

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790918

研究課題名（和文） TGF- $\beta$  受容体阻害薬による新規骨髄腫骨病変治療法の開発研究課題名（英文） TGF- $\beta$  inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth

研究代表者：竹内 恭子（ TAKEUCHI KYOKO ）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60511334

研究成果の概要（和文）：

多発性骨髄腫は、骨髄微小環境に依存した進展を示し広範な骨破壊性病変を形成する難治性の造血器悪性腫瘍である。骨髄腫骨病変部では、活性型 TGF- $\beta$  が多量に存在し骨形成を抑制していると考えられる。本研究結果から、TGF- $\beta$  I 型受容体（ALK5）阻害薬による TGF- $\beta$  作用の阻害は、骨髄腫において骨芽細胞分化を誘導し骨髄腫腫瘍進展を抑制することが示唆され、ALK5 阻害薬が骨形成の回復と同時に骨髄腫の腫瘍進展を抑制する新たな分子標的治療法の開発につながり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Multiple myeloma develops and expands almost exclusively in the bone marrow, and generates devastating bone destruction. In bone lesions in myeloma, TGF- $\beta$  is released from the bone and activated, which suppresses terminal osteoblast differentiation. Inhibition of TGF- $\beta$  actions by TGF- $\beta$  receptor type I kinase inhibitor enhances osteoblastic differentiation to mature osteoblasts. Furthermore, mature osteoblasts inhibit, while immature stromal cells enhance, myeloma cell growth and survival. Thus, inhibition of TGF- $\beta$  signal may become a new therapeutic target against myeloma cell growth and destructive bone lesions.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液内科

科研費の分科・細目：血液内科学・血液腫瘍学

キーワード：TGF- $\beta$ 、多発性骨髄腫

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに骨髄腫細胞が可溶性 Wnt 阻害因子を産生し、骨芽細胞分化の主要経路である Wnt/ $\beta$  カテニン軽度を遮断することにより、骨芽細胞分化が抑制されることを示してきた (Oshima, et al. **Blood**, 2005)。しかし、Wnt/ $\beta$  カテニン経路は骨髄腫細胞においては増殖促進シグナルであり、Wnt 阻害因子の抑制は流用増殖をもたらす可能性があるため、本症の骨量回復のためには腫瘍増殖をもたらさない他のアプローチが必要である。そこで、骨芽細胞分化抑制因子である TGF- $\beta$  に着目した。TGF- $\beta$  は骨芽細胞終末分化すなわち石灰化の強力な抑制因子であるが、その作用を抑制すると石灰化が効率よく誘導されることが報告されている (Maeda et al. **EMBO J.** 3:552-563, 2004)。TGF- $\beta$  は骨芽細胞や骨細胞から産生され、骨基質内に非活性型として極めて多量に存在しており、骨吸収に伴い骨より動員され、さらに破骨細胞による酸や MMP-9 等により TGF- $\beta$  は活性型となる。骨髄腫では骨吸収が著明に亢進しているため、骨髄腫骨病変部には活性型 TGF- $\beta$  が多量に存在し骨形成を抑制していると考えられる。

そこで、我々は、TGF- $\beta$  に着目し TGF- $\beta$  I 型受容体低分子阻害薬 (SB431542) による予備検討を行った。TGF- $\beta$  受容体阻害薬を添加すると骨形成誘導因子 BMP-2 による骨芽細胞の終末分化すなわち石灰化結節形成の誘導が著明に促進された。興味深いことに TGF- $\beta$  阻害薬は、骨髄腫細胞上清による骨芽細胞分化抑制をも回復し石灰化結節形成を誘導した。さらに、我々は BMP-2 により間質細胞から石灰化結節を形成する終末分化段階にまで分化させた

成熟骨芽細胞と無刺激の間質細胞を骨髄腫細胞株と共存させたところ、間質細胞は骨髄腫細胞の増殖を促進したが成熟骨芽細胞は逆に骨髄腫細胞にアポトーシスを誘導した。

以上の結果より、TGF- $\beta$  阻害薬を用いることにより骨髄腫においても骨芽細胞の分化誘導が可能であり、また成熟骨芽細胞が骨髄腫の生存を抑制する可能性が考えられ本研究が計画された。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫の発症は高齢化とともに近年急速な増加傾向にあるが、現有の治療法では治癒が困難であり、新たな治療戦略が必要とされている。また、本症では破骨細胞形成の亢進とともに骨芽細胞分化が強力に抑制されているため骨が急速に喪失し、容易に骨折をきたす。喪失した骨の回復は重要な臨床課題であるが、現在腫瘍性骨破壊部に骨形成を誘導する治療法はなく、その基礎検討もほとんどない。我々は、TGF- $\beta$  阻害薬が *in vitro* で骨芽細胞分化を効率よく誘導すること、また、分化誘導された骨芽細胞が骨髄腫細胞に細胞死を誘導しうることを示してきた。そこで本研究では、TGF- $\beta$  受容体阻害薬による新規骨髄腫骨病変治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの研究結果を基盤とし、腫瘍抑制と骨病変の進展防止・改善のために、TGF- $\beta$  I 型受容体低分子阻害薬を用いた骨芽細胞分化の誘導療法の開発と、成熟骨芽細胞による骨髄腫増殖抑制因子の検索・同定を行う。また、骨髄腫動物モデルにおいて、多発性骨髄腫に対する TGF- $\beta$  抑制の影響を明らかにする。

- (1) In vitro で、TGF- $\beta$  I 型受容体低分子阻害薬による骨芽細胞分化誘導の分子機序を解明する。
- (2) 骨髄腫細胞動物モデルを用い、TGF- $\beta$  I 型受容体低分子阻害薬が腫瘍進展および骨病変の進展に及ぼす影響を検討する。
- (3) 骨芽細胞が骨髄腫細胞増殖に及ぼす影響を、骨髄腫細胞増殖因子、抗アポトーシス因子などを解析し明らかにする。

#### 4. 研究成果

TGF- $\beta$  は骨形成誘導因子 BMP-2 による骨髄間質細胞からの骨芽細胞分化を強力に抑制したが、TGF- $\beta$  受容体阻害薬 SB431542 および Ki26894 を添加すると BMP-2 による骨芽細胞分化すなわち石灰化結節形成の誘導が著明に促進された。興味深いことに TGF- $\beta$  阻害薬は、骨髄腫細胞上清による骨芽細胞分化抑制をも回復した(図 1)。BMP-2 の細胞内伝達分子である Smad1 は BMP-2 によりリン酸化されるが、TGF- $\beta$  の添加下では BMP-2 による Smad1 のリン酸化が強力に抑制された。また、骨髄腫細胞上清により骨芽細胞での canonical Wnt 経路の標的因子 TCF の転写活性が抑制されたが、この抑制は TGF- $\beta$  受容体阻害薬の添加後も解除されなかった。従って、TGF- $\beta$  作用の阻害による骨芽細胞分化誘導は、canonical Wnt 経路を介さず BMP-2 の下流シグナル経路を増強することによりもたらされることが示唆された。

次に、骨芽細胞分化誘導が骨髄腫腫瘍進展に及ぼす影響を検討した。石灰化結節を形成する終末分化段階にまで分化させた骨芽細胞は、その前駆細胞である骨髄間質細胞とは全く逆に骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制し、骨髄腫細胞にアポトーシスを誘導した(図 2)。さらに、終末分化した骨芽細胞は、抗骨髄腫治療薬である melphalan や

dexamethasone の抗腫瘍効果を増強した。TGF- $\beta$  受容体阻害薬は、骨髄間質細胞や前骨芽細胞株 MC-3T3E1 をより早期に成熟骨芽細胞に分化させ、骨髄腫細胞への生存抑制活性を惹起させた。最後に、SCID マウス皮下に生着させたウサギ大腿骨の骨髄内にヒト骨髄腫細胞株 INA-6 を移植した骨髄腫動物モデル(SCID-rab)で、TGF- $\beta$  I 型受容体阻害薬 Ki26894 の効果を検討した。Ki26894 投与群では、コントロール群に比べ著明に骨融解と骨髄腫細胞増殖の抑制が認められた(図 3)。これらの結果より、TGF- $\beta$  作用の抑制は骨髄腫において骨芽細胞分化を誘導し骨髄腫腫瘍進展を抑制することが示された。

以上より、骨髄腫でみられる骨芽細胞分化の抑制は、骨病変の形成のみならず骨髄腫細胞を成熟骨芽細胞による生存抑制から回避させている可能性があり、TGF- $\beta$  I 型受容体阻害薬は骨形成の回復と同時に骨髄腫の腫瘍進展を抑制しうる新規治療法の候補と考えられた。

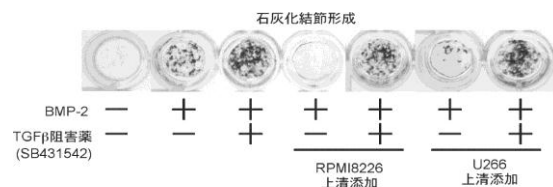


図 1. TGF $\beta$ 阻害薬による骨芽細胞分化の誘導

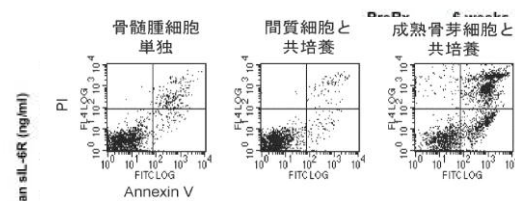


図 2. 骨芽細胞による骨髄腫細胞のアポトーシスの誘導



図 3. 骨髄腫動物モデル(SCID-rab)でのTGF- $\beta$ 阻害薬の影響

#### 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1件）

1. TGF- $\beta$  inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. Kyoko Takeuchi, Masahiro Abe, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Hiroe Amou, Shinsuke Kido, Takeshi Harada, Osamu Tanaka, Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Ayako Nakano, Kumiko Kagawa, Kenichiro Yata, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto. 査読あり. 2010. Mar 25;5(3):e9870 PLoS ONE.

〔学会発表〕（計1件）

1. 竹内恭子 TGF- $\beta$  I型受容体（ALK5）阻害薬は骨芽細胞分化を誘導し骨髄腫瘍進展を抑制する. 第13回日本がん分子標的治療学会 平成21年6月26日 徳島

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 恭子 (TAKEUCHI KYOKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60511334

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者