

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

生理活性物質をリード化合物とする構造展開による
多発性骨髄腫の新規分子標的薬の開発

研究代表者 佐川 森彦（総合医療センター 血液内科）

研究分担者 木崎 昌弘^{*}，得平 道英^{*}，根本 朋恵^{*}，富川 武樹^{*}

緒 言

多発性骨髄腫は、高齢者に多いB細胞性リンパ系腫瘍の一つであり、現状では治癒の期待出来ない難治性の予後不良の造血器腫瘍である。高齢化社会を迎え、今後ますます患者数は増加することが予測され、治癒を目指した治療法の確立が望まれている。多発性骨髄腫の標準的治療は化学療法であるが、現状では一時的に病勢の沈静化がもたらされるものの、治癒に至る患者は稀である。進行は緩徐であるが10年以上の長期生存は極めて稀で、多くの患者は寛解と再発・再燃を繰り返しながら、最終的には治療抵抗性となって死亡する。加えて、貧血、腎障害、骨病変などの合併症を高頻度に併発するため、高齢の患者では生活の質（QOL）が著しく損なわれる事も大きな問題である。近年、自家及び同種造血幹細胞移植による治療が施行されてはいるものの、対象患者が高齢であることや、適切なドナーが存在しないことなどにより、実際には造血幹細胞移植の適応にならないことが多く、更に同種造血幹細胞移植は、現状ではまだ実験的治療の域を出ていない。最近、多発性骨髄腫の分子病態に基づいて、血管新生阻害作用を有するとされるサリドマイド、プロテアソーム阻害作用を有するとされるボルテゾミブ、更にはサリドマイド誘導体であるレナリドマイドなど新規薬剤による治療法が導入され、治療成績は向上しているが、治療効果は一過性であり、これらの新しい治療薬を用いても、未だに生存率を延長し、治癒を望むことは困難である。したがって、高齢化社会の到来ともあわせて、多発性骨髄腫の患者が増加している現在、高齢者にも適応可能な、生体への侵襲が少なく、抗がん剤治療、移植治療に変わる全く新しい概念の治療法の開発が切望されている。

われわれは東京大学分子生物学研究所有機化学

^{*}総合医療センター 血液内科

研究部門 橋本祐一博士の協力のもと、これまでにサリドマイドの薬理作用から多くの薬物標的を仮想して構造展開することにより、当該の薬物標的に対する特異的な医薬リード化合物を多数創製できる可能性を検証し、新規微小管重合阻害薬2-(2,6-Diisopropylphenyl)-5-hydroxy-1H-isoindole-1,3-dione (5HPP-33) が多発性骨髄腫の新規治療薬となりうることを明らかにした (Iguchi T, et al. Int J Mol Med 2008;21:163-8/ Noguchi T, et al. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:321-5)。

このような背景の中で、京都大学大学院農学研究科 村上明博士より供与された生理活性物質1'-Acetoxychavicol acetate (ACA) は、東南アジアに自生するショウガ科植物 *Languas galanga* に由来する成分であり、われわれはこれまでACAが急性骨髄性白血病に対し、ミトコンドリア経路及びFas経路を介してアポトーシスを誘導すること (Ito K, et al. Clin Cancer Res 2004;10:2120-30)、多発性骨髄腫に対し *in vitro* および *in vivo* でNF- κ Bの核内移動を抑制することでアポトーシスを誘導すること (Ito K, et al. Cancer Res 2005;65:4417-24)、及びTRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) の活性化を介してアポトーシスを誘導すること (Ito K, et al. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:1702-10)などを明らかにしてきた。

これらの研究結果に基づき、橋本祐一博士の協力のもと、われわれはACAをリード化合物として構造展開することで得られた、種々の化合物の構造と生物学的活性の相関を検証し、造血器腫瘍の新規治療薬として用いることを検討している。すでに、急性白血病に対しては、我々はACAを展開して得られた化合物の数種が増殖抑制効果を示すことを明らかにした (Misawa T, et al. Chem Pharm Bull 2008;56:1490-5)。本研究は、これまでに得られた豊富な科学的研究成果を基に、ACAを骨格に構造展開し得られた化合物を用い、

多発性骨髄腫の分子病態に即した新規治療薬を開発し、実際の臨床応用を目指した基礎検討を目的とする。

材料と方法

1. 候補化合物の作製, 調整

ACAをリード化合物として構造展開し得られた種々の化合物は、東京大学分子生物学研究所有機化学研究部門 橋本祐一博士より、すでに同研究室で報告された候補物質 (Misawa T, et al. Chem Pharm Bull 2008;56:1490-5) より、白血病細胞 HL-60 においてより低濃度での抗腫瘍効果が認められた TM-233 を選択した。

2. 骨髄腫細胞の調整

U266, RPMI8226, OPM2, MM-1S などの骨髄腫細胞株は ATCC から入手し、10% FCS 添加 RPMI1640 培地にて培養した。更に、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株である KMS-11/BTZ, OPM-2/BTZ を名古屋市立大学大学院医学研究科腫瘍・免疫内科学分野及び協和発酵キリン株式会社との共同研究により入手し (Ri M, et al. Leukemia 2010;24:1506-12), 同様の条件下で培養を行った。

3. 候補化合物の *in vitro* における効果, 体内動態の解析

ACA を構造展開して得られた化合物の骨髄腫細胞に対する効果を検討した。MTS アッセイ, 細胞周期解析に加え, Annexin-V 法, Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) などを用いて, アポトーシス誘導について詳細に検討した。さらに, アポトーシス誘導機構を分子生物学的に解析し, 骨髄腫細胞に対する増殖抑制におけるシグナル伝達機構, 特に候補化合物の NF- κ B や IL-6 (JAK/STAT) など骨髄腫の増殖制御に関係する種々のシグナルに対する作用を ELISA 法や Western blot 法を用いて検討した。

また, ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株に対する解析も同様にを行い, 特に耐性株に特異的なシグナル伝達機構について解析を行い, 耐性克服のメカニズムについ

ての検討を行った。

結果

1. 各種骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討

U266, RPMI8226, OPM2, MM-1S 細胞における TM-233 の抗腫瘍効果を図 1 に示す。各細胞にて ACA と比較して, TM-233 はより低濃度でより細胞増殖抑制を認めた。続いて, 増殖抑制がアポトーシスであるか否かについて検討し, Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH), Giemsa 染色による形態, Western blot 法において, アポトーシスの像が認められた。

2. 抗腫瘍メカニズムの解析

多発性骨髄腫の増殖・分化において重要なメカニズムとされる JAK/STAT 経路が, TM-233 による抗腫瘍メカニズムに関連しているか否かを解析した。図 2 の通り, Western blot 法による解析にて, JAK2 及び STAT3 の蛋白発現低下を認めた。興味深いことに JAK2/STAT3 下流の分子のうち, mcl-1 の発現が低下したものの, 同様の分子である bcl-2 及び bcl-xL は発現の変化が認められなかった。免疫沈降法などによる更なる解析が必要であるものの, JAK2/STAT3 に加えて下流の mcl-1 の関与が考えられた。

また, NF- κ B の関連について ELISA 法を用いて解析し, TM-233 は ACA と比較しても, 少なくとも同等なレベルで NF- κ B の活性を抑制した。

3. Bortezomib 耐性細胞株への効果

名古屋市立大学腫瘍免疫内科 飯田真介先生, 李政樹先生らが樹立した bortezomib 耐性骨髄腫細胞株 KMS-11/BTZ 及び OPM2/BTZ をご供与頂き, TM-233 の耐性株への効果を検討した。

図 3 の通り, 耐性株では TM-233 に対する抗腫瘍効果が得られただけでなく, Bortezomib との併用で, 相加効果が得られ, bortezomib 耐性を回避出来る可能性が示唆された。

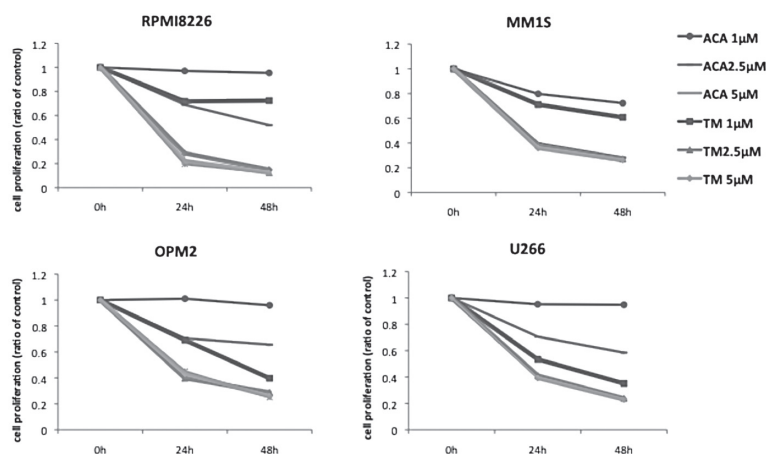


図 1.

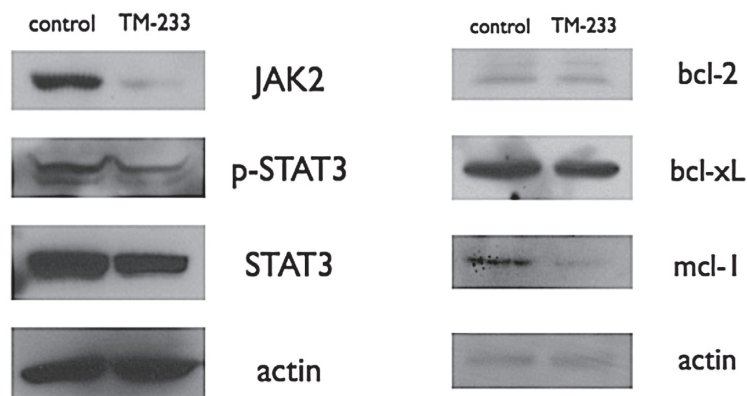


図 2.

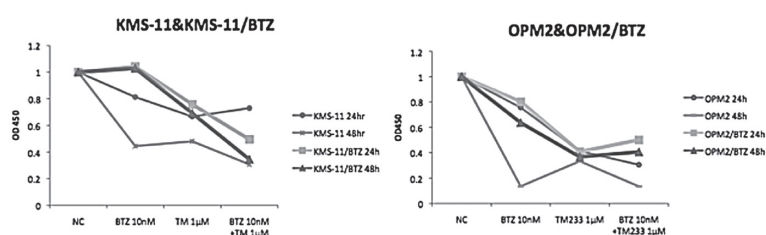


図 3.

考 察

TM-233は多発性骨髄腫細胞株に対し、比較的低濃度で抗腫瘍効果を得ることの出来る有効な薬剤と考えられ、その抗腫瘍分子メカニズムについても、精査の余地はあるものの、JAK2/STAT3/mcl-1経路の阻害並びにNF- κ B活性阻害が関連していることが示唆された。また、bortezomib耐性機構の克服も期待される。

今後、多発性骨髄腫患者検体を用いて、TM-233の抗腫瘍効果並びに抗腫瘍メカニズムの検討を行い、検討する必要があると考えられた(埼玉医科大学倫理

委員会 申請番号627)。更に、多発性骨髄腫の*in vivo*モデルは構築が困難な系であるが、TM-233の抗腫瘍効果を検討していきたい。

研究成果リスト

- 1) Sagawa M, Tomikawa T, Nemoto T, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhiro M, Misawa T, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Mori S, and Kizaki M. A novel analog of ACA, TM-233, induced cell death on bortezomib-resistant myeloma cells, 日本血液学会学術集会, 2012年10月21日, 京都(予定)