

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17866

研究課題名(和文) 予後不良多発性骨髄腫における悪性能獲得機序と新規治療開発：ARK5に注目して

研究課題名(英文) ARK5 in multiple myeloma with poor prognosis

研究代表者

木下 史緒理 (Shiori, Kinshita)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：70832062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨髄腫細胞の悪性能獲得のメカニズムとして、骨髄腫細胞の分子標的薬への耐性獲得、髄外病変の進展の促進の2点におけるARK5の関与を解明し、ARK5活性化による悪性度の高い骨髄腫細胞に対する有効な治療法の探索を目的として行った。分子標的薬への耐性獲得については、免疫調節薬レナリドミドの耐性獲得に関連している可能性が示唆された。髄外病変の進展については、低酸素下において、ARK5の発現は増強することが、多発性骨髄腫の髄外進展に関わる可能性を認めた。ARK5阻害薬の作用機序の検討においては、mTOR経路、カスパーゼなどのパスウェイの変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫においても、低酸素下低栄養下におけるARK5の発現増強を認めたこと、ARK5とEMTの関連において、E-cadherinとARK5により、OSが層別化されること、は学術的意義のある知見であった。今後、多発性骨髄腫におけるEMTとARK5の関連の研究をすすめることで、多発性骨髄腫の髄外進展の機序の解明につながると考える。また、ARK5阻害薬の治療応用については、まだ道のりは長いですが、患者由来の骨髄腫細胞においても腫瘍増殖抑制効果がみられており、さらに研究をすすめる予定である。

研究成果の概要(英文)：We conducted this study to elucidate the contribution of ARK5 in the two points. (1) Acquisition of resistance to molecular target medicine (2) Extension to extramedullary lesion. Finally, we tried to search effective treatment for high grade multiple myeloma with ARK5 activation. We found ARK5 might associate to acquisition of resistance to immunomodulatory drug, lenalidomide. We further showed increase expression of ARK5 under anoxia and undernutrition might promote extramedullary extension of multiple myeloma. In mechanism of ARK5 inhibitor, we indicated the change of mTOR and caspase pathway.

研究分野：医学 血液内科 多発性骨髄腫

キーワード：ARK5 多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室は、骨髄腫の予後不良な染色体異常の中でも、欧米人に少なくアジアで頻度が高いとされる、染色体転座 $t(14;16)$ (IgH-cMAF) 症例の全国的な後方視的解析を行い、本例は新規薬剤導入された後でも予後不良例が多いことなどを解明した (*Blood Cancer J.* 5: e285, 2015)。 $t(14;16)$ 症例の多くで、骨髄腫細胞の G-band 法で複雑な染色体異常が検出されており骨髄腫細胞の一部のみならず多くのクローンの DNA 合成・細胞周期が亢進し、ゲノム不安定性につながっていると考えられる。cMAF をはじめとした large MAF family (MAF) は、悪性腫瘍の発生等を中心に研究が進められてきたが、腫瘍の悪性能 (薬剤耐性や髄外病変等の発症) との関連は明らかになっていない。我々は以前より、MAF の転写活性能に注目し、ARK5、CyclinD2、インテグリン 7 など種々の遺伝子の発現に関わることを明らかにしてきた (*Oncotarget* 24:6936, 2005)。ARK5 はその後、上皮系腫瘍において、ストレス緩和や細胞障害性抗がん剤への耐性機序の関与が報告され、さらには近年、EMT 事象の中心的な因子として注目されている。多発性骨髄腫における悪性能獲得は、他のがん種と同様に、ゲノム不安定性・低酸素環境関連因子 (HIF1a など)・EMT の関与が推測されているものの、ほとんど解明されていない。今回、予後不良の骨髄腫の中でも、MAF が活性化する症例におけるその悪性能獲得機序を、ARK5 を手掛かりに解析することで、骨髄腫全体の悪性能獲得機序の解明研究の基盤になることを見込んだ。

2. 研究の目的

- ・各種治療薬への耐性獲得における ARK5 の役割の解明
- ・髄外病変を含めた骨髄腫細胞の悪性能獲得における ARK5 の役割の解明

上記 2 点から ARK5 の役割を解明し、ARK5 が活性化する悪性能の高い骨髄腫細胞に対する有効な治療の探索を行うことである。

3. 研究の方法

(1) ARK5 における骨髄腫細胞の増殖および髄外病変の促進能の検討

骨髄腫細胞株において、EMT 関連因子の発現、低酸素・低血糖下における細胞増殖能の変化、ARK5 や EMT 関連因子の発現変化および骨髄ストローマ細胞との接着因子の発現変化、を検討し、髄外進展を促進する因子を検討する。

患者検体を用いて、EMT 関連因子の発現と ARK5 の関連、予後との関連を検討する。

(2) ARK5 と分子標的薬耐性との関連の検討

ARK5 の発現レベルと、分子標的薬 (プロテアソーム阻害剤および免疫調節薬) の感受性の変化を調べる。

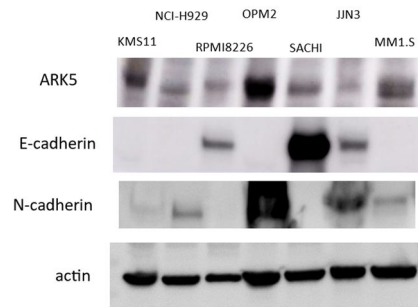
(3) ARK5 が活性化する悪性能の高い骨髄腫細胞に対する有効な治療の探索

ARK5 阻害薬 (HTH01-015) を用いて、ARK5 阻害薬の作用機序を蛋白レベルで検討する。

4. 研究成果

- (1) 髄外病変を含めた骨髄腫細胞の悪性能獲得における ARK5 の役割の解明

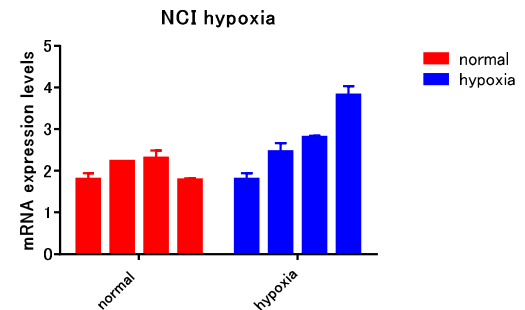
固形癌において、ARK5 を knock down すると、E-cadherin 抑制因子の発現が低下し、E-cadherin の発現が増強し、反対に vimentin の発現が低下することで、転移が抑制されると報告されている。多発性骨髄腫に関しては、間葉系マーカーとしては、vimentin よりも N-cadherin に関する既報が多くみられた。



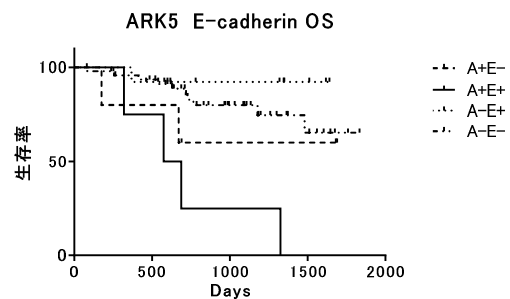
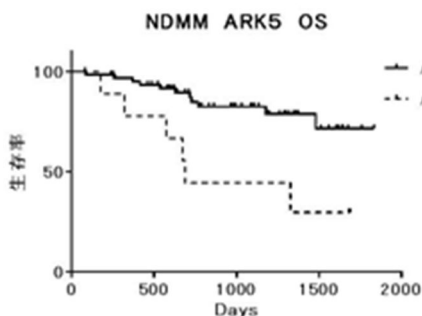
そこで、まず、骨髄腫細胞株における ARK5、E-cadherin、N-cadherin の発現を western blot で検討した。細胞株で E-cadherin の発現を認めたものは、RPMI8226、SACHI、JIN3 であり、N-cadherin の発現を認めたものは、NCI-H929、OPM2、JIN3、MM1.S であった。KMS-11 は N-cadherin のバンドがごく薄くみられたが、明らかに発現しているとは言えないと判断した。JIN3 のみ E-cadherin、N-cadherin の両方を発現していたが、JIN-3 以外は、E-cadherin または N-cadherin のどちらかのみ発現していた。

患者骨髄由来 CD138 細胞の検討では、95 例中、E-cadherin 陽性であったものは、25 例（26%）であり、ARK5 陽性であったのは 9 例であった。カイ二乗検定で、E-cadherin、ARK5 の発現に偏りは認められなかった。N-cadherin 陽性は 23 例（24%）であり、ARK5 と N-cadherin にも有意な偏りはなかった。一方で、E-cadherin と N-cadherin は両方陰性が 57 例、両方陽性が 10 例、E-cadherin のみ陽性が 15 例、N-cadherin のみ陽性が 13 例であり、カイ二乗検定で偏りが認められた。（ $p = 0.038$ ）

骨髄腫において、E-cadherin は低酸素状態になると、発現が低下し、骨髄腫の髄外進展を促進する、と既報がある。低酸素インキュベータを用いて、骨髄腫細胞株の低酸素下における変化を確認したところ、ARK5 は低酸素下で mRNA レベルでの発現増強を確認した。また、低栄養（低血糖）下でも同様に mRNA レベルでの発現増強を確認した。



患者検体をもちいた解析では、ARK5 陽性患者では陰性患者と比較し、優位に OS が短かった。E-cadherin の陽性陰性で OS に差はなかったが、ARK5 とともに検討すると、ARK5 陽性かつ E-cadherin 陽性群で最も OS が短く、ARK5 陰性かつ E-cadherin 陽性群で最も OS がよかった。ARK5 と N-cadherin については、OS の層別化はされなかった。



骨髄腫では、低酸素下において、E-cadherin の発現が低下し、骨髄腫細胞が髄外へ進展し、進

展部位で接着して増殖する際に、E-cadherin の発現が再度上昇する、と報告されている。本研究の結果から、すべての骨髄腫に E-cadherin が発現しているわけではないこと、ARK5 の発現と E-cadherin の発現に直接関連がないことがわかった。ARK5 陽性かつ E-cadherin 陽性細胞で最も OS が短い、との結果から、E-cadherin 陽性 ARK5 陽性骨髄腫では、腫瘍増殖とともに腫瘍細胞が低酸素下におかれると、ARK5 の発現が増強し、E-cadherin の発現低下がおこり、骨髄腫細胞が髄外へ進展しやすい環境となっているのではないかと、反対に、ARK5 陰性 E-cadherin 陽性骨髄腫では、E-cadherin の発現低下をきたしにくく、腫瘍進展をしにくい環境が維持されるのではないかと推測された。今後、この機序を証明するために、さらに検討をする予定である。

(2) ARK5 と分子標的薬耐性との関連の検討

骨髄腫の治療薬である免疫調節薬であるレナリドミド治療を受けた患者のうち、骨髄中の骨髄腫細胞における ARK5 発現群では非発現群に比べ生存期間が短かった。一方で、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミド治療を受けた患者では、ARK5 の発現の有無で OS に有意な差は認めなかった。ARK5 は免疫調節薬の薬剤耐性と関連がある可能性があり、CRBN およびその関連因子 (IKZF1, IKZF3, IRF4 など) との関連を今後検討する予定である。

(3) ARK5 が活性化する悪性度の高い骨髄腫細胞株に対する有効な治療の探索

ARK5 阻害薬 (HTH01-015) は MTS assay の結果から、骨髄腫細胞株、患者由来 CD138 陽性細胞の増殖を抑制した。ARK5 阻害薬の作用機序を western blot で検討したところ、ARK5 阻害薬により、cleaved-cas3,8,9 の発現増強を認め、アポトーシスが起これば確認された。固形癌では mTOR 経路を阻害すると報告されている。多発性骨髄腫での検討でも、mTOR の発現は低下しており mTOR 経路が関与している可能性はある。また、c-myc の発現低下も確認された。ARK5 阻害薬は骨髄腫細胞に対して有効な治療となりうるが、明確な機序は解明できておらず、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下 史緒理
2. 発表標題 多発性骨髄腫の治療・予後におけるARK5発現の意義
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------