

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791085

研究課題名(和文) 難治性リンパ系腫瘍の小胞体ストレス応答(XBP1)を標的にした分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Study of the agent targeting for ER stress-induced XBP1 activity in refractory lymphoid malignancies.

研究代表者

李 政樹 (RI, MASAKI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00567539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は形質細胞性腫瘍であり、過剰な抗体産生による小胞体ストレス応答が活性化している。本研究では、骨髄腫の新規分子標的治療の開発を目的として、小胞体ストレス応答因子であるXBP1の阻害活性を有する薬剤であるトヨカマイシンを用いて、骨髄腫に対する抗腫瘍効果を検討した。トヨカマイシンはXBP1が恒常的に活性化しているほぼすべての骨髄腫細胞株にnMレベルで強い抗腫瘍活性を示し、また担癌マウス系を用いた検証でも十分な抗腫瘍活性を示した。以上よりXBP1阻害剤は骨髄腫治療における有望な治療の可能性を有していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified toyocamycin, an adenosine analog, as an XBP1 inhibitor isolated from culture broth of an Actinomycete strain. Toyocamycin as well as other adenosine analogs suppressed XBP1 activation and induced apoptosis in ER-stressed tumor cells. In addition, toyocamycin inhibited the constitutive activation of XBP1 in MM cells, showed synergistic cytotoxic effects with bortezomib, and triggered dose-dependent apoptosis of MM cell lines as well as primary MM cells. Toyocamycin showed biological activities at the nanomolar level and mediated a growth inhibitory effect in an MM xenograft model similar to bortezomib. These results provide a rationale for initiating clinical trials using toyocamycin or other adenosine analogs, alone or in combination with bortezomib, for patients with MM refractory to immunomodulatory drugs and bortezomib. Also, toyocamycin could be a lead compound to further develop more specific inhibitors of the IRE1-XBP-1 pathway.

研究分野：医歯科学

科研費の分科・細目：血液腫瘍学

キーワード：骨髄腫 XBP1

## 1. 研究開始当初の背景

細胞がタンパク質の分泌を正常に保つためには、分泌タンパク質が正常に折りたたまれる品質管理と、異常に折りたたまれた不可逆性タンパク質が除去する分解処理が必要である。分泌タンパクの管理は主に小胞体内で行われるが(小胞体ストレス状態)、小胞体内部では上記二つの作業が円滑に行われるために、小胞体ストレス応答という品質管理機構が積極的に働き、プロテアソームによるタンパク分解系とリンクすることで小胞体内部の恒常性が保たれている。

我々の研究室では、難治性リンパ系腫瘍である多発性骨髄腫ならびにT細胞リンパ腫の腫瘍生物学特性、新規分子標的薬の作用機序の解明、分子標的薬の耐性機序の解明をテーマに研究報告を行ってきた。(Ri-BTZ 耐性、Ri-BTZ to Tcell, Yano-BTZ+CPT)。最近では、上記リンパ系腫瘍が上記の小胞体ストレス応答を他の血液腫瘍と比較して強く発現していることに着目して、その因子(IRE1-XBP1 経路)を阻害する分子標的療法の開発に力を注いでいる。小胞体ストレス応答因子に着目している理由として、これまでの研究成果・予備実験結果、及びそれらに基づいた仮説が下記にあげられる。

- (1) 骨髄腫細胞およびT細胞性リンパ腫細胞では、小胞体が恒常的なストレス状態にある。
- (2) BTZ 耐性細胞株では感受性株よりも小胞体ストレス応答因子がさらに亢進している。
- (3) IRE1-XBP1 経路の阻害剤の同定  
これまでの研究により、微生物培養液からIRE1-XBP1 活性経路の阻害効果を有する3つの化合物が単離・同定されている(Tashiro E et al. J. Antibiot. 60: 547, 2007)。その一つであるトヨカマイシンは、骨髄腫細胞株群に対して nM レベルで強い抗腫瘍効果を発揮する。

## 2. 研究の目的

本研究では、難治性リンパ系腫瘍における小胞体ストレス応答の活性化に着目して、応答因子を標的にした分子標的療法の開発を目的に下記のことを明らかにする。

- (1) 難治性リンパ系腫瘍において、恒常的な小胞体ストレス応答因子の活性化が与える腫瘍生物学的な特性を詳細に検討する。
  - ・低栄養・低酸素下環境を含めた小胞体ストレス増強環境での増殖能の維持
  - ・抗がん剤などのアポトーシス刺激に対してどのように抗アポトーシス能が働くのか。
- (2) IRE1-XBP1 経路を中心とした小胞体ストレス応答の活性化が造血器腫瘍(多発性骨髄腫・T細胞性リンパ腫)におけるボルテゾミブ耐性にどのように寄与しているかを、オートファジー系との関連も含めて調べる。
- (3) 現在同定されている XBP1 活性阻害剤の難治性リンパ系腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討する。
- (4) 上記阻害剤による抗腫瘍効果と、XBP1 活性阻害による異常タンパクの蓄積-小胞体ストレス応答の破綻との関連性を、小胞体-ミトコンドリア経路を中心に検討する。
- (5) 担がん scid マウスの系を作成し、阻害剤の in vivo での効果を検証する。

## 3. 研究の方法

難治性リンパ系腫瘍の小胞体ストレス応答因子(XBP-1 の活性化)を標的にして、小胞体のホメオスタシスを破綻させる分子標的療法の開発を目的に、下記の研究項目を予定した。

- (1) XBP-1 活性阻害化合物の難治性リンパ系腫瘍細胞株(骨髄腫・T細胞リンパ腫)、臨床検体、及びボルテゾミブ耐性腫瘍株

に対する抗腫瘍効果を検討する。

- (2) XBP-1 活性阻害化合物による抗腫瘍効果の作用機序を、小胞体ストレス応答・アポトーシス制御経路に及ぼす影響を中心に探索する。また、XBP-1 活性阻害以外の作用も調べる。
- (3) 担がん scid マウスの系を作成し、XBP-1 活性阻害化合物の in vivo での効果を検討する。

#### 4. 研究成果

難治性血液腫瘍である骨髄腫は形質細胞性腫瘍であり、過剰な抗体産生による小胞体ストレスにさらされ、生理的な Unfolded protein response (UPR)が活性化している事が報告されている。その中でも、ATF6 経路および XBP1 の活性化が報告され(図1) それらの阻害による UPR 機構の破綻は新規分子標的参入の可能性を秘めている。本研究では、骨髄腫の新規分子標的治療の開発を目的として、XBP1 阻害活性を有する薬剤であるトヨカマイシンを用いて、骨髄腫に対する抗腫瘍効果を検討した。さらには、骨髄腫と同様の難治性リンパ系腫瘍である成熟T細胞性リンパ細胞株についても同様に検証した。その結果、トヨカマイシンは低濃度で十分な抗腫瘍効果を示していた。その結果、トヨカマイシンは低濃度で十分な抗腫瘍効果を示していた。骨髄腫細胞株9株を用いて、トヨカマイシンの抗腫瘍効果を MTS assay 法にて濃度依存的に調べたところ、24h、48h の暴露とともに 100nM の濃度以下で十分な増殖抑制が観察された。また、高感受性を示す3株(OPM2, RPMI8226, ILKM2)における apoptosis を、低濃度のトヨカマイシン(30nM)投与下にて AnnexinV 染色法にて検出したところ、高度な apoptosis の誘導が認められた。骨髄腫細胞株と同様に患者骨髄腫細胞も検証したところ、濃度依存的な増殖抑制

が認められた。骨髄腫細胞株と同様に 30 nM の低濃度で効果が認められた(図2)。さらに、活性型 XBP1 の阻害がどのように腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するのかを検討した。骨髄腫細胞およびツニカマイシン処理した HeLa 細胞を用いた検証では、トヨカマイシンは IRE-XBP1 以外の他の小胞体ストレス応答経路には影響を及ぼさなかった。また、活性型 XBP1 を阻害すると、小胞体ストレス関連アポトーシス因子である CHOP の発現亢進および casapase3 の活性化が見られた。このことは、XBP1 阻害は小胞体ストレス応答なかでも、IRE-XBP1 経路のみが特異的に阻害され、致命的な小胞体ストレスが進行し、腫瘍細胞に細胞死を誘導するものと考えられた。また、トヨカマイシンを、担癌マウス(骨髄腫細胞受け付けた scid mouse)の系を用いて in vivo の効果を検証したところ、BTZ と同等の抗腫瘍効果が認められた(図3)。以上より XBP1 阻害剤は骨髄腫治療における有望な治療の可能性を有していることが示された。

図1

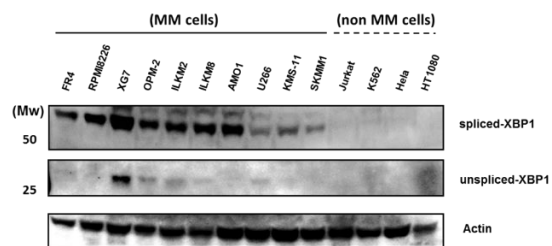


図2

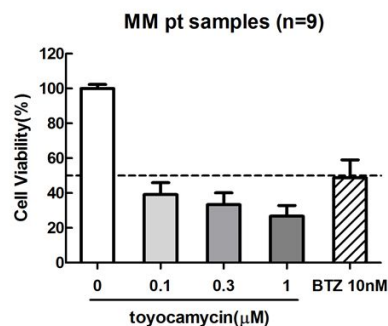
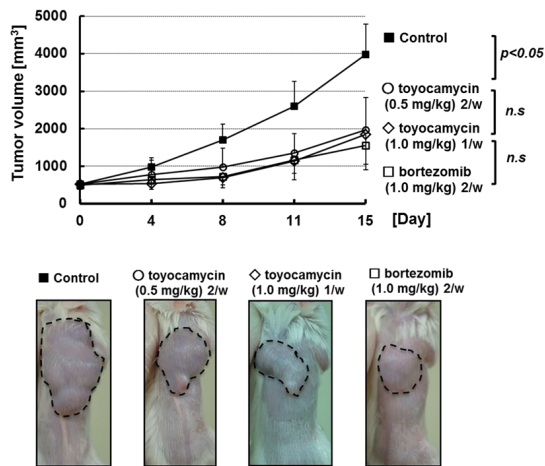


図 3



## 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)

Ri M, Iida S, et al. (他 16 名、1 番目)  
Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.*, 査読有 2;7:e79, 2012 DOI: 10.1038

[学会発表](計 1 件)

How to overcome acquired resistance against novel agents in multiple myeloma; Strategies based on the responsible mechanism for bortezomib resistance

Masaki Ri, Shinsuke Iida  
第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013 年 7 月 26 日 大阪

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 政樹 (RI, MASAKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00567539