

17-17 多発性骨髄腫の発症と進展に関与する分子基盤の解明と新規分子標的療法の確立に関する研究

主任研究者 公立大学法人名古屋市立大学 飯田 真介

研究成果の要旨

多発性骨髄腫の分子病態としては、難治病型であるFGFR3発現骨髄腫においては恒常的に活性化されたERK1/2によるstat3セリン残基のリン酸化がIL-6シグナルを増強している事、large Maf発現骨髄腫はArk5の転写活性化を介して組織浸潤能や飢餓耐性を獲得している事、増殖能の高いCD45陽性未熟骨髄腫細胞は、Lyn-PLC γ 2-PKC活性化と細胞内Ca²⁺の増加が生じておりVDAC1発現増強によりストレス刺激で逆に細胞死を起こしやすい事を明らかにした。また恒常的な活性化NF- κ Bを治療標的としたIKK阻害剤(ACHP)の有効性を示すとともに、天然物由来生理活性物質である1'-acetoxychavicol acetate(ACA)がカスパーゼ活性化を介して骨髄腫細胞死を誘導する事を示した。また骨髄腫細胞由来のVEGFに加えて破骨細胞からOPNが分泌され血管新生を促している事、骨髄腫細胞はMIP-1 α やRANKLなどの破骨細胞活性化因子のみでなくsFRP-2などの骨芽細胞分化抑制因子を分泌している事を見いだした。骨再生療法としてTGF- β 阻害薬の骨芽細胞の石灰化促進効果を確認した。さらにボルテゾミブ(Bor)と他剤との併用効果を検討し、Bor投与後のデキサメサゾン(Dexa)投与、BorとHDAC阻害剤SAHAとの同時併用により相乗的効果が得られる事を示した。またJCOGリンパ腫グループと共同でBorとDexa併用療法のコンセプトの作成を開始した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
飯田 真介	公立大学法人名古屋市立大学 講師	総括と分子基盤に基づく至適治療法開発
石川 秀明	山口大学大学院 助教授	骨髄腫細胞のシグナル伝達異常解明と治療法開発
木崎 昌弘	慶応大学医学部 講師	骨髄腫に対する新規分子標的療法の開発
安倍 正博	徳島大学大学院 講師	骨破壊病変の発症機序の解明と治療法の開発
渡辺 隆	国立がんセンター中央病院 医長	分子標的薬物療法の併用療法に関する前臨床的検討
大間知 謙	東海大学医学部 助手	Velcade 臨床試験、併用療法および初発例

研究報告

1 研究目的

多発性骨髄腫は形質芽細胞に由来する難治性造血器腫瘍であり生存期間中央値は約3年半である。骨病変や腎障害、アミロイドーシスなどを含む臨床病態は多様であり予後も症例により様々である。本研究班ではこれらの不均一な病型から成る疾患の分子病態と臨床的特徴を明らかにするとともに、それぞれの病型に適した治療法を開発することを目的とする。

平成17年度の具体的な研究計画は、1) 染色体転座関連遺伝子発現定量解析に基づく骨髄腫の病型分類を確立し多施設共同臨床研究の附随研究として実施計画し臨床病態との関連を明らかにする(飯田、全員)、2) 難治性骨髄腫の分子病態と治療標的を明らかにする(飯田、石川)、3) 骨髄腫前駆細胞におけるCD45分子とその下流シグナルの解析から増殖分画および静止分画にある前駆細胞に

対する治療法を見いだす（石川）、4) NF- κ B 抑制活性を有する植物由来成分や新規サリドマイド誘導体の抗骨髄腫効果と治療標的分子を明らかにし前臨床モデルで検証する（木崎、飯田）、5) 骨髄腫細胞の破骨細胞活性化および骨芽細胞抑制機序を明らかにし溶骨病変に対する治療法を開発する（安倍）、6) 今後の骨髄腫治療の中心的役割を成すと考えられるボルテゾミブとその他の分子標的薬剤との至適併用療法を開発する（渡辺）。7) ボルテゾミブを含む再発難治性骨髄腫（新規発症例）を対象とした JCOG における多施設共同臨床試験のプロトコル・コンセプトを作成する（大間知、渡辺、飯田）。

2 研究方法

1) 細胞株を用いた病態解析：多発性骨髄腫細胞株および遺伝子導入の可能な成熟 B 細胞株を用いて検討を行った。Reverse-transcription(RT)-polymerase chain reaction(PCR)法、定量 PCR 法、cDNA アレイ解析などの分子生物学的解析に加えてウェスタン解析、燐酸化抗体を用いた燐酸化蛋白の同定、免疫沈降法などの蛋白質解析法を用いた。また一過性もしくは安定遺伝子導入株を用いた生物学的機能の解析やレポーター・アッセイによるプロモーター解析を行った。また細胞周期解析やアポトーシス解析、ミトコンドリア膜電位、細胞表面抗原の発現解析には主に Flow cytometry を用いた。NF- κ B 活性の測定は主にゲルシフト法を用いて解析した。Caspase の活性化はウェスタンブロット法を用いた。培養上清中の VEGF, IL-6, OPN などの測定には ELISA 法を用いた。血管新生誘導能についてはクラボウ社の血管新生キットを用いた。また骨芽細胞はマウスの MC3T3-E1 細胞株や新生児マウス頭蓋冠から採取した骨芽細胞を分化させて使用した。破骨細胞形成活性には家兎骨髄培養系を用いて検討した。また bortezomib と他剤の併用投与の効果に関しては CalcuSyn ソフトウェアを用いた isoborogram 解析を使用した。

2) 患者骨髄由来の骨髄腫細胞は患者骨髄単核細胞を抗 CD138 抗体付着ビーズと AutoMACS を用いて 90% 以上の純度に純化して使用した。また患者血清中の IL-6, IFN- γ などのサイトカイン値測定は ELISA 法を用いた。

3) ボルテゾミブを用いた併用療法の臨床試験のコンセプトデザインの検討は班会議の場で議論するとともに JCOG リンパ腫グループのメーリングリストを用いて議論を重ねた。

3 研究成果

1) 染色体転座関連遺伝子発現定量解析による骨髄腫の病型分類の確立（飯田）：多発性骨髄腫の発症初期の遺伝子異常でありこれまでも臨床病態や化学療法に対する反応性との相関が報告されている主要な染色体転座関連遺伝子である CCND1, FGFR3 & MMS1, c-MAF, MAFB, c-MYC, MUM1 遺伝子 mRNA 発現の定量 RT-PCR 法を確立した。我々は日常臨床の範囲で可能な検査とするために骨髄液 1mL から抗 CD138 抗体ビーズを用いて患者形質細胞を 90% 以上に純化しこれらの転座関連遺伝子発現検査を行うシステムを確立した。今後臨床研究の付随研究として行うためにさらなる簡素化を進めており、名古屋市立大学医学部・遺伝子倫理審査委員会で承認を得た後、患者様より文書による同意を得て臨床病態との関連につき検討を進めている。

2) 難治性骨髄腫の分子病態と治療標的の探索（飯田、石川）：我々は 65 歳以下の骨髄腫に対する標準療法とされている大量 L-PAM 療法にも耐性を示すとされている FGFR3 発現型骨髄腫および large Maf 発現型骨髄腫の分子病態解析を行った。石川らは、FGFR3 発現型骨髄腫株である KMS11 においては IL-6 または FGF 単独投与時には細胞増殖は認められないが、IL-6 と同時に FGF を投与すると細胞増殖促進効果が認められる事に着目した。IL-6 により stat3 が燐酸化され、FGF により ERK1/2, PI3-K, p70S6kinase の活性化を認めた。また FGF 刺激により MEK1/2 を介して stat3 のセリン残基が燐酸化され IL-6 による stat3 を介した c-Myc や Bcl2 の転写を促進し KMS11 細胞の増殖を増強している事が明らかになった。したがって FGFR3 受容体シグナルの遮断が増殖抑制に有用である可能性を示した。また飯田は、c-Maf あるいは MafB を発現する骨髄腫細胞株においては組織浸潤促進因子あるいは細胞飢餓状態での細胞死を抑制するセリン・スレオニンキナーゼである Ark5 の発現が認められる事に着目した。実際に ARK5 プロモーターに 2 箇所存在する MARE 配列に large Maf 転写制御因子が直接結合し ARK5 を転写制御している事を証明した。また Ark5 を発現した骨髄腫細胞では IGF-1 投与下で Akt1 の燐酸化を介してマトリゲル浸潤能が著明に促進されるとともにグルコース飢餓や TRAIL を介した細胞死に耐性となることを見いだした。またこれらの飢餓耐性には Ark5 の上流の燐酸化酵素である Akt と Ndr2 の両方が必要である事を B 細胞株 P3HR-1 細胞への遺伝子導入実験を行い証明した。したがって large Maf 発現型骨髄腫の分子標的療法として Ark5 阻害剤の開発が有望である事を示した。

3) 骨髄腫前駆細胞における CD45 分子発現の意義（石

川) : 未熟骨髄腫細胞の中で IL-6 に反応して増殖能を有する細胞分画は CD45 陽性であり CD45 分子とリンクした Lyn の活性化が重要である。今回その下流にあり増殖に結びつく細胞内シグナルとして PLC- γ 2 と Ca イオンの増加がありそれらを介して PKC の活性化が生じる事を明らかにした。また興味深いことにこれらの増殖の盛んな CD45 陽性骨髄腫細胞は血清除去、紫外線、熱処理、酸化ストレス、小胞体ストレスなどの存在で容易に細胞死を起こす事が明らかになった。その原因を明らかにする目的で cDNA アレイ解析を行った所、CD45 陽性細胞では VDAC-1 の発現が増強しておりミトコンドリア膜電位の消失が容易に誘導されることが証明された。したがって骨髄腫の再発進展時には CD45 陽性未熟骨髄腫細胞が増加する事が知られているが、その治療法として細胞内 ROS を上昇させるような治療薬が有用である可能性が示された。

4) NF- κ B 阻害活性を有する新規薬剤の抗骨髄腫効果の検討(木崎、飯田) : 飯田らは骨髄腫細胞株における NF- κ B の活性化状態を検討した結果、I κ B α と p65 のセリン残基の恒常的活性化を認め EMSA 法でも恒常的な DNA 結合活性が認められた。そこで IKK 特異的阻害剤である AHP の効果について検討した。AHP は I κ B α と p65 の磷酸化を阻害し NF- κ B 標的遺伝子発現を低下させ細胞周期の停止と細胞死誘導効果を示した。しかし臨床的に達成できる 1 μ M 程度の低濃度では VEGF や IL-6 の発現は抑制されたものの cyclinD1 やアポトーシス抑制遺伝子発現は認められなかった。この結果は骨髄腫細胞の細胞死誘導の目的では IKK β の阻害だけでは十分ではなく IKK α を介した canonical pathway の抑制も必要である事が示された。木崎らは、天然物由来生理活性物質である NF- κ B 阻害剤である 1-acetoxychavicol acetate (ACA) には 3-5 μ M 程度で骨髄腫細胞の細胞死誘導活性があることを見いだした。ACA には I κ B の磷酸化と分解を阻害するだけではなく、caspase-3, 8, 9 を活性化する作用のあることが明らかになった。また ACA は NOD/SCID マウスへの RPMI8226 細胞の異種移植マウスを用いた検討でも腫瘍の縮小効果を有していた。現在 ACA の誘導体を作成中であり臨床応用可能な薬剤開発を進めている。また木崎らは catechin 誘導体である EGCG が骨髄腫細胞内 ROS 産生を介してミトコンドリア膜電位を低下させ細胞死を引き起こす事、そしてサリドマイドの構造展開により得られた誘導体 5HPP-33 に骨髄腫細胞の増殖抑制と細胞死誘導効果があることを見いだした。また飯田は、抗骨髄腫効果のスクリーニング中に CPT-11 が全ての骨髄腫細胞株に対して

低濃度で細胞死を誘導しうる事を見いだした。CPT-11 の活性体である SN-38 も同様に有効であることを示し、その有効性は正常形質細胞および骨髄腫細胞が恒常的に topoisomerase I を発現するとともに CPT-11 の細胞内活性化酵素である carboxyesterase-2 (CE-2) を高発現している事に起因している事を発見した。現在 SCID マウスを用いた in vivo での効果について検討中である。

5) 骨髄腫細胞の破骨細胞活性化および骨芽細胞抑制機序の解明と新規治療法の開発(安倍) : 骨髄腫の進展に血管新生が重要であるが、骨髄内微少環境においては血管新生促進因子として骨髄腫細胞から分泌される VEGF に加えて骨髄腫細胞の生存・増殖を支持している破骨細胞から産生されるオステオポンチン (OPN) も重要であることを見いだした。また VEGF, OPN で刺激された血管内皮細胞は破骨細胞形成促進活性を有することも明らかにした。また骨髄腫においては骨形成が著明に抑制されている。その原因としてこれまで報告されていた DKK-1 に加えて未熟な骨髄腫細胞から分泌される secreted frizzled-related protein (sFRP-2) が canonical Wnt 経路を阻害して骨芽細胞の分化を抑制している事を明らかにした。しかし治療標的として Wnt を活性化することは骨髄腫細胞の増殖を引き起こす可能性が示唆されている。そこで骨芽細胞の最終分化と石灰化を抑制している事が知られている TGF- β に着目した。BMP-2 による骨芽細胞の石灰化誘導は TGF- β により著明に抑制される。そこで TGF- β 受容体阻害薬である SB431542 を添加すると骨芽細胞の石灰化が骨髄腫細胞の上清を添加していない時のレベルまで回復する事を見いだした。さらに石灰化の促進された骨芽細胞は骨髄腫細胞の増殖も抑制する事が示された。すなわち BMP-2 と TGF- β 受容体阻害薬の併用療法は骨髄腫患者の骨量回復に有用である可能性が示された。

6) ボルテゾミブを含む至適併用療法の開発(渡辺) : 今後の骨髄腫治療において重要な位置を占める 26S プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ (Bor) と臨床的に有用性が示されているデキサメサゾン (Dexa) ならびに今後臨床に登場してくる事が期待されるヒストン脱アセチル化阻害剤である SAHA との至適併用療法について in vitro で検討した。Bor+Dexa の併用においては、同時投与では相加効果は得られなかったが、bor 投与後 24 時間後に Dexa を投与すると isoborogram での検討で明らかな相乗効果が得られる事が判明した。これは Dexa 感受性株、耐性株ともに同様の結果が得られた。次に Bor+SAHA の併用投与では、最も相乗効果が得られたのは同時投与を行

った場合であった。また本邦での臨床治験において Bor 投与後に著しい発熱を有する症例が経験されたが、渡辺らはこれらの患者血清中の IL-6 や IFN- γ が高値を示していた事を見いだした。そこで骨髄腫細胞株と健常者由来の骨髄ストローマ細胞株である LP101 を共培養して Bor を添加すると IL-6 濃度が著明に上昇することを明らかにした。IL-6 は骨髄腫細胞株単独では上昇せず単球由来の骨髄ストローマ細胞が Bor 投与に伴う発熱に関与している事を明らかにした。

7) ボルテゾミブを含む再発・難治性骨髄腫を対象とした日本臨床腫瘍グループ (JCOG) における多施設共同臨床試験のプロトコール・コンセプトの作成 (大間知、渡辺、飯田) : 現在本邦における臨床治験を終了し適応承認申請中であるボルテゾミブを用いた併用療法の JCOG 臨床試験デザインについて検討した。適応承認が再発・難治性骨髄腫となる見込みであること、そして自己輸入でボルテゾミブを用いた患者様において欧米では稀な重篤な肺障害が報告されていることを鑑みて Bor+Dexa 併用での再発・難治性骨髄腫に対する臨床第 2 相試験を計画し本邦での効果と安全性を確認することとなった。現在詳細を検討しコンセプトを作成中である。またこの臨床試験には 1) で述べた染色体転座関連原癌遺伝子発現による病型検査を取り入れて病型毎の臨床病態、Bor 反応性、予後についても検討を進め将来の層別化治療に向けた基礎的データを収集する予定である。

4 倫理面への配慮

本研究において臨床検体、すなわち患者様より末梢血、骨髄などから腫瘍細胞の一部を研究用に御提供いただく場合には、ヘルシンキ宣言にのっとり施設倫理委員会や遺伝子倫理審査委員会で承認を受けた研究計画書と説明同意文書を用いて患者様自身に対して十分な研究内容の説明を行った後に、文書によるご本人の同意を得て行い、研究結果については匿名化して公表し決して個人が同定される事のないように配慮して行った。またマウスを用いた前臨床的研究は動物愛護の精神に則り施設実験動物研究センターでの研究計画の承認を得て行っている。また JCOG 臨床試験のコンセプトは JCOG プロトコール審査委員会での審議を経て JCOG 運営委員会での承認を経てからフルプロトコール作成に取りかかる予定である。また各施設毎の臨床試験研究計画書と説明同意文書は必ず各施設の Institutional Review Board (IRB) での審査・承認後に開始する事としているが、平成 17 年度はまだ臨床試験まで到達した新規治療研究は無かった。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Sanda, T., Iida, S., et al., Anti-tumor effect of a novel IKK- β inhibitor on multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 11:1974-82, 2005.
2. Sanda, T., Iida, S., et al., Anti-myeloma effect of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia*, 19: 901-9, 2005.
3. Suzuki, A., Iida, S., et al., Ark5 is transcriptionally regulated by the large-Maf family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: Ark5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene*, 24: 6936-44, 2005.
4. Tajima, E., Iida, S., et al., Global real-time quantification/reverse transcription-polymerase chain reaction detecting prototocogenes associated with 14q32 chromosomal translocation in multiple myeloma. *Haematologica*, 90: 559-62, 2005.
5. Uranishi, M., Iida, S., et al., Multiple myeloma oncogene 1(MUM1)/Interferon regulatory factor 4(IRF4) upregulates monokine induced by interferon-gamma(MIG) gene expression in B-cell malignancy. *Leukemia* 19: 1471-8, 2005.
6. Shimazaki, C., Iida, S., et al., Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma: results from the Japan myeloma study group. *Int J Hematol*, 81: 342-8, 2005.
7. Li, F.-J., Ishikawa, H., et al., A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in myeloma. *Blood*, 105:3295-302, 2005.
8. Ma, Z., Ishikawa, H., et al., Baicalein, a component of *Scutellaria Radix*, identified from Huang-Liang-Jie-Du-Tang (HLJDT) leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood*, 105:3312-8, 2005.
9. Liu, S., Ishikawa, H., et al., Dehydroepiandrosterone can inhibit the

- proliferation of myeloma cells and the interleukin-6 production of bone marrow mononuclear cells from patients with myeloma. *Cancer Res*, 65:2269-76, 2005.
10. Ishikawa, H., et al., Accelerated proliferation of myeloma cells by interleukin-6 co-operating with fibroblast growth factor receptor 2-mediated signals. *Oncogene* 24:6328-32, 2005.
 11. Liu, S., Ishikawa, H., et al., Increased susceptibility to apoptosis in CD45⁺ myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* 25:419-29, 2006.
 12. Inatsuki, S., Kizaki, M., et al., Tubulin-polymerization inhibitors derived from thalidomide. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 15: 321-5, 2005.
 13. Aisa, Y., Kizaki, M., et al., Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by the activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am J Hematol* 78 (1): 7-14, 2005.
 14. Ito, K., Kizaki, M., et al., 1'-Acetoxychavicol acetate is a novel nuclear factor B inhibitor with significant activity against multiple myeloma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 65:4417-4424, 2005.
 15. Nakazato, T., Kizaki, M., et al., A green tea component, catechin, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species(ROS) production *in vitro* and *in vivo*. *Haematologica* 90: 317-25, 2005.
 16. Ito, K., Kizaki, M., et al., 1'-Acetoxychavicol acetate induces apoptosis of myeloma cells via induction of TRAIL. *BBRC* 338: 1702-10, 2005.
 17. Shibata, H., Abe, M., et al., Malignant B-lymphoid cells with bone lesions express receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and vascular endothelial growth factor to enhance osteoclastogenesis. *Clin Cancer Res*. 11(17):6109-6115, 2005.
 18. Jalili, A., Abe, M., et al., Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral blood stem cell harvests in patients with multiple myeloma. *Blood*. 106(10):3538-3545, 2005.
 19. Oshima, T., Abe, M., et al., Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*. 106:3160-3165, 2005.
 20. Abe, M., et al., BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells; a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia*, in press.
 21. Matsumoto, T., Abe, M. The importance of notch signaling in myeloma cell-osteoclast interactions. *BoneKEy-Osteovision*, 2: 7-10, 2005.
 23. Ding, J., Abe, M., Cyclooxygenase isozymes are expressed in human myeloma cells but not involved in anti-proliferative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Mol Carcinogenesis* Dec 30, 2005. (Euqib ahead of print)
 24. Sakiyama, S., Abe, M., et al., Extramedullary plasmacytoma immunoglobulin D(lambda) in the chest wall and the subglottic region. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 129: 1168-9, 2005.
 25. Kouno, T., Watanabe, T., et al., CD56-positive Small Round Cell Tumor: Osseous Plasmacytoma Manifested in Osteolytic Tumors of the Iliac Bone and Femora, *J Clin Oncol*, 35 : 90-93, 2005.
- 日本語論文
1. 飯田真介 多発性骨髄腫の分子病態-その分子標的療法の可能性 *Medical Practice* 22: 1375-7, 2005.
 2. 飯田真介 骨髄腫細胞は形質細胞とどこがちがうのか? 分子異常・発現からみて 分子細胞治療 4 : 11-9, 2005.
 3. 飯田真介 多発性骨髄腫の発症機序はどこまで解明されたか *臨床医* 31 : 1993-6, 2005.
 4. 飯田真介 多発性骨髄腫 造血器腫瘍の治療 update-evidence に基づく治療戦略 *血液・腫瘍科* 52: 79-88, 2006.
 5. 三田貴臣、飯田真介 多発性骨髄腫に対する新規分子標的療法 *血液・腫瘍科* 51: 45-54, 2005.
 6. 花村一朗、飯田真介 多発性骨髄腫の発症と進展の分子機構 *血液・腫瘍科* 50: 341-351, 2005.