸)
5. 木崎昌弘: 分子病態に基づく造血器腫瘍の診断と治療(招待講演)  
第 17 回日本検査血液学会(平成 28 年 8 月 6-7 日、福岡国際会議場、福岡)
6. 高橋康之、多林孝之、田中佑加、木村勇太、富川武樹、佐川森彦、阿南朋恵、渡部玲子、得平道英、木崎昌弘: Novel therapy for both bortezomib- and lenalidomide-resistant multiple myeloma by targeting TOPK.  
第 78 回日本血液学会学術集会(平成 28 年 10 月 13-15 日、パシフィコ横浜、横浜)
7. Tabayashi T, Tanaka Y, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Sagawa M, Anan-Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Kizaki M: Inhibition of WEE1 induces cell death of both bortezomib- and lenalidomide-resistant multiple myeloma cells: a novel therapeutic approach targeting cell-cycle checkpoint kinase.  
58<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology(平成 28 年 12 月 3-6 日、San Diego, CA, USA)
8. Takezako N, Tokuhira M, Sekiguchi N, Kurihara Y, Ito K, Kurimoto M, Suzuki K, Kizaki M: The efficacy and safety of weekly bortezomib containing VMP followed by bortezomib maintenance therapy in unfit or frail multiple myeloma patients.  
58<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of

Hematology(平成28年12月3-6日, San Diego, CA, USA)

9. Kizaki M, Tabayashi T, Sagawa M, Tomikawa T, Tokuhira M, Iida S, Li M, Hashimoto Y: TM-233, a novel analog of ACA, induces cell death in multiple myeloma cells by targeting JAK/STAT and proteasome dual pathways. 第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月10日、名古屋国際会議場、名古屋)

10. 多林孝之、佐川森彦、富川武樹、高橋康之、木村勇太、阿南朋恵、渡部玲子、得平道英、李政樹、飯田真介、木崎昌弘:新規NF-κB阻害剤TM-233による骨髄腫細胞におけるボルテゾミブ耐性の克服  
第77回日本血液学会学術集会(平成27年10月16-18日、ホテル金沢、金沢)

11. Tabayashi T, Takahashi T, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto Anan T, Watanabe R, Tokuhira M, Mori S, Kizaki M: Novel Therapeutic approach to overcome both bortezomib and lenalidomide resistant multiple myeloma by targeting TOPK/PBK. 57<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology(平成27年12月, Orlando, FL, USA)

〔図書〕(計 4 件)

1. 木崎昌弘:多発性骨髄腫に対する治療の新たな展開. 小澤敬也、中尾眞二、松村到編)血液疾患最新の治療 2017-2019. 南江堂、東京、pp28-34, 2017.
2. 木崎昌弘:多発性骨髄腫の治療 移植非適応症例. 赤司浩一(監修)多発性骨髄腫診療 PROGRESS. メディカルビュー社、東京、pp36-39, 2016.
3. 金倉譲、木崎昌弘、鈴木律朗、神田善伸(編)EBM 血液疾患の治療 2017-2018. 中外医学社、東京、2016.
4. 木崎昌弘:多発性骨髄腫に対する治療目標. 木崎昌弘(編)ブラッシュアップ多発性骨髄腫、中外医学社、東京、pp72-77, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

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)分担研究者  
なし
  - (3)連携研究者  
奥田 晶彦 (OKUDA, AKIHIKO)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60201993