

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 1 5 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591221

研究課題名（和文）サリドマイド結合分子の同定と耐性化克服のための創薬研究

研究課題名（英文）Analysis on molecular mechanism of anti-tumor effect of thalidomide and exploitation of novel agents to overcome therapy-resistant multiple myeloma

研究代表者

服部 豊（HATTORI YUTAKA）

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：20189575

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の克服を目指し、治療薬サリドマイドの分子機構の解明、血管新生増殖因子の分子標的、新規化合物による骨病変の改善効果について検討した。その結果、我々は新規サリドマイド誘導体を合成し、その結合分子として細胞分裂に必須の蛋白質を同定した。可溶性線維芽細胞増殖因子受容体 1 を用いて骨髄腫細胞の分子標的を行ったところ、*in vitro* において増殖抑制傾向が観察された。また、上記の新規サリドマイド誘導体は、マウス破骨細胞の分化や機能を抑制し、骨病変改善効果が期待された。

研究成果の概要（英文）：To overcome multiple myeloma, we examined molecular mechanism of anti-tumor effect of thalidomide, molecular targeting of angiogenic growth factor and inhibition of differentiation and activity of mouse osteoclasts using novel thalidomide derivative. We found that this compound directly binded to one of the essential factors for cell mitosis. Soluble receptor 1 for fibroblast growth factor could regulate proliferation of myeloma cells *in vitro*. It was also found that TC11 inhibited differentiation of osteoclasts and absorption of bone matrix, suggesting potential therapeutic effect of TC11 on bone lesion in myeloma patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫、サリドマイド、破骨細胞、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

近年では造血器腫瘍のうち悪性リンパ腫や白血病の多くの症例が治癒に至るのに対し、多発性骨髄腫は、いまだに致死性の予後不良疾患である。近年、造血幹細胞移植法に加えて、サリドマイドやその誘導体さらにはボルテゾミブといった新規薬剤が登場し、難治・再発例にも良好な反応が得られている (Kakimoto T, Hattori Y, et al. Jpn. J. Cancer Res. 93: 1029, 2002)。しかし、いずれの症例も数年先にはこれら新規薬剤にも耐性となり、最終的には致命的となる。また、サリドマイドを使用する限り催奇形性の他、深部静脈血栓症・末梢神経障害・好中球減少症や呼吸器合併症といった重大なリスクは永遠に避けられない(Hattori Y, et al. Br J Haematol;128:885, 2005; Hattori Y, et al. Int J Hematol. 79:283, 2004)。かかる現状打破のために、原点にもどってサリドマイドの抗腫瘍効果、耐性化、有害事象のメカニズムを分子レベルで解明し、画期的な新規治療法開発に挑む。

一方、分担研究者の柳川は、in vitro translation 法に独自の改良を加えて、結合蛋白から直接遺伝子を同定するユニークな cDNA クローニング法である In Vitro Virus 法(IVV 法)を考案した(Miyamoto Sato E, and Yanagawa H et al. Nucleic Acids Res 31,e78,2003)。そこで、同手法を用いて、サリドマイドに結合する分子を明らかにすることを思い立った。また、代表者は以前より

線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体遺伝子の基礎的研究(Hattori Y 他 PNAS 87: 5983,1990; Hattori Y 他 Cancer Res 52:3367, 1992)に携わり、その上に立ってサリドマイドの臨床試験を遂行し FGF-2 や肝細胞増殖因子(HGF)の血漿中濃度を surrogate marker として測定したところ、HGF や FGF-2 濃度が治療後も低下せず、これがサリドマイド耐性に関与していること、多変量解析により HGF 濃度が独立した予後不良因子となることを見出した(Hattori Y 他、Cancer Science 99:1243,2008)。服部は、FGF-2、HGF 値はまた、臨床的活動性のうち特に貧血・骨溶解性病変に密接な相関があることも明らかにした(服部豊他 臨床血液 49;359,2008)。

2. 研究の目的

当研究の目的は、(1)サリドマイドがなぜ骨髄腫に有効なのかという原点に立ち戻って、その結合蛋白を実際に分離して機能解析をすすめ、分子レベルで同薬の抗骨髄腫作用の機序解明に道筋をつける。さらに、(2) FGF-2、HGF に対する特異的阻害剤を用いた分子標的を in vitro および in vivo にて遂行することによって、FGF-2、HGF が単なる腫瘍マーカーなのか本質的に病態にかかわる分子なのかを明らかにし、分子標的療法としての可能性を探る。(3)骨病変が QOL 低下の重要な理由となるが、本研究期間中に新たに見出された骨髄腫細胞増殖抑制効果を有する化合物について、破骨細胞の分化や機能を抑

制するについても重点的に追求する。

3. 研究の方法

(1) サリドマイド結合分子の同定：サリドマイド自体の生物活性は低く、その代謝産物が抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。そこで、柳川および服部は 40 種のサリドマイド誘導体を合成し、骨髄腫細胞株 KMS34 の増殖抑制作用を指標にスクリーニングを行った。

さらに柳川らは、活性が得られた化合物に対し、骨髄腫細胞由来の mRNA-puromycin 蛋白質ライブラリーより直接結合分子のクローニング (in vitro virus: IVV 法) を行った。

候補化合物の抗骨髄腫作用については、骨髄腫細胞株 KMS34, 11 の増殖抑制、Annexin V 陽性細胞比率検索によるアポトーシス誘導を検討した。また、KMS34 移植 SCID マウスを用いて、候補化合物を腹腔内投与し腫瘍増殖遅延および剖検によるアポトーシス誘導を検査した。

(2) 可溶性受容体を用いたハイリスク骨髄腫の克服：骨髄腫細胞株における FGF 群、および FGF 受容体群の発現を RT-PCR により検索した。また、骨髄腫細胞株における FGF-2 の培養上清への分泌を ELISA 法にて測定した。FGFR 群の蛋白質発現を Santa Cruz 社の抗体を用いて Western Blot 法により検索した。

次に可溶性受容体 (sFGFR1b-IIIc) 遺伝子をアデノウィルスベクター (AdCMVFGFR1) を用いて骨髄腫細胞株に導入した。その後、sFGFR1 遺伝子導入細胞の増殖について MTT 方

を用いて検討した

(3) 分子標的薬による骨病変治療効果：

成熟破骨細胞の分化は、マウス (C57BL6/Jjcl) 骨髄細胞より浮遊細胞を取り出し、10ng/mL M-CSF および 10ng/mL RANKL 存在下で破骨細胞の培養を行った。成熟破骨細胞の分化の評価は、TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 染色した。骨吸収能検討には、破骨細胞細胞株 RAW264.7 を用いた。すなわち、BioCoat Osteologic slides (BD Falcon 社) を用いて、Von Kossa 染色により骨吸収窩を測定した。そのカウントには image J ソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

(1) サリドマイド結合分子の同定：

その結果、それ自体が t(4;14) 陽性かつ TP53 遺伝子を欠失するハイリスク骨髄腫細胞株 KMS34 に対し増殖抑制とアポトーシス誘導を来す新規化合物 TC11 を見出した。続いて、柳川らが開発した IVV 法を駆使して、骨髄腫細胞株 mRNA-蛋白質ライブラリーより TC11 が直接結合する蛋白質の同定を試みた。その結果、TC11 の結合分子として、細胞分裂の M 期チェックポイントに重要な nucleophosmin (NPM)-1 を同定した。各種癌細胞株を用いて、RNA 干渉により NPM-1 遺伝子ノックダウンを行い、細胞形体について検討を行った。HeLa 細胞においては、細胞分裂時に核の多極化を来すことが確認された。近年サリドマイドの催奇形性にかかわる標的分子として Cereblon が分離された (Ito T, et al. Science 327:1345, 2010)。その後の検

討で、cereblonはレナリドミドの抗骨髄腫作用に必須の分子であることが報告された。ただし、今回の検討では、cereblonはTC11の結合分子として見出されなかった。

一方、この新規誘導体TC11は、高齢者に多く難治性造血器腫瘍である骨髄異形成症候群(MDS)細胞に対してもレナリドミドよりも低い濃度で細胞増殖抑制とアポトーシス誘導を来し、このような濃度では正常のマウス骨髄細胞によるコロニー形成能をほとんど阻害しない。以上の検討より、骨髄腫やMDSといった難治性造血器腫瘍の新しい治療標的分子が明らかとなり、さらにその分子標的化合物も開発することができた。

(2) 可溶性受容体を用いたハイリスク骨髄腫の克服：t(4;14)染色体転座を有しFGFR3の過剰発現を示す患者は、治療抵抗性で予後が悪くハイリスク症例と呼ばれる。KMS11および34細胞はt(4;14)を有しているが、これらに対して可溶性受容体(sFGFR1b-IIIc)を用いた分子標的を行った。

初年度はまず、FGFおよび受容体群の発現を検討した。その結果、FGF-1, 2およびFGFR1, 2, 4はいずれの細胞株においても遺伝子発現を認めた。特にKMS28細胞は培養上清中に多量のFGF-2を分泌する。FGFR3は、t(4;14)を有するKMS11, 26, 28, 34細胞にのみ遺伝子産物の発現を認めた。次に、FGFシグナル伝達が骨髄腫治療の治療標的になり得るかを検討するために、アデノウイルスベクターを用いてKMS34細胞他に可溶性受容体sFGFR1を遺伝子導入したところ増殖抑制が認められた。

さらにFGFおよびその受容体の発現機能解析を進めたところ、上皮特異的に発現するK-sam-II遺伝子が骨髄腫細胞に発現していることを見出した。続いて、上皮間葉系(EMT)遺伝子の発現を検索したところ、t(4;14)やdel17を有するハイリスク骨髄腫細胞では間葉系遺伝子の強発現を認めた。このことは骨髄腫が固形癌の形質を獲得し、化学療法への抵抗性や髄外病変の形成を来すようになるのではないかと推測している。

(3) 分子標的薬による骨病変治療効果：骨融解病変は、骨髄腫における重要な随伴症状であり患者のquality of lifeを著しく低下させる。我々が新たに見いだした新規骨髄腫治療候補化合物が、破骨細胞の分化や機能を抑制しうるかについて検討を行った。RANKLおよびM-CSF存在下でin vitroにおけるマウス破骨細胞分化誘導の系を習得し、これに新規薬剤を添加し直接の破骨細胞分化・機能の抑制効果を検討した。その結果、新たなサリドマイド誘導体TC11は、骨髄腫細胞の増殖抑制を示すよりも低い濃度にて破骨細胞の分化を抑制する効果が認められた。さらに、骨基質吸収系においても抗腫瘍効果を示す濃度(3 μ M)にて、破骨細胞の機能が抑制されることがわかった。すなわち、TC11は抗腫瘍効果とは独立して骨病変改善効果を有することが期待される。さらに、TC11の破骨細胞の分化に關与する遺伝子発現への影響についても検討を開始した。すなわち、RANKL, M-CSF存在下で破骨細胞を分化させる際に、TC11が存在すると分化のマスター遺伝子であるNFATc1遺伝子の発現が抑制されるのか

を検討し、その結果分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP) 性やアクチンリング形成など破骨細胞の機能も抑制されるかについても、今後分子レベルで考察を加える。

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 7 件)

- 1) Shiheido H, Terada F, Tabata N, Ichigo Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H, Ogawa Y, Du W, Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y and Yanagawa H. A phthalimide derivative that is effective on multiple myeloma inhibits centrosomal clustering by interacting with nucleophosmin. PLOS ONE in press.
- 2) Hattori Y (corresponding author), Miyakawa Y, Yokoyama K, Yamada T, Du W, Jinzaki M, Shinmoto H, Okamoto S. Prospective study of combination therapy with low-dose thalidomide plus prednisolone ameliorating cytopenia in primary myelofibrosis. Int J Hematol. 93:129-131, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153775>
- 3) 塚田唯子、服部 豊、中島秀明、横山健次、村田満、清水長子、近藤直美、岡本真一郎. 自家造血幹細胞移植 5 年後に B 細胞性急性リンパ性白血病を発症した多発性骨髄腫。臨床血液 53:219-223, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450582>
- 4) 服部 豊 免疫グロブリン異常症 多発性骨髄腫を中心に 日本内科学会雑誌

100:1773-1780,2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863752>

- 5) 服部 豊 多発性骨髄腫の初期治療、海外からの報告の総括とわが国の現状 臨床血液 51 : 1499-1510、2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962484>
- 6) 服部豊. サリドマイドの新たな適用 多発性骨髄腫における作用と安全性. 日本病院薬剤師会雑誌 45; 645-648, 2009.
- 7) 定平健、服部 豊 多発性骨髄腫とボルテゾミブ 日本医師会雑誌 138:734-5, 2009.

[学会発表](計 9 件)

- 2011.10 上田智基 9 名中服部豊は 9 番目 (corresponding author) Phase 2 study of post-transplant thalidomide consolidation therapy for multiple myeloma. 第 73 回日本血液学会 名古屋国際会議場 2011/10/14
- 2011.9 服部 豊 難治性造血器腫瘍治療の現状と問題点。検査・バイオマーカーといった分析学は、治療法の発展にどのような貢献をしているか。日本分析化学会第 60 年会 名古屋大学 2011/9/16
2011. 3 寺田路子、尾崎由枝、内藤悠平、鈴木裕也、柳川弘志、始平堂弘和、田原佳代子、山田健人、杜ぶん林、飯島史朗、松下麻衣子、服部豊. 新規フタルイミド誘導体の抗骨髄腫作用の検討 第 131 回日本薬学会年会 静岡 2011/3/29 (東日本大震災により誌上発表のみ)

- 2010.12 Ozaki Y, Naito Y, Yanagawa H, Suzuki Y, Du W, Yamada T, Matsuo K, Doi N, Iijima S, Matsushita M, Tahara K, Hattori Y. A Novel Anilinoquinazoline Derivative Inhibits Growth of High Risk Myeloma Cells In Vivo and Regulates Differentiation of Osteoclasts. 52nd AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition. Orland, FL. Blood 116;1659a, 2010, 2010/12/6
2010. 9 内藤悠平, 鈴木裕也, 尾崎由枝, 柳川弘志, 杜ぶん林, 山田健人, 土居信英, 飯島史朗, 松下麻衣子, 田原佳代子, 服部豊. 新規アニリノキナゾリン誘導体を用いた in vivo におけるハイリスク多発性骨髄腫の治療効果. 第69回 日本癌学会学術総合大会. 大阪市. 講演要旨集 p86. 2010/09.
- 2010.10 鈴木裕也, 寺田路子, 内藤悠平, 柳川弘志, 杜ぶん林, 山田健人, 土居信英, 飯島史朗, 松下麻衣子, 田原佳代子, 服部豊. ハイリスク骨髄腫克服のためのスクリーニングシステムの構築. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京. 講演要旨集 p93. 2010/10.
2010. 6 星真理子, 寺田路子, 尾崎由枝, 鈴木裕也, 内藤悠平, 松本邦夫, 杜ぶん林, 山田健人, 飯島史朗, 松下麻衣子, 服部豊. 血管新生増殖因子(FGF・HGF)をターゲットとしたハイリスク多発性骨髄腫の分子標的療法の確立. 第11回日本薬学会 Pharmacology Hematology シンポジウ

ム. 東京都. 講演要旨集 p36. 2010/06.

2010. 9 服部 豊 教育講演「多発性骨髄腫の初期治療、海外からの報告の総括とわが国の現状」第72回日本血液学会総会 2010/9/25 横浜
- 2009.10 服部 豊 多発性骨髄腫治療の現状と問題点 第53回日本薬学会関東支部大会 城西大学 坂戸市 2009/10/3

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 豊 (HATTORI YUTAKA)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：20189575

(2)研究分担者

柳川弘志 (YANAGAWA HIROSHI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：40327672

(3)連携研究者

山田健人 (YAMADA TAKETO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60230463