

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591409

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における骨髄微小環境の生物学的特性を標的とした新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic approach for multiple myeloma targeted against biological properties of bone marrow microenvironment

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、NF- κ B阻害活性を有する生理活性物質1'-acetoxychavicol acetate (ACA)より、さらに強力な阻害活性を有するTM-233を合成した。TM-233は活性酸素(ROS)を産生し、骨髄腫細胞の細胞死を誘導した。TM-233は、JAK2およびSTAT3をリン酸化するとともに、NF- κ B p65の核への移行を阻害した。さらに、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞における、 β -リング 1、2および5領域を介してプロテアソーム活性を抑制し、細胞死を誘導した。TM-233は骨髄微小環境におけるNF- κ B抑制活性を有し、多発性骨髄腫に対する新たな治療薬になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, new NF- κ B inhibitor TM-233 was synthesized from natural compound 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) having NF- κ B inhibitory activity. TM-233 has more potent NF- κ B inhibitory activity than that of ACA and induced cell death of myeloma cells via production of reactive oxygen species (ROS). TM-233 phosphorylated JAK2 and STAT3 and obstructed the shift to a nucleus of NF- κ B p65. In addition, TM-233 induced cell death of bortezomib-resistant myeloma cells through inhibition of β -ring 1, 2, and 5 in the proteasome. TM-233 may become the new therapeutic agent for the multiple myeloma having potent NF- κ B inhibitory activity in the bone marrow microenvironment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性骨髄腫 分子標的療法 骨髄微小環境 細胞死 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

骨髄を主たる増殖の場とする造血器腫瘍においては、その病態形成や進展に骨髄微小環境の果たす役割は非常に大きいと考えられている。多発性骨髄腫においては、骨髄腫細胞と骨髄微小環境を構成する破骨細胞との共培養系において、VEGF や osteopontin を中和抗体等で阻害することで血管新生や骨の再吸収が阻害されることが知られている。しかしながら、B 細胞の終末分化した形質細胞の腫瘍化である多発性骨髄腫では、骨髄腫幹細胞や骨髄腫ニッチの存在や生物学的な特性および骨髄微小環境が正常とどのように異なっているかなどは不明な点が多い。さらに、急速に進展している幹細胞生物学の研究動向と癌幹細胞を標的にした治療の方向性を考慮すると、骨髄腫幹細胞の生存維持に重要な役割を果たす骨髄微小環境を構成する細胞の中でも骨髄ストローマ細胞に焦点を当て、その生物学的特性を明らかにすることは重要である。

一方、申請者のこれまでの研究は、造血器腫瘍の分子病態に基づく治療法の開発である。その目的は一貫して臨床応用を目指すものであり、これまで新規薬剤の解析システムを構築するために、独自の白血病細胞株の樹立や免疫不全マウスを用いた新たなヒト造血器腫瘍モデルの開発に成功した。これらのシステムを用いて、緑茶成分 EGCG や唐辛子成分カプサイシンが活性酸素 (ROS) による酸化ストレスにより白血病細胞および骨髄腫細胞の細胞死を誘導すること、東南アジアに自生する植物に由来する 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) が NF- κ B 阻害活性を有し、骨髄腫細胞の細胞死を誘導することなど、多くの知見を得てきた。以上の研究の過程で白血病細胞や骨髄腫細胞は活性酸素 (ROS) に感受性を有し、酸化ストレスによる腫瘍細胞の直接的な DNA 損傷が細胞死誘導に重要であることを見いだした。

以上のような背景より、本研究は申請者のこれまでの実績をもとに、いまだ明らかなでない多発性骨髄腫における骨髄微小環境の特性を明らかにし、骨髄腫細胞の増殖制御に必須と考えられる ROS を介する転写因子 NF- κ B に焦点をあて、骨髄微小環境を標的にした新しい概念の治療法を確立することを目指し、研究を開始した。

2. 研究の目的

近年、多発性骨髄腫の分子病態の解明が

進み、骨髄腫細胞の増殖に必須な転写因子 NF- κ B やその転写制御を受ける IL-6 や VEGF、種々の接着因子は骨髄微小環境を構成する骨髄ストローマ細胞から分泌されることが明らかになってきた。最近の幹細胞生物学の進歩により、骨髄腫幹細胞の存在が明らかにされ、骨髄腫幹細胞も骨髄微小環境内のニッチで維持されている可能性が高い。したがって、骨髄腫の治療を目指した治療法を考えた場合、増殖因子の産生分泌および骨髄腫幹細胞の維持に必須な骨髄微小環境を治療のターゲットとして考えることは極めて重要である。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活性酸素 (ROS) による造血器腫瘍細胞の細胞死に関する知見を基に、骨髄腫における骨髄微小環境の生物学的特性をより明確にし、ROS を介する骨髄微小環境を標的にした新たな多発性骨髄腫に対する治療理念を確立することを目的とする。

したがって、本研究は期間内に以下の点を明らかにし、多発性骨髄腫の新たな治療応用へと展開したい。

- 1) 骨髄微小環境としては、多発性骨髄腫における骨髄幹細胞 (BMSC) の生物学的特性と生存に必須な新規液性因子や接着分子を明らかにする。正常 BMSC との生物学的相違を明確にする。
- 2) ROS を介する NF- κ B によるヒト骨髄腫における BMSC の増殖制御を規定するシグナル伝達経路を明確にする。
- 3) ROS 産生能力を有する新規低分子化合物の開発。
- 4) 新規化合物による骨髄腫 BMSC の細胞死誘導の可能性についての検討。
- 5) 骨髄微小環境を認識する抗体の作成と治療応用の可能性についての検討。
- 6) マウス骨髄腫モデルを用いた *in vivo* における骨髄微小環境を標的にした治療モデルの確立。

3. 研究の方法

本研究の骨子は以下の点である。

1. 正常 BMSC との比較による骨髄腫 BMSC の生物学的特性を明らかにする。
2. 骨髄腫 BMSC の増殖シグナルの検討と ROS を介する制御機構の検討。骨髄腫細胞および骨髄腫幹細胞との共培養系を用いた検討。
3. 骨髄腫 BMSC の細胞死誘導を惹起する低分子化合物の探索。
4. 骨髄腫 BMSC を認識する抗体の樹立。

5. マウス骨髄腫モデルを用いた BMSC を標的にした治療応用の可能性検討。

本研究では、幹細胞生物学の進歩により明らかになった造血幹細胞とそれを取り巻く骨髄微小環境の ROS を介する応答に注目し、骨髄腫幹細胞の生存に大きく関与する考えられる骨髄腫における骨髄微小環境の特性を明らかにし、それらを標的にした新たな治療法確立のための基盤研究を行う。これらの研究の実施にあたっては、申請者がこれまでに構築し、多くの成果をあげてきた独自の造血器腫瘍細胞株やマウスモデルを用いるとともに、その過程で得られた知見に基づいて行う

4. 研究成果

平成 24 年度

本研究は、多発性骨髄腫の分子病態をより明確にし、分子基盤に基づく新たな治療法を開発することを目的としている。そのために、骨髄腫細胞の増殖に必須なシグナル伝達分子と骨髄微小環境との相互作用を明らかにし、新たな治療標的を明らかにすることを本年度の目的とした。本年度は骨髄腫細胞の増殖に必須のNF- κ Bを介するシグナルに注目し、その活性を阻害する新たな低分子化合物の作用機構を検討した。われわれは、これまで1'-acetoxychavicol acetate (ACA)がNF- κ B阻害活性を有することを見だし、ACAを構造展開することによりさらに優れた阻害活性を有する種々の誘導体を合成した。その中で、TM-233と名付けた化合物は、種々の骨髄腫細胞株 (U266, RPMI8226) や患者骨髄細胞から得たCD138分画細胞の細胞周期をG1期に停止させ、細胞死を誘導した。TM-233は、細胞死関連タンパクの中で細胞死を抑制するMcl-1の発現を低下させた。Mcl-1の上流に位置する分子としてはSTAT3の脱リン酸化が認められたため、TM-233はJAK/STAT系を介してMcl-1の転写を抑制することで、骨髄腫細胞の細胞死を誘導するものと思われた。さらに、骨髄腫細胞を細胞質分画と核分画に分離し、NF- κ B活性について検討したところ、TM-233は細胞質におけるp65(RelA)/P50の発現を増加させ、核分画での発現を低下させた。したがって、TM-233は細胞質から核へのNF- κ Bの移行を阻害することで、NF- κ B活性を抑制すると考えられた。興味深いことに、TM-233はプロテアソーム阻害薬 bortezomibに耐性となった骨髄腫細胞株の細胞死を誘導し、臨床的にはボルテゾミブ耐性患者への有用性が示唆された。

平成25年度

今年度は、骨髄腫BMSCにおけるNF- κ B活性を検討するとともに、TM-233の効果について検討した。その結果、骨髄腫BMSCではNF- κ B活性が増強していたが、TM-233の効果は明らかでなかった。より生体内に近い環境での検討が必要と考え、骨髄微小環境であるBMSCと骨髄腫細胞の共培養系での解析が必要と考えられた。

臨床的にはボルテゾミブ耐性症例の増加が問題になっている。そこで、骨髄腫細胞株KMSを限界希釈してボルテゾミブ耐性細胞KMS/BTZを樹立した。KMS/BTZは、プロテアソーム β 5-サブユニットに点突然変異を有していたが、TM-233により細胞死が誘導された。また、骨髄腫細胞におけるWnt/ β -catenin経路に関する検討も行った。

平成26年度

本年度は、骨髄腫細胞を骨髄微小環境下に存在すると同等の条件のもとにTM-233の効果について検討した。骨髄微小環境を構成する骨髄ストローマ細胞よりはIL-6、VEGFなどの造血因子が産生されるために、培養系にあらかじめこれらの造血因子を添加した状況下でのTM-233の効果を検討した。このような条件下においても、TM-233は種々の骨髄腫細胞を細胞周期G0/G1期に停止させ、細胞死を誘導した。TM-233はこのような条件下でも、JAK/STAT系を介して細胞死抑制分子Mcl-1を抑制し、さらにNF- κ B活性も低下させた。また、KMS/BTZ細胞を用いた検討においても、TM-233は β -リングにおける β 1, β 2および β 5領域を介してプロテアソーム活性を抑制し、ボルテゾミブとは異なる機序にてNF- κ B活性を阻害することが明らかになった。したがって、TM-233は新たなNF- κ B阻害薬として、今後ボルテゾミブ耐性症例にも効果を示し得る多発性骨髄腫の治療薬として期待される。

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 6 件)

1. Iriuchishima H, Kizaki M, et al. In vivo behavior of multiple myeloma cells and their niche in immunodeficient mice. *PLoS ONE* 7 (2): e30557. 2012 (査読有)
2. Watanabe T, Kizaki M, et al. Phytohemagglutinin-induced *IL2* mRNA in whole blood can predict bortezomib-induced peripheral neuropathy for multiple myeloma patients. *Blood Cancer J* 2013 Oct 4;3:e150.

doi:10.1038/bcj.2013.47. (査読有)

3. Kimura T, Kizaki M, et al. A naphthoquinone compound, shikonin, rapidly induces cell death of human multiple myeloma cells via production of reactive oxygen species. *Int J Myeloma* 4: 13-20, 2014. (査読有)

4. Nakazato T, Kizaki M, et al. Triptolide induces apoptotic cell death of multiple myeloma cells via transcriptional repression of Mcl-1. *Int J Oncol*, 44: 1131-1138, 2014. (査読有)

5. Sadahira K, Kizaki M, et al. Gossypol induces apoptosis in multiple myeloma cells via inhibition of IL-6 signaling with Bcl-2 dephosphorylation and Mcl-1 downregulation. *Int J Oncol* 45: 2278-2286, 2014. (査読有)

6. Sagawa M, Kizaki M, et al. TM-233, a novel analog of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), induces cell death in myeloma cells by inhibiting both JAK/STAT and proteasome activities. *Cancer Sci* 106: 438-446, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. The 3rd JSH International Symposium(平成 24 年 5 月 26 日、川越プリンスホテル、川越市、埼玉県)

Tokuhira M, Watanabe R, Tomikawa T, Sagawa M, Nemoto T, Tabayashi T, Mori S, Kizaki M: The efficacy and safety of the bortezomib maintenance therapy for 31 patients with multiple myeloma.

2. 第 74 回日本血液学会総会(平成 24 年 10 月 19-20 日、京都国際会議場、京都市、京都府)

Sagawa M, Tomokawa T, Nemoto T, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhira M, Misawa T, Hashimoto Y, Iida S, Mori S, Kizaki M: A novel derivative of ACA, TM-233, induces cell death in bortezomib-resistant myeloma cells.

3. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会(平成 24 年 12 月 1 日、京都国際会議場、京都市、京都府)

木崎昌弘:造血器腫瘍に対する分子標的療法の最前線(教育講演)

4. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology(平成 24 年 12 月 8-11 日、Atlanta, USA)

Sagawa M, Tomikawa T, Nemoto, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhira M, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Kizaki M: TM-233, a novel analog of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), induces cell death in human myeloma cells by inhibiting both JAK/STAT and NF- κ B pathways: a possible new agent for overcoming bortezomib-resistance.

5. 14th International Myeloma Workshop(平成 25 年 4 月 3-7 日、京都国際会議場、京都市、京都府)

Tokuhira M, Takezako N, Nakazato T, Sasaki M, Handa T, Ikuta K, Ikezoe T, Matsumoto M, Aotsuka N, Taguchi J, Shimomura S, Chin K, Ichikawa K, Usuki K, Ohyashiki K, Nara M, Kishi K, Kuroda Y, Nakamura Y, Yokoyama A, Kamata H, Ichikawa Y, Hattori Y, Akazawa K, Murakami H, Uchimaru K, Tomoyasu S, Suzuki K, Kizaki M: Interim analysis of clinical trial of MPB followed by bortezomib maintenance therapy for elderly patients with ND-MM.

6. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology(平成 25 年 12 月 7-10 日、New Orleans, USA)

Sagawa M, Tomikawa T, Anan T, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhira M, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Kizaki M: TM-233 Exerts Anti-Myeloma Activity and Overcomes Bortezomib-Resistance In Human Multiple Myeloma Cells By Targeting NF- κ B and JAK/STAT Dual-Signaling Pathways.

7. 日本内科学会東北地方会第 63 回生涯教育講演会(平成 26 年 6 月 21 日、仙台国際センター、仙台市、宮城県)

木崎昌弘:多発性骨髄腫の治療:現状と展望.

8. 第 73 回日本癌学会学術総会(平成 26 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県)

佐川森彦、富川武樹、得平道英、木崎昌弘: Triptolide による Mcl-1 抑制を介した多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果の解析.

9. 第 76 回日本血液学会総会(平成 26 年 10 月 31 日-11 月 2 日、大阪国際会議場、大阪市、大阪府)

多林孝之、佐川森彦、中林千佳、高橋康之、木村勇太、富川武樹、根本朋恵、渡部玲子、得平道英、森茂久、木崎昌弘: Targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway in multiple myeloma.

10. 第 76 回日本血液学会総会(平成 26 年 10 月 31 日-11 月 2 日、大阪国際会議場、大阪市、大阪府)

佐川森彦、仲里朝周、木村勇太、富川武樹、阿南朋恵、多林孝之、渡部玲子、得平道英、木崎昌弘: Triptolide induces apoptotic cell death of myeloma cells via transcriptional repression of Mcl-1.

11. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会(平成 26 年 11 月 24-26 日、福岡国際会議場、福岡市、福岡県)

木崎昌弘:多発性骨髄腫の診断・治療の進歩と臨床検査の果たす役割(シンポジウム:造血器腫瘍の先端医療を支える臨床検査)

12. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology(平成26年12月6-9日, San Francisco, USA)

Tabayashi T, Takahashi T, Kimura Y, Tomikawa T, Sagawa M, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Mori S, Kizaki M: Targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway in multiple myeloma: A possible new therapeutic approach to overcome bortezomib-resistance.

〔図書〕(計 7 件)

1. 木崎昌弘: 多発性骨髄腫に対する治療の進め方と治療方針。木崎昌弘(編) 多発性骨髄腫マニュアル。南江堂、東京、pp94-101, 2012.
2. 得平道英、木崎昌弘: 再発難治骨髄腫の治療方針。金倉謙、木崎昌弘、鈴木律朗、神田善伸(編集)EBM 血液疾患の治療 2013-2014、中外医学社、東京、pp381-387, 2012.
3. 木崎昌弘(編) 造血器腫瘍とエピジェネティクス-治療応用と新たな展開- 医薬ジャーナル社、大阪、2012
4. 木崎昌弘: 骨髄腫腎の新たな治療展開。富野康日己、柏原直樹、成田一衛(編集)Annual Review 腎臓 2013、中外医学社、東京、pp282-289, 2013.
5. 得平道英、木崎昌弘: 再発の定義と再発例の治療目標-病期の進展に伴うダーウィンのクローン選択をふまえて- 清水一之(編集委員長): 多発性骨髄腫 Updating, 第3巻 多発性骨髄腫の治療目標。医薬ジャーナル社、大阪、pp120-125, 2013.
6. 得平道英、木崎昌弘: 高齢者骨髄腫における初回治療。リンパ腫・骨髄腫の最新療法: プリンシプル血液疾患の臨床。中山書店、pp293-302, 2014.
7. 木崎昌弘: 免疫調節薬 Pomalidomide。清水一之(編集委員長) 多発性骨髄腫 Updating 第7巻: 再発・難治性多発性骨髄腫の治療。医薬ジャーナル社、大阪、pp140-149, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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) 研究分担者
()
研究者番号:
- (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