

# 多発性骨髄腫に対する骨髓微小環境の影響に基づく新しい治療法の開発

林 敏昭 [札幌医科大学医学部第一内科／研究生]

## 背景・目的

多発性骨髄腫(MM)は従来の腫瘍細胞のみを治療対象とした化学療法では治癒させることが困難である。その原因のひとつとして、骨髓微小環境における腫瘍細胞増殖促進、ならびに、アポトーシスからの保護作用が知られており、そこにはインターロイキン-6(IL-6)の関与が想定されている。MMにおいて、患者由来の骨髓ストローマ細胞(BMSC)は健常人由来のBMSCよりも多くのTGF- $\beta$ 1を産生し、BMSCのTGF- $\beta$ 1とIL-6分泌には相関があることが知られている。本研究では骨髓微小環境に作用するサイトカインのうちTGF- $\beta$ 1に着目し骨髓微小環境における機能を評価し、さらに、TGF $\beta$ 受容体Iキナーゼ阻害剤(SD-208)の有効性を検討する。

## 内容・方法

### 1) SD-208の抗腫瘍効果の検討

多発性骨髄腫細胞をさまざまな濃度のSD-208存在下で培養し殺細胞効果をMTT法にて評価する。同様にBMSCあるいは正常リンパ球をSD-208存在下で培養し、正常細胞に対する毒性を評価する。

### 2) BMSCのサイトカイン産生に対するTGF- $\beta$ 1の影響とSD-208の効果の検討

多発性骨髄腫患者由来BMSCをSD-208存在あるいは非存在下でMM患者骨髄中に相当する濃度のTGF- $\beta$ 1で刺激し、各種サイトカインの産生をサイトカインアレイにより検討する。また、骨髄腫細胞の増殖と薬剤耐性に大きな役割を果たすIL-6とVEGFについて、BMSCからの産生抑制メカニズムをELISA法、Western blot法、蛍光免疫組織染色法により検討する。

### 3) 骨髓微小環境におけるTGF- $\beta$ の影響とSD-208の効果の検討

骨髄腫細胞とBMSCを共培養し上清中のサイトカイン濃度、細胞増殖をELISA、 $^3$ Hサイミジン取り込み法によりSD-208添加／非添加時に比較測定する。

## 結果・成果

### 1) SD-208はBMSCからのIL-6とVEGFの産生を抑制する

BMSCからのサイトカイン産生に対するTGF- $\beta$ 1の影響をサイトカインアレイにより検討したところ、IL-6、VEGFとMCP-1の産生が増加することを見出した。また、TGF- $\beta$ 1阻害剤SD-208はこのTGF- $\beta$ 1の作用を用量依存的に阻害した。さらに、TGF- $\beta$ 1刺激を受けたBMSCにおけるSD-208のIL-6とVEGFの転写に対する作用を定量的Real-time PCR法で検討したところ、TGF- $\beta$ 1はIL-6とVEGFのmRNA量を

増加させるが、SD-208はこの作用を無効にした。これらの結果から、BMSCにおいてTGF- $\beta$ 1はIL-6とVEGFの転写と産生を増加させるが、SD-208はこれらを抑制することが示された。

### 2) SD-208はTGF- $\beta$ 1刺激によるSmad2とHIF-1 $\alpha$ の核内移行を阻害する

われわれは次にTGF- $\beta$ 1刺激によるBMSCからのサイトカイン産生をSD-208が抑制するメカニズムを検討した。多発性骨髄腫患者由来BMSCをTGF- $\beta$ 1で刺激するとSmad2のリン酸化が起こるが、SD-208存在下ではリン酸化が起こらない。さらに、蛍光免疫組織染色法により、TGF- $\beta$ 1刺激を受けたBMSCにおけるSmad2/3の核内移行も阻害されることが示された。Smad2/3はIL-6の転写因子であることが知られており、SD-208はTGF- $\beta$ 1からのシグナルを抑制しSmad2/3のリン酸化と核内移行を阻止することがIL-6の産生抑制をもたらすと考えられた。

また、TGF- $\beta$ 1はBMSCにおいてVEGFの強力な転写促進因子であるHIF-1 $\alpha$ の量を増加させるが、SD-208はこれを阻止することを見出した。さらにDNA結合アッセイにより、SD-208はHIF-1 $\alpha$ のVEGFプロモーター領域への結合を阻害することが示された。これらのことからSD-208はHIF-1 $\alpha$ の核内移行を阻止することによりVEGFの産生を抑制すると考えられた。

### 3) SD-208は骨髓微小環境におけるIL-6とVEGFの産生を抑制する

つぎに多発性骨髄腫細胞とBMSCの接着によるIL-6とVEGFの産生に対する影響を検討した。多発性骨髄腫細胞とBMSCを共培養するとそれぞれを単独で培養するときと比べて培養上清中のIL-6とVEGFの濃度が上昇するが、SD-208を添加することによってこの上昇が抑制された。このことからSD-208はTGF- $\beta$ 1からのシグナルを遮断し、骨髓微小環境中のIL-6とVEGFの産生を抑制すると考えられた。

### 4) SD-208は骨髓微小環境における骨髄腫細胞の増殖を抑制する

次に骨髓微小環境における多発性骨髄腫細胞の増殖に対するSD-208の効果を検討した。SD-208は用量依存的に、BMSCとの接着によって増加する多発性骨髄腫細胞の増殖を阻止した。

## 今後の展望

本研究により骨髓微小環境においてTGF- $\beta$ 1はBMSCからのIL-6とVEGFの産生促進を介して多発性骨髄腫細胞の増殖をもたらすことが示された。このことは、TGF- $\beta$ 1は多発性骨髄腫の分子標的療法のターゲットとして有用であることを示している。さらに、われわれはTGF- $\beta$ 1の作用を特異的に阻害する、TGF $\beta$ 受容体Iキナーゼ阻害剤(SD-208)がBMSCからのIL-6とVEGFの産生抑制、多発性骨髄腫細胞の増殖抑制に有用であることを示した。今後、この理論的根拠に基づいたSD-208の臨床試験が待たれる。