

# 博士論文

## 多発性骨髄腫における JAK2/Src キナーゼ阻害剤 NS-018 の 抗腫瘍作用および骨融解抑制作用

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬理学研究室

|         |             |
|---------|-------------|
| 学 籍 番 号 | 1629012004  |
| 氏 名     | 本田 歩美       |
| 主任指導教員名 | 金田 勝幸 教授    |
| 論 文 提 出 | 平成 31 年 3 月 |

## 目次

|  |    |
|--|----|
| Chapter 1 緒言 .....   | 1  |
| Chapter2 IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用.....                  | 6  |
| 2.1. 序文 .....  | 6  |
| 2.2. 方法 .....  | 8  |
| 2.2.1. 細胞株の培養 .....  | 8  |
| 2.2.2. ELISA 法 .....   | 8  |
| 2.2.3. ヒト血液採取 .....  | 9  |
| 2.2.4. Western blotting 法 .....                                    | 9  |
| 2.2.5. 増殖アッセイ (MTT 法) .....  | 10 |
| 2.3.1. Ba/F3 JAK2V617F 細胞株におけるリン酸化 STAT3 に対する NS-018 の作用..         | 11 |
| 2.3.2. ヒト血中 IL-6 測定法の条件検討.....                                     | 12 |
| 2.3.3. ヒト血球細胞における IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用....          | 13 |
| 2.3.4. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6 添加による JAK2/STAT3 シグナル活性化 .               | 14 |
| 2.3.5. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作<br>用 ..... | 15 |
| 2.3.6. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6 依存性細胞増殖に対する NS-018 の作用....               | 16 |
| 2.4. 考察 .....  | 19 |
| Chapter3 Src キナーゼに対する NS-018 の作用 .....                             | 21 |
| 3.1. 序文 .....  | 21 |
| 3.2. 方法 .....  | 22 |
| 3.2.1. キナーゼアッセイ .....  | 22 |
| 3.2.2. ドッキングモデル解析.....   | 22 |
| 3.2.3. 細胞株の培養 .....  | 23 |
| 3.2.4. Western blotting 法 .....                                    | 23 |
| 3.2.5. 統計解析 .....  | 23 |
| 3.3. 結果 .....  | 24 |
| 3.3.1. 酵素アッセイ系を用いた Src キナーゼに対する NS-018 の作用.....                    | 24 |
| 3.3.2. Src キナーゼと NS-018 のドッキング解析 .....                             | 24 |
| 3.3.3. 細胞株における Src シグナルに対する NS-018 の作用 .....                       | 25 |
| 3.3.4. 多発性骨髄腫細胞株における Src シグナルに対する NS-018 の作用.....                  | 26 |
| 3.4. 考察 .....  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| Chapter4 細胞接着に対する NS-018 の作用 .....                         | 30 |
| 4.1. 序文 .....  | 30 |
| 4.2. 方法 .....  | 32 |
| 4.2.1 RPMI 8226 細胞の培養 .....                                | 32 |
| 4.2.2 VCAM-1 コーティングプレートの作製 .....                           | 32 |
| 4.2.3 接着細胞数測定 .....  | 32 |
| 4.2.4 統計解析 .....   | 33 |
| 4.3. 結果 .....  | 34 |
| 4.3.1 多発性骨髄腫細胞と I 型コラーゲンの結合に対する NS-018 の作用 .....           | 34 |
| 4.3.2 多発性骨髄腫細胞とフィブロネクチンの結合に対する NS-018 の作用 .....            | 35 |
| 4.3.3 多発性骨髄腫細胞と VCAM-1 の結合に対する NS-018 の作用 .....            | 36 |
| 4.4. 考察 .....  | 38 |
| Chapter5 破骨細胞に対する NS-018 の作用 .....                         | 39 |
| 5.2. 方法 .....  | 41 |
| 5.2.1 細胞培養 .....   | 41 |
| 5.2.2 TRAP 染色 .....  | 41 |
| 5.2.3 増殖アッセイ (MTT 法) .....                                 | 41 |
| 5.2.4 動物を用いた検討 .....                                       | 41 |
| 5.2.5 統計解析 .....   | 42 |
| 5.3. 結果 .....  | 43 |
| 5.3.1 成熟破骨細胞形成に対する NS-018 の作用 .....                        | 43 |
| 5.3.2 RAW264.7 細胞増殖に対する NS-018 の作用 .....                   | 44 |
| 5.3.3 RPMI 8226 細胞脛骨移植モデルにおける骨量に対する NS-018 の作用 .....       | 46 |
| 5.3.4 RPMI 8226 細胞脛骨移植モデルにおける活性化破骨細胞数に対する NS-018 の作用 ..... | 48 |
| 5.4. 考察 .....  | 49 |
| Chapter6 おわりに .....  | 51 |
| 謝辞 .....   | 53 |
| 引用文献 .....   | 54 |

# Chapter 1 緒言

## 多発性骨髄腫の症状と治療

赤血球、白血球、血小板といった血球細胞は骨髄にて造血幹細胞から増殖分化して作られる。造血幹細胞は骨髄系前駆細胞とリンパ系前駆細胞に分かれ、前者は赤血球、血小板、顆粒球や単球に分化し、後者はB細胞、T細胞、NK細胞などのリンパ球に分化する。造血器腫瘍は造血幹細胞から血球細胞が分化する過程のいずれかで異常が生じ、細胞が異常増殖する疾患である。多発性骨髄腫はB細胞の最終分化段階にある形質細胞が骨髄において腫瘍化し（骨髄腫細胞）、単クローン性に増殖するリンパ系腫瘍である（Figure 1-1）。

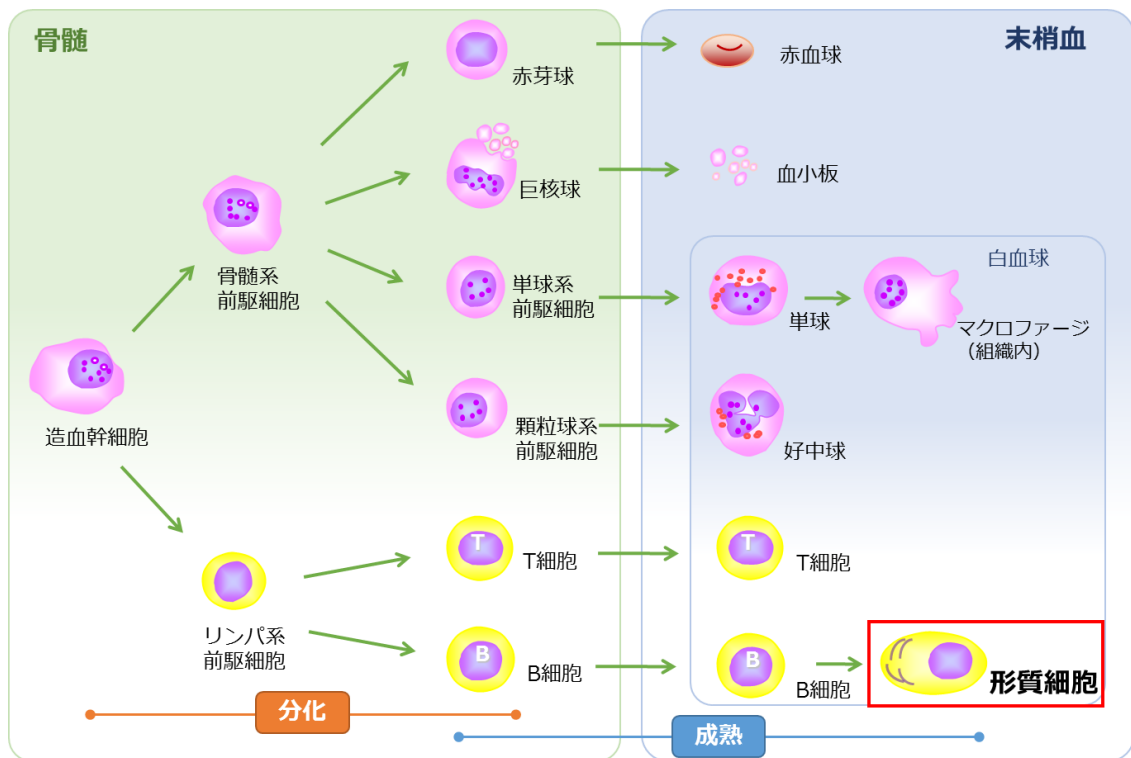


Figure 1-1 Hematopoietic differentiation.

多発性骨髄腫の40歳未満の発症はまれで60歳代~70歳代に多い疾患であり、日本では年間10万人あたり約5人発症するとされている。全悪性腫瘍の約1%、造血器腫瘍の約10%を占めるとされているが高齢化と共に増加傾向にある。多発性骨髄腫では骨髄腫細胞の異常増殖に伴い、様々な症状が現れる。形質細胞はB細胞から分化・成熟した

細胞であり抗体を産生するが、腫瘍化することによりモノクローナルな異常 $\gamma$ グロブリン（M 蛋白）を産生するようになる。これによって腎障害や過粘稠度症候群が起きる。また骨髄腫細胞の増殖により正常造血が抑制され、貧血など血球減少も生じる。さらに多発性骨髄腫の症状で最も多いのが、骨痛である。骨髄腫細胞が破骨細胞の分化・成熟を促進して活性化し、骨芽細胞の分化を抑制することで溶骨性変化が起こり、骨痛や病的骨折をもたらす。多発性骨髄腫における骨折率は骨転移しやすい乳癌や前立腺癌など他の癌における骨折率より高く、また骨痛や骨折は Quality of life (QOL) を低下するだけでなく、死亡リスクを 20%上昇させることも報告されている (Saad et al. 2007)。

現時点で多発性骨髄腫は完治が難しい疾患であり、QOL を維持しながら長期生存を目指すことが治療目標となる。移植適用の患者（目安として 65 歳未満）には大量化学療法を併用する造血幹細胞移植が行われる。移植非適用の患者には 40 年以上にわたって標準療法であったメルファラン、プレドニゾロンに加えて近年ではボルテゾミブやレナリドミド等の新薬が使用される。今世紀になり、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブやカルフィルゾミブ、免疫調節剤であるレナリドミドやポマリドミド、さらにモノクローナル抗体治療剤であるエロツズマブ、ダラツムマブなど様々な新規治療薬が次々と開発され、より深い奏効の獲得、生存期間の延長が得られるようになった。しかしながら未だに完治は困難であり、多くの患者で数ヶ月～数年後に再発する (Richardson et al. 2018)。骨髄腫細胞のプロテアソーム阻害剤や免疫調節剤に対する耐性獲得や不応例も報告されており、更なる新規治療薬の開発は喫緊の課題である。

また骨病変に対する支持療法としては国内ではビスホスホネート製剤のゾレドロン酸または抗 receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) 抗体デノスマブが使用される。これらの薬剤により、骨関連事象（病的骨折、骨病変に対する放射線治療、骨病変に対する外科的手術、脊髄圧迫）の発現は抑制されたが未だに半数近くの患者で骨関連事象が生じる (Raje et al. 2018) ことから、多発性骨髄腫における骨病変に関してもニーズは満たされていない。

#### 骨髄腫細胞の増殖、生存、薬剤耐性獲得に関わる細胞内シグナル

多発性骨髄腫の病態形成には骨髄腫細胞と骨髄微小環境の相互作用が深く関与している。骨髄微小環境は骨髄間質細胞や単核球、破骨細胞、骨芽細胞、樹状細胞、血管内皮細胞などの細胞群により構成されている。骨髄腫細胞や骨髄微小環境からオートクラインまたはパラクライン分泌されたサイトカインや接着分子を介したシグナル伝達に

より、骨髄腫細胞は増殖能や化学療法抵抗性を獲得するとともに、破骨細胞の活性化促進や骨芽細胞分化抑制を誘導し、骨病変の形成を誘導する。

骨髄腫細胞は自ら分泌する tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、vascular endothelial growth factor (VEGF) など骨髄微小環境に存在する骨髄間質細胞を刺激する。その結果、骨髄間質細胞から interleukin-6 (IL-6)、VEGF、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) などのサイトカインが分泌される。そして骨髄腫細胞の表面に発現するレセプターを介し、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)、Ras/ERK、janus kinase (JAK) /signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3)、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt などの細胞内シグナルが活性化され、増殖促進や抗アポトーシス作用などがもたらされる。IL-6 は多発性骨髄腫患者の血清において上昇しており、骨髄腫細胞の増殖・生存への強い関与が示唆される (Hideshima et al. 2007、Saad et al. 2007、Lauta et al. 2003)。IL-6 刺激により活性化するシグナルのうち、JAK/STAT シグナルは、骨髄腫細胞において恒常的に活性化していることが報告されており (Yu et al. 2009、Ferchiou et al. 2017)、IL-6 刺激による骨髄腫細胞増殖・生存に関与する重要なシグナルであると考えられる。また、骨髄腫細胞の表面に存在する lymphocyte function-associated antigen (LFA-1)、very late antigen-4 (VLA-4) などの接着分子と骨髄間質細胞表面の vascular cell adhesion molecule-4 (VCAM-1)、フィブロネクチン、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) などのリガンドとの結合により MEK/ERK、Src などが活性化され、細胞増殖、抗アポトーシス作用を誘導し、薬剤耐性を獲得すると考えられる (Hideshima et al. 2007、金倉譲他、2014)。

多発性骨髄腫で多く認められる骨融解は骨髄腫細胞由来の液性因子および骨髄腫細胞と骨髄微小環境との相互作用による骨吸収の促進に基づくと考えられている。破骨細胞の活性化は骨髄間質細胞や骨芽細胞に誘導される破骨細胞分化因子 RANKL とそのおとり受容体で阻害因子である osteoprotegerin (OPG) との作用のバランスにより調節されるが、多発性骨髄腫の患者では RANKL の発現が亢進し、OPG の発現が低下している (Pearse et al. 2001)。また、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 $\alpha$  および MIP-1 $\beta$  の産生が亢進している (Hashimoto et al. 2004) 骨髄腫細胞が産生する MIP-1 $\alpha$  および MIP-1 $\beta$  は、骨髄腫細胞に発現している VLA-4 を活性化し間質細胞との接着を促進する。この接着により、骨髄腫細胞からの MIP-1 の分泌はさらに亢進するとともに、分泌された MIP-1 が近傍の骨髄間質細胞に効率よく作用し、RANKL 発現を誘導する。このよう

な MIP-1、RANKL を介した機序により骨髄腫細胞は破骨細胞の分化・成熟を促進する。VLA-4-VCAM-1 を介する骨髄腫細胞と間質細胞の接着におけるシグナル伝達や RANK-RANKL シグナルには Src キナーゼが関与している (Figure 1-2)。

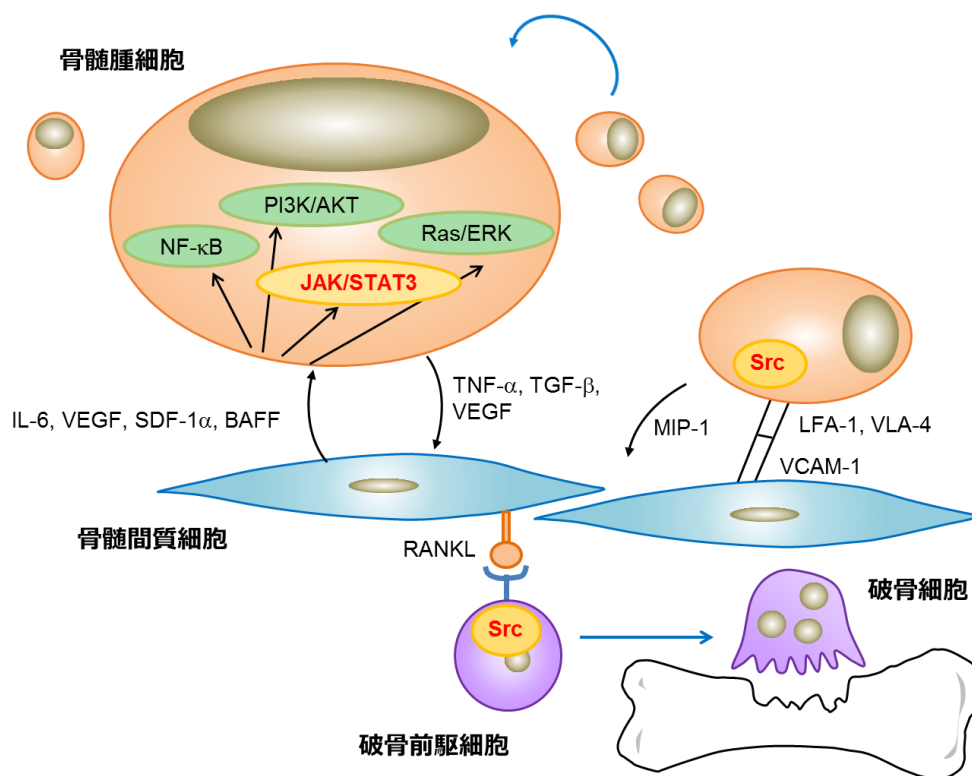


Figure 1-2 Interaction of multiple myeloma cells in their bone marrow milieu.

#### JAK2/Src キナーゼ阻害剤 NS-018

NS-018 は日本新薬で創製された ATP 競合型の JAK2 キナーゼ阻害剤であり、現在米国において骨髄線維症を対象とした Phase1/2 試験を実施中である。JAK ファミリーに属する JAK1、JAK2、JAK3、tyrosine kinase 2 (Tyk2) キナーゼのうち、JAK2 キナーゼを選択的に強力に阻害するとともに、強い Src キナーゼ阻害作用を持つという特徴がある (Nakaya et al. 2011、Nakaya et al. 2014)。

JAK2 キナーゼは非受容体型チロシンキナーゼである。受容体型チロシンキナーゼと同様にキナーゼドメイン中に自己リン酸化部位および ATP 結合部位が存在し、自己リン酸化によりキナーゼ活性を調節している。JAK2 はエリスロポエチン受容体やトロンボポエチン受容体をはじめとする様々な受容体に会合し、サイトカインシグナルを細胞内に伝達する重要な役割を果たし、JAK-STAT 経路を介して血液細胞の増殖や分化を調節する。原発性骨髄線維症では半数以上に JAK2 タンパク質の 617 番目のアミノ酸のバ

リンがフェニルアラニンに置換された点突然変異 (JAK2V617F) が認められ、この変異により JAK2 キナーゼの抑制が解除され、サイトカイン非存在下でキナーゼ活性が恒常的に亢進している (Nangalia et al. 2014)。そのほか、原発性骨髄線維症患者の約 20%~30%で Calreticulin 遺伝子変異が認められるが、Calreticulin 変異細胞では JAK-STAT 経路が活性化していることが報告されている (Araki et al. 2016、Chachoua et al. 2016)。これらのことから骨髄線維症を対象として JAK2 キナーゼを標的とした分子標的薬が数多く開発されているが、NS-018 はその中で唯一 JAK2 キナーゼと共に強い Src キナーゼ阻害作用を持つ薬剤である。Src キナーゼも JAK2 キナーゼと同様に非受容体型チロシンキナーゼである。Src キナーゼはがん原遺伝子 c-Src としても知られ、多くのがんにおいて過剰発現しており、がんの発生や転移に関与することが示唆されている。

#### 本研究の目的

多発性骨髄腫において IL-6/JAK/STAT シグナルは骨髄腫細胞の増殖・生存に深く関与していると考えられる。また、骨髄腫細胞と骨髄微小環境との接着や骨吸収の促進シグナルには Src キナーゼが関与していることが分かっている。本研究では JAK2 キナーゼ阻害作用および Src キナーゼ阻害作用を併せ持つ特徴的な NS-018 の多発性骨髄腫に対する新たな薬剤としての有用性を検討した。



# Chapter2 IL-6/JAK2/STAT3 シグナル に対する NS-018 の作用

## 2.1. 序文

IL-6 は代表的な炎症性サイトカインの一つであり、T 細胞・B 細胞といった免疫細胞や造血細胞等に対して、増殖促進・細胞死の抑制など多種多様なシグナルを細胞内へ伝える役割を持つ。また免疫系細胞のみならず、種々の癌細胞の増殖分化にも関与することが知られている。

多発性骨髄腫において IL-6 は骨髄腫細胞と接着することにより骨髄間質細胞、破骨細胞、血管内皮細胞から分泌される。緒言に記したとおり、多発性骨髄腫患者の血清では IL-6 量が上昇していることが報告されており、IL-6 は骨髄腫細胞の増殖・生存に関与していると考えられる。骨髄腫細胞は IL-6 受容体を発現しており、IL-6 刺激により JAK/STAT シグナルや Ras/ERK シグナル、PI3K シグナル等が活性化される。そのうち JAK/STAT シグナルは、骨髄腫細胞において恒常的に活性化していると報告されており、IL-6 刺激による骨髄腫細胞増殖・生存に関与する重要なシグナルであると考えられる。

IL-6 受容体に IL-6 が結合すると IL-6 受容体は gp130 タンパクと共に二量体を形成し、JAK1/2 を活性化する。JAK1/2 は自己リン酸化と gp130 のリン酸化を行い、Gp130 のリン酸化残基に SH2 ドメインを介して STAT3 が結合する。STAT3 は JAK1/2 によってリン酸化されると二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。AG490、pyridone 6、INCB16562、CYT387、AZD1480 といった JAK キナーゼ阻害剤は IL-6 依存性の骨髄腫細胞増殖・生存を抑制することが報告されている。(De Vos et al. 2000、Pedranzini et al. 2006、Li et al. 2010、Scuto et al. 2011、Monaghan et al. 2011) このように、JAK キナーゼ阻害剤やその下流シグナルの阻害剤は多発性骨髄腫患者に有用であると考えられるが、現在治療薬として使われているものはない。

そこで本章では JAK2 キナーゼ阻害剤である NS-018 の多発性骨髄腫細胞に対する増殖抑制作用を検討した。まず JAK2 キナーゼの下流である STAT3 のリン酸化に対する

NS-018 の作用を評価した。次にヒト血球細胞における IL-6 添加による STAT3 のリン酸化作用、またそのリン酸化に対する NS-018 の作用を検討した。そして多発性骨髄腫細胞株を用いて IL-6 添加による STAT3 のリン酸化亢進作用およびリン酸化に対する NS-018 の作用を検討した後、増殖に対する NS-018 の作用を検討した。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 細胞株の培養

Ba/F3 JAK2 V617F 細胞（日本新薬にて作製）、U266 細胞（ATCC、米国）、RPMI 8226 細胞（JCRB、大阪）、KMM-1 細胞（JCRB、大阪）、ARH-77 細胞（DSMZ、ドイツ）は 10% Fetal bovine serum（FBS）（Biowest、USA）を含む RPMI-1640 培地（シグマアルドリッチジャパン、東京）、PCM6 細胞（理研、茨城）は 10%FBS を含む McCoy's 5A 培地（シグマアルドリッチジャパン、東京）中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2.2.2. ELISA 法

#### ・溶血処理

血液に 10 倍量の ACK Lysing Buffer（ThermoFisher、米国）を加え、室温で 5 分間静置する。遠心（300g、5 分、室温）した後、Phosphate buffered saline（PBS）（ナカライテスク、京都）で 2 回洗浄することで溶血処理を行った。

#### ・細胞抽出液調製

PBS で 2 回洗浄した細胞株またはヒト血液由来細胞に Cell Extraction Buffer（ThermoFisher、米国）を加え vortex 後、氷上に 30 分静置した。その後遠心（20000g、10 分、4°C）し細胞抽出液（上清）を回収した。

#### ・ELISA

STAT3(Phospho)[pY705]Multispecies ELISA Kit（ThermoFisher、米国）のプロトコルに準じて行った。サンプルはキット付属の Standard Diluent Buffer で 10 倍希釈して使用した。

### 2.2.3. ヒト血液採取

健常人（非絶食、48 時間前から服薬不可）から 0.1%ヘパリン入り採血管を用いて採血を行った。実験はすべて「ヘルシンキ宣言」や「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に則った日本新薬株式会社の社内規程に定める研究倫理委員会にて承認された研究計画書に従い実施した。

### 2.2.4. Western blotting 法

#### ・細胞抽出液調製

細胞を冷 PBS で 2 回洗浄後、沈殿に Cell Lysis Buffer (10×Cell Lysis Buffer (CST ジャパン、東京) を超純水で 10 倍希釈したもの) を適量加え、よく懸濁する。氷上で 10 分間静置後、20000g、15 分、4°C で遠心する。上清を細胞抽出液として回収する。DC プロテインアッセイキット (BioRad、米国) を用いてタンパク定量後、SDS 処理用緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、0.1% bromophenol blue、10% 2-メルカプトエタノール、10% glycerol) を容量比 4 : 1 で添加して 95°C、5 分間過熱し、-80°C で凍結保存した。

#### ・SDS 電気泳動および Immunoblotting

10% e-pagel を用いて室温で 1 時間電気泳動 (20 mA/plate) した。泳動後のゲルをあらかじめ 100% メタノールで活性化した PVDF 膜 (Merck Millipore、米国) に、110 mA で 60 分間ブロッキングした。ブロッキング終了後、同膜を 5%BSA (ナカライテスク、京都) /TBST (150 mM NaCl および 0.1% Tween20 を含む Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液) または 5% skim milk/TBST 中で 1 時間ブロッキングした。この PVDF 膜を、Can Get Signal Solution1 (TOYOBO、大阪) で適度な倍率に希釈した 1 次抗体 (抗 phospho-STAT3 抗体 (#9138S、CST ジャパン、東京)、抗 anti-STAT3 抗体 (#9132、CST ジャパン、東京)) と、4°C で一晩静置した。翌日、TBST を用いて 3 回洗浄した。次に Can Get Signal Solution2 (TOYOBO、大阪) で 2 次抗体 (horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody (#NA931V) または anti-rabbit IgG antibody (#NA934V)、GE Healthcare Japan、東京) を希釈し、室温で 1 時間反応させた後、TBST を用いて 3 回洗浄した。続いてこの

PVDF 膜を ECL advance (GE ヘルスケアジャパン、東京) と反応させたのち、化学発光を Chemidoc XRS+システム (BioRad、米国) を用いて検出した。

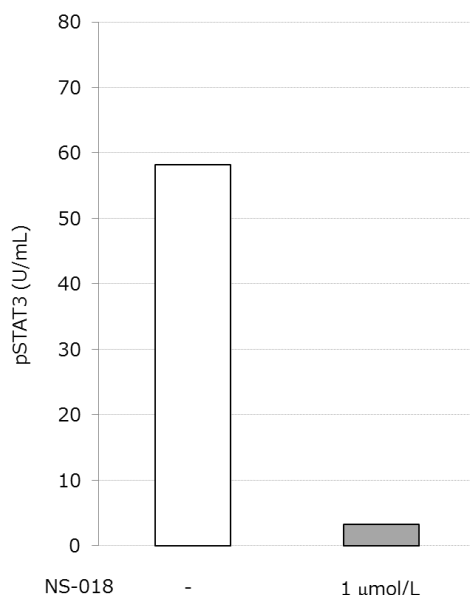
### 2.2.5. 増殖アッセイ (MTT 法)

90  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ 96well プレートを用いて各日数培養した細胞に対し、Cell Counting kit-8 (同仁化学研究所、熊本) を 10  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 4 時間インキュベートした後、プレートリーダー (EnVision、PerkinElmer、米国) にて 450 nm の吸光度を測定した。

## 2.3 結果

### 2.3.1. Ba/F3 JAK2V617F 細胞株におけるリン酸化 STAT3 に対する NS-018 の作用

JAK2V617F 変異は真性赤血球増加症や慢性特発性骨髄線維症といった慢性骨髄増殖性疾患を中心に多くの症例で認められる変異であり、JAK2 キナーゼの 617 番目のアミノ酸のバリンがフェニルアラニンに置換されている。この変異によりサイトカイン非存在下で JAK2 キナーゼの恒常的亢進が起こる。Ba/F3 JAK2V617F 細胞は Ba/F3 細胞に JAK2V617F 変異を導入し、JAK2 キナーゼシグナルを常時活性化させた細胞株である。Ba/F3 JAK2V617F 細胞におけるリン酸化 STAT3 に対する NS-018 の作用を検討した。Ba/F3 JAK2V617F 細胞株に NS-018 を 0 または 1  $\mu$ M で添加し、3 時間後に細胞抽出液を得た後、ELISA 法にてリン酸化 STAT3 を測定した。その結果、Ba/F3 JAK2V617F 細胞株においてリン酸化 STAT3 は NS-018 の添加により抑制された (Figure 2-1)。

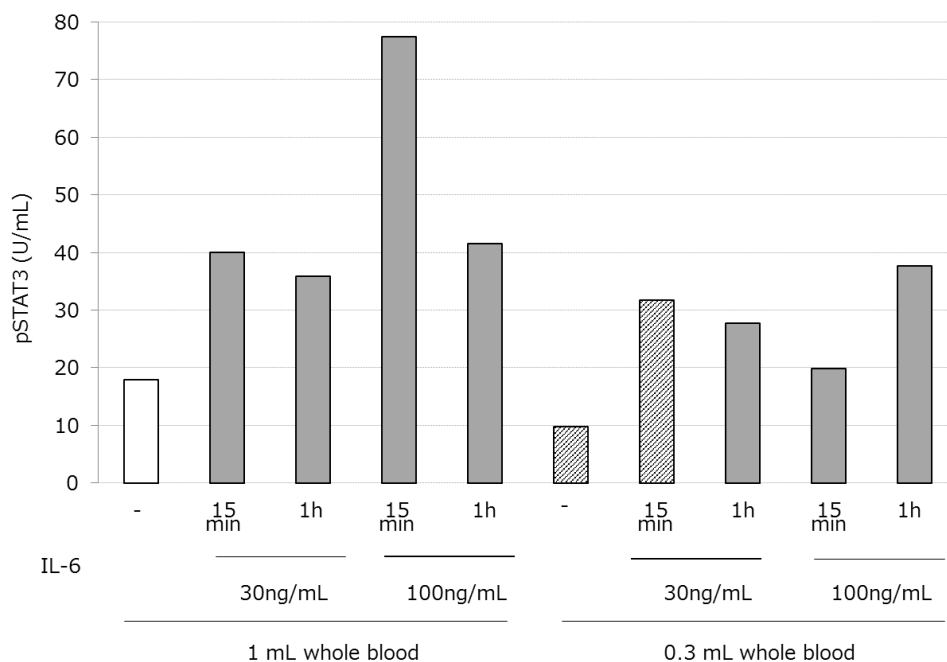


**Figure 2-1 Inhibition of p-STAT3 by NS-018 in Ba/F3 JAK2 V617F cells.**

Ba/F3 JAK2 V617F cells were incubated with or without 1  $\mu$ M NS-018 for 3 h. Cells were harvested and lysed with cell lysis buffer and the lysates were analyzed for p-STAT3 by ELISA.

### 2.3.2. ヒト血中 IL-6 測定法の条件検討

ヒト血球細胞において IL-6 添加による STAT3 の活性化(リン酸化)が認められるか、またそのリン酸化に対する NS-018 の作用を検討する目的で、まずは測定法の条件検討を行った。最初に IL-6 濃度、刺激時間、必要血液量の検討を行った。健常人由来血液 300  $\mu$ L または 1 mL に対し、IL-6 (Recombinant Human IL-6 (R&D Systems、米国)) を 30 ng/mL または 100 ng/mL 添加して 15 分後または 1 時間後に細胞抽出液を得た。続いて ELISA 法を行い、リン酸化 STAT3 を測定した。その結果、IL-6 濃度 (30 ng/mL または 100 ng/mL)、刺激時間 (15 分または 1 時間)、血液量 (300  $\mu$ L または 1 mL) のいずれの条件においても IL-6 の添加によりリン酸化 STAT3 量の増加が認められた (Figure 2-2)。必要最小限の資源を用いて検討するために、IL-6 濃度を 30 ng/mL、刺激時間を 15 分、血液量を 300  $\mu$ L の条件で検討することとした。

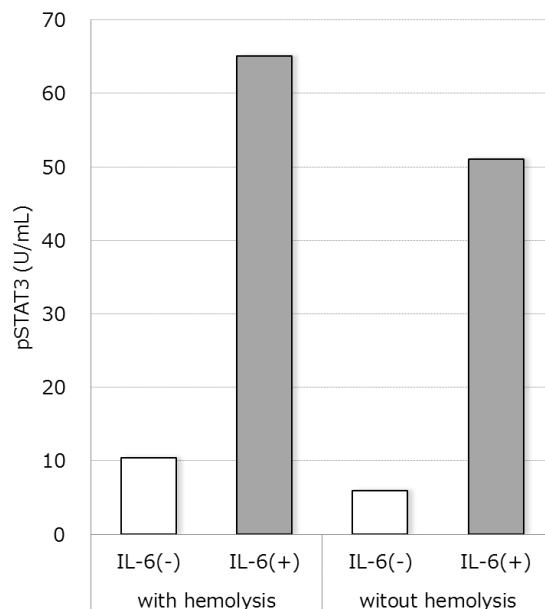


**Figure 2-2 Validation of ELISA assay conditions.**

Whole blood samples (1 mL or 300 $\mu$ L) were incubated with or without IL-6 (30 ng/mL or 100 ng/mL) for 15 min or 1h. Hemolyzed samples were lysed and the lysates were analyzed for p-STAT3 by ELISA.

続いて細胞抽出液を得る前の溶血処理の必要性を検討した。血液 300  $\mu$ L に IL-6 (30 ng/mL) を添加して 15 分後に 2.2.2.の方法における溶血処理ステップを行うものを行わ

ないものを作り、細胞抽出液を得た。続いて ELISA 法を行い、リン酸化 STAT3 を測定した。その結果、溶血処理ステップは行ったものと行わなかったもので結果に大きな差はなく、必要ないことが分かった (Figure 2-3)。



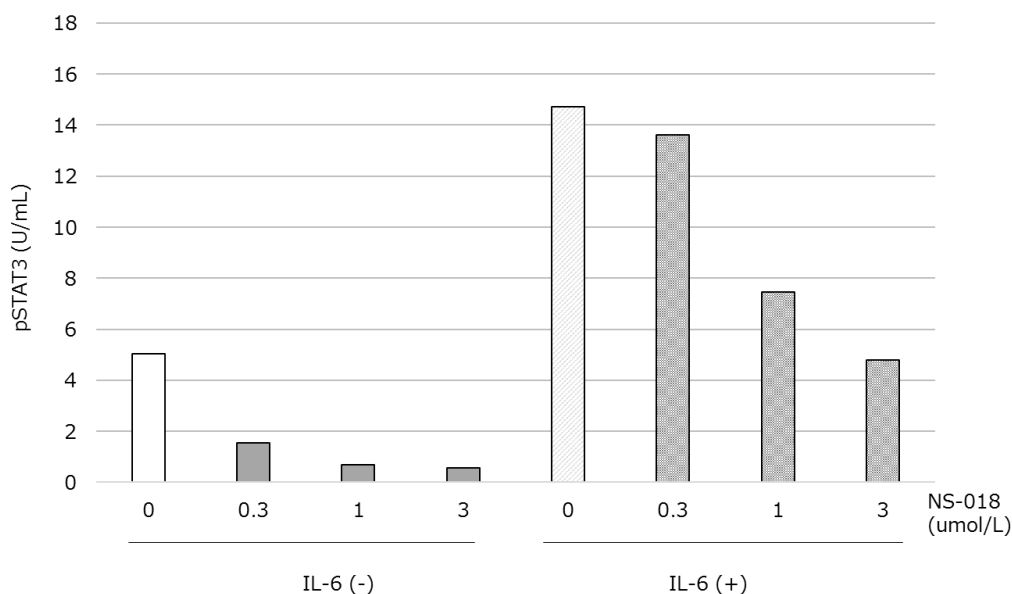
**Figure 2-3 Validation of ELISA assay conditions.**

Whole blood samples were incubated with or without 30 ng/mL IL-6 for 15 min. Hemolyzed or not hemolyzed samples were lysed and the lysates were analyzed for p-STAT3 by ELISA.

### 2.3.3 ヒト血球細胞における IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用

ヒト血球細胞における IL-6 添加による STAT3 のリン酸化に対する NS-018 の作用を検討する目的で、これまでに決めた条件でリン酸化 STAT3 を測定した。健常人由来血液 300  $\mu$ L 中に NS-018 (0, 300, 1000, 3000 nM) および IL-6 (0, 30 ng/mL) を添加し、3 時間インキュベートした後に細胞抽出液を得た。続いて ELISA 法を行い、リン酸化 STAT3 を測定した。その結果、IL-6 の添加による STAT3 のリン酸化は、NS-018 により濃度依存的に抑制された。また IL-6 の添加がない状態のリン酸化 STAT3 に対しても NS-018 は濃度依存的に抑制した (Figure 2-4)。



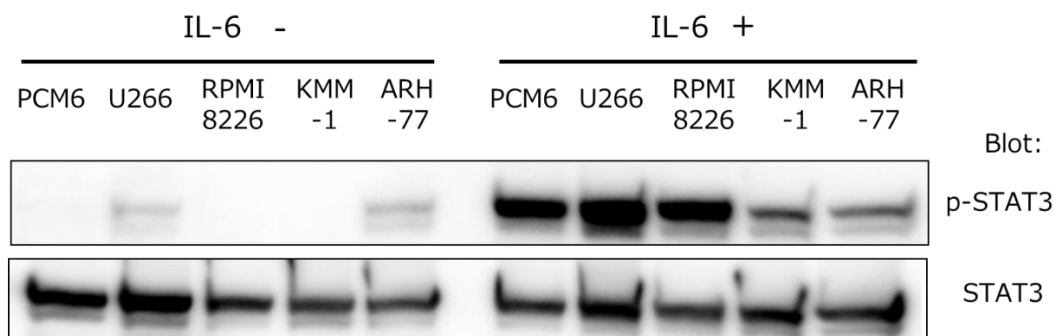


**Figure 2-4 Inhibition of p-STAT3 by NS-018.**

Whole blood samples were treated with the indicated concentrations of NS-018 and incubated with or without 30 ng/mL IL-6 for 3 h. Not hemolyzed samples were lysed and the lysates were analyzed for p-STAT3 by ELISA.

### 2.3.4. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6 添加による JAK2/STAT3 シグナル活性化

次に骨髄腫細胞において IL-6 の添加により JAK2/STAT3 シグナルの活性化が認められるか検討するため、PCM6、U266、RPMI 8226、KMM-1、ARH-77（多発性骨髄腫細胞株）を用いて以下の検討を行った。それぞれの細胞に IL-6（5 ng/mL）を添加し 5%CO<sub>2</sub> 環境下で 2 時間インキュベートした後に細胞抽出液を回収し、Western Blotting 法により p-STAT3 および STAT3 の発現を確認した。その結果、強弱はあるが 5 種全ての細胞株で IL-6 添加によりリン酸化 STAT3 の増加が確認出来た（Figure 2-5）。

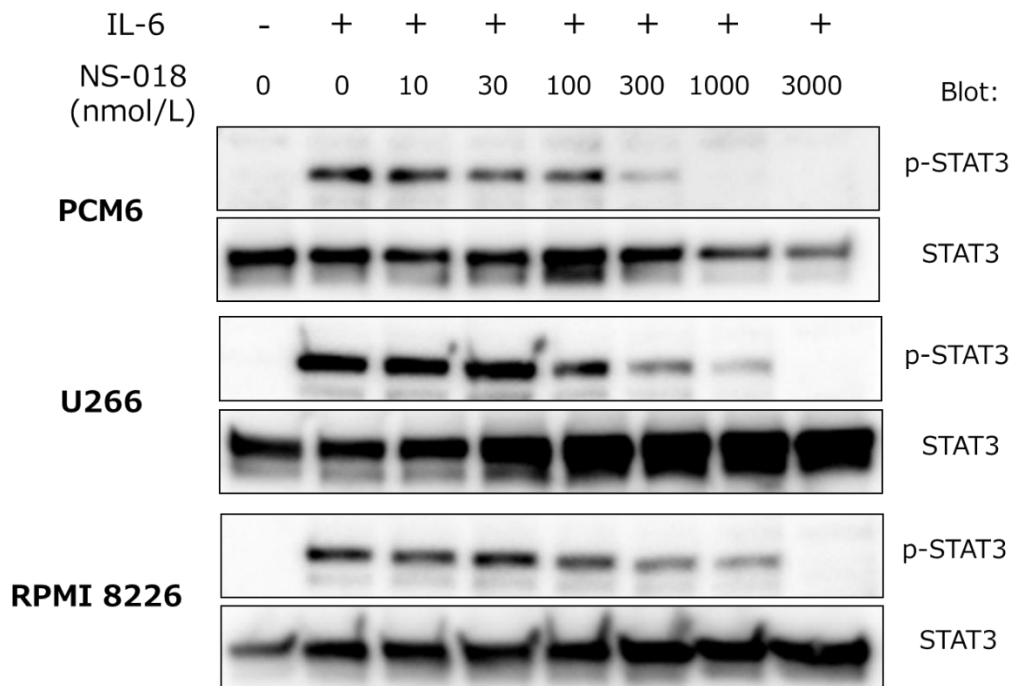


**Figure 2-5 IL-6 increases phosphorylated STAT3 in multiple myeloma cell lines.**

Myeloma cells were incubated with or without 5 ng/mL IL-6 for 2 h. The cells were harvested and lysed and the lysates were analyzed for STAT3 and p-STAT3 by western blotting.

### 2.3.5. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用

2.3.4.において IL-6 の添加により特に強い STAT3 のリン酸化が認められた PCM6、U266、RPMI 8226 を用いて、IL-6 により活性化された STAT3 に対する NS-018 の作用を検討した。細胞に IL-6 (10 ng/mL) を添加し 2 時間後に NS-018 (0、10、30、100、300、1000、3000 nmol/L) を添加した。5%CO<sub>2</sub> 環境下で 30 分間インキュベートした後に細胞抽出液を回収し、Western Blotting 法を行い、リン酸化 STAT3 および STAT3 の発現を確認した。その結果、IL-6 添加で増加したリン酸化 STAT3 は、NS-018 により濃度依存的に抑制された (Figure 2-6)。

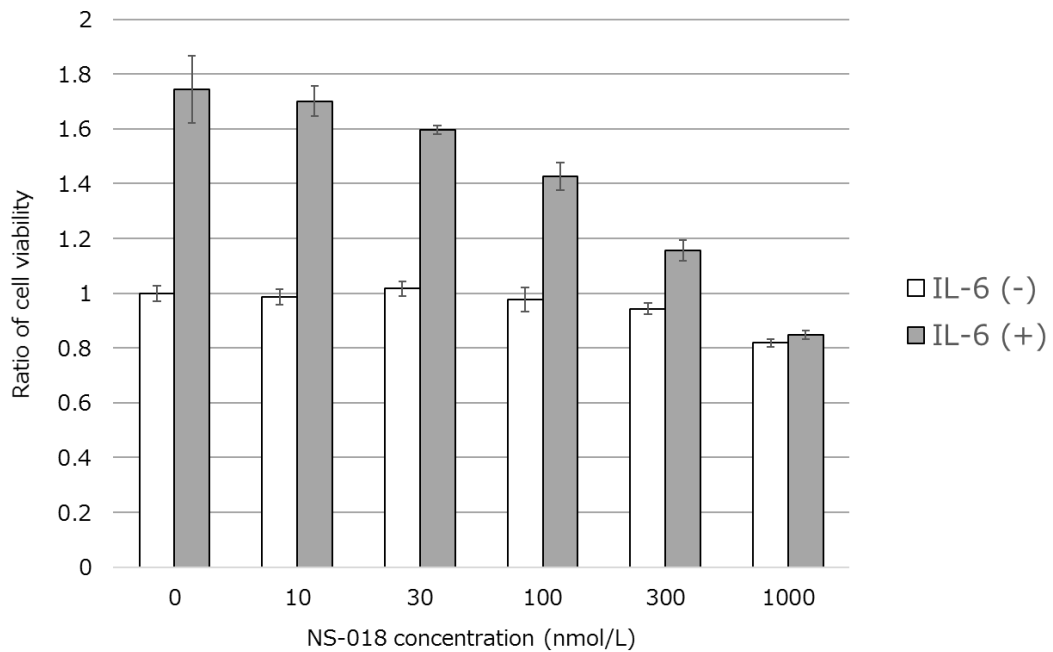


**Figure 2-6 Inhibition of STAT3 signaling by NS-018.**

PCM6, U266, and RPMI 8226 cells were incubated with 10 ng/mL IL-6 for 2 h and then treated with the indicated concentrations of NS-018 for 30 min. The cells were harvested and analyzed for STAT3 and p-STAT3 by western blotting.

### 2.3.6. 多発性骨髄腫細胞株における IL-6 依存性細胞増殖に対する NS-018 の作用

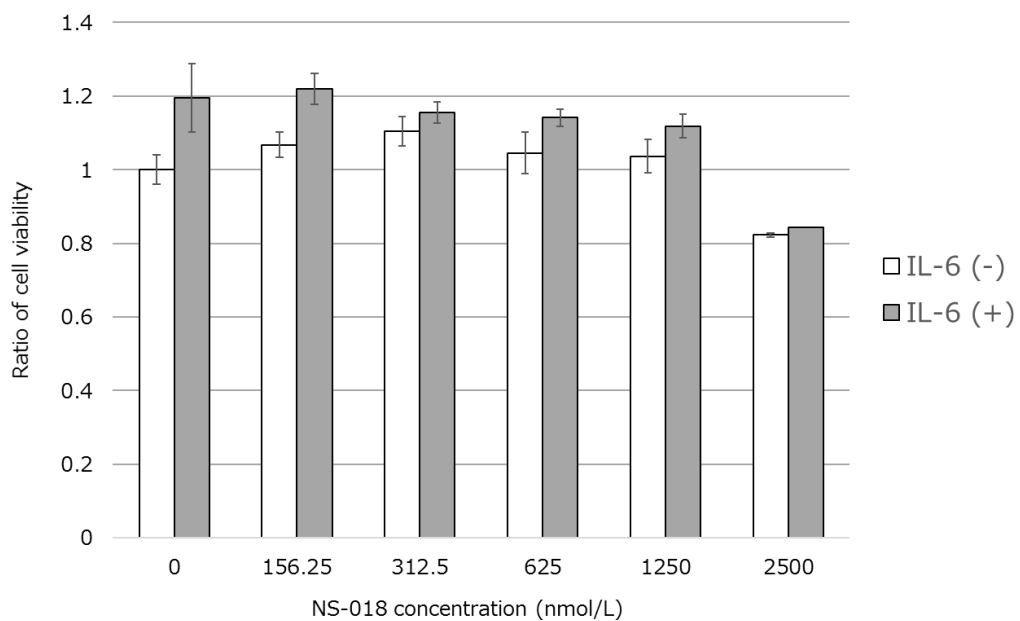
IL-6 は骨髄腫細胞と微小環境との相互作用により周辺細胞から分泌され、骨髄腫細胞の増殖に関与すると考えられている。そこで PCM6、RPMI 8226 を用いて IL-6 により促進すると考えられる細胞増殖に対する NS-018 の作用を検討した。まず PCM6 に IL-6 (10 ng/mL) および NS-018 (0、10、30、100、300、1000 nmol/L) を添加した。5%CO<sub>2</sub> 環境下で 3 日間インキュベートした後に MTT 法にて細胞数を測定した。その結果、IL-6 の添加により細胞増殖が促進し、NS-018 によって濃度依存的に IL-6 依存性の増殖が抑制された (Figure 2-7)。



**Figure 2-7 Antiproliferative effect of NS-018 against PCM-6 activated by IL-6**

PCM6 cells were incubated with or without 10 ng/mL IL-6 and the indicated concentrations of NS-018 for 3 days and cell viability was analyzed by MTT assay. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

次に RPMI 8226 に NS-018 (0、156.25、312.5、625、1250、2500 nmol/L) および IL-6 (10 ng/mL) を添加した。5%CO<sub>2</sub> 環境下で 3 日間インキュベートした後に MTT 法にて細胞数を測定した。その結果、IL-6 添加による細胞増殖促進作用が認められず、また NS-018 による抑制作用も認められなかった (Figure 2-8)。



**Figure 2-8 Antiproliferative effect of NS-018 against RPMI 8226.**

RPMI 8226 cells were incubated with or without 10 ng/mL IL-6 and the indicated concentrations of NS-018 for 3 days and cell viability was analyzed by MTT assay. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

## 2.4. 考察

本章では IL-6 により活性化された JAK2/STAT3 シグナルに対する JAK2 キナーゼ阻害剤 NS-018 の作用を検討した。

まず JAK2 キナーゼシグナルが恒常的に亢進している Ba/F3 JAK2V617F 細胞を用いた検討により、NS-018 が JAK2 キナーゼシグナルの下流であるリン酸化 STAT3 を抑制することが示された。次にヒト血球細胞を用いた検討によって IL-6 添加により STAT3 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化は NS-018 によって抑制されることが分かった。IL-6 非添加のリン酸化 STAT3 に対しても NS-018 は濃度依存的に抑制する傾向を示したが、これはもともと体内に存在した IL-6 によって上昇したリン酸化 STAT3 を抑制したものと考えられる。

次に多発性骨髄腫細胞株においても同様に IL-6 により JAK2/STAT3 シグナルの活性化が認められるか、またその活性化および活性化による細胞増殖亢進に対する NS-018 の作用を検討した。

まず多発性骨髄腫細胞株において IL-6 の添加により STAT3 のリン酸化が亢進するか検討したところ、用いた 5 種全ての細胞株でリン酸化 STAT3 の増加が確認された。次に IL-6 添加によりリン酸化 STAT3 が強く上昇した 3 株を用いて NS-018 の効果を検討したところ、IL-6 により上昇したリン酸化 STAT3 は NS-018 によって濃度依存的に抑制されることが示された。最後にそのうち 2 種類の骨髄腫細胞株を用いて 3 日間の増殖アッセイを行ったところ、PCM6 では IL-6 の添加により増殖促進が認められ、その増殖は NS-018 によって濃度依存的に抑制されることが見出された。これらの結果より、多発性骨髄腫において NS-018 は JAK2/STAT3 シグナル抑制を介して微小環境から分泌された IL-6 による骨髄腫細胞の増殖を抑制すると考えられる。一方 RPMI 8226 ではそもそも IL-6 の添加により増殖の促進が認められず、また NS-018 もその増殖を抑制しなかった。RPMI 8226 は KRAS、p53、NIK などの遺伝子変異を持つ細胞であるため、もともとこれらの変異により細胞増殖や抗アポトーシスシグナルが活性化している (Demchenko et al. 2010、Ikediobi et al. 2006)。IL-6 の添加によりリン酸化 STAT3 の上昇は認められたが、そもそもそれらの変異によって細胞増殖シグナルが常に亢進した状態にあり、IL-6 の添加でさらなる増殖亢進は認められなかったのではないかと考察する。つまり RPMI 8226 は IL-6 非依存性の細胞株と考えられる。

以上の結果より、多発性骨髄腫細胞は IL-6 により JAK2/STAT3 シグナルが活性化し、IL-6 依存性の骨髄腫細胞では増殖が亢進すること、そしてその IL-6 依存的な骨髄腫細胞の増殖を NS-018 は抑制することが分かった。IL-6 は多発性骨髄腫における重要なサイトカインであり、多発性骨髄腫患者の血清中 IL-6 量は病態の悪性度と比例することが報告されており (Bataille et al. 1989、Merico et al. 1993)、NS-018 は多発性骨髄腫患者の中でもより悪性度の高い症例に有効である可能性がある。

# Chapter3 Src キナーゼに対する NS-018 の作用

## 3.1. 序文

NS-018 は強力な ATP 競合型 JAK2 キナーゼ阻害剤であるとともに、c-Src キナーゼ、Fyn キナーゼ、Yes キナーゼといった Src ファミリーチロシンキナーゼに対しても強い阻害作用を持つことがこれまでに分かっている (Nakaya et al. 2011)。Src ファミリーチロシンキナーゼは大腸癌、乳癌、膵臓癌、メラノーマなど多くの固形腫瘍において活性化が認められており、腫瘍の転移や浸潤に関与していると考えられている。NS-018 は Src ファミリーチロシンキナーゼの中でも特に c-Src キナーゼに対して強い阻害作用を持っている。c-Src はがん原遺伝子であり、その活性化変異体である v-Src はがん遺伝子として知られている。これまでに酵素を用いた *in vitro* キナーゼアッセイ系による検討により、NS-018 が強い c-Src キナーゼ (以下、Src キナーゼとする) 阻害作用を持つことは分かっているが、 $IC_{50}$  の算出や細胞を用いた検討は行っていない。また、原子レベルでの阻害様式も明らかとなっていない。

そこで本章ではまず酵素を用いたアッセイ系にて NS-018 の Src キナーゼ阻害作用 ( $IC_{50}$ ) を算出した。次に原子レベルでの分子間相互作用の点から NS-018 による Src キナーゼ阻害の作用機序を明らかにするため、ドッキング解析を行った。最後に、細胞を用いて NS-018 の c-Src キナーゼ阻害作用を検証した。



## 3.2. 方法

### 3.2.1. キナーゼアッセイ

NS-018 を添加したストレプトアジビンコートプレート (DELFIA Microtitration strip (Perkin Elmer)、米国) に基質溶液 (ATP、ビオチン標識 Lyn 基質 (配列 ; XEQ / EDE / PEG / DYF / EWL / EPE (X:ε-aminocaproic acid)、Genemed Synthesis 社、米国)、MgCl<sub>2</sub>) を 20 μL ずつ添加し、攪拌した。次に Src キナーゼ溶液 (カルナバイオサイエンス、兵庫) を 20 μL ずつ添加して攪拌し、30°C で 1 時間反応させた。反応における最終濃度は ATP 25 μM、Lyn 基質 250 nM、MgCl<sub>2</sub> 10mM、Src キナーゼ 1 nM で行った。反応終了後、プレートを Wash バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20) で 4 回洗浄し、ブロッキングバッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20, 0.1 % BSA) を 150 μL ずつ添加して、30°C で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキングバッファーを取り除き、抗体溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20, 0.1 % BSA, 25 ng/ml HRP 標識 PY20 抗体 (BD Bioscience、米国)) を 100 μL ずつ添加して、30°C で 30 分間インキュベートした。プレートを Wash バッファーで 4 回洗浄し、TMB 溶液 (シグマアルドリッチジャパン、東京) を 100 μL ずつ添加して発色させた後、0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100 μL ずつ添加して反応を停止させた。その後マイクロプレートリーダー (Multiskan FC、Thermo scientific、米国) にて 450 nm の吸光度を測定した。

### 3.2.2. ドッキングモデル解析

解析は Maestro 9.2 (Schrödinger LLC、米国) のデフォルトの推奨値を使用しておこなった。Src キナーゼの立体構造は Protein Data Bank (ID, 3F6X) から取得した。Maestro の Protein Preparation 機能により 3F6X の X 線構造に水素原子の付加と電荷の割り当てをおこなった。Receptor Grid Generation モジュールにより 3F6X の構造情報を持つレセプターグリッドを作成した。このレセプターグリッドを用いて Glide モジュールの standard precision モードによるドッキング解析を行った。

### 3.2.3. 細胞株の培養

NIH3T3/v-*Src* 細胞（東京大学医科学研究所の北村俊夫先生より譲っていただいた）、KMS-12-BM 細胞（JCRB、大阪）、KMS-28-PE 細胞（JCRB、大阪）は 10%FBS を含む RPMI-1640 培地中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。RPMI 8226 細胞、KMM-1 細胞、U266 細胞は 2.2.1 の方法に準じて培養した。

### 3.2.4. Western blotting 法

2.2.4.の方法に準じる。1 次抗体は抗 phospho-*Src* 抗体(#2101S)、抗 *Src* 抗体(#2109S)、抗 phospho-FAK (Focal adhesion kinase) 抗体 (#3281S) および抗 FAK 抗体 (#3285S) (いずれも CST ジャパン、東京) を使用した。

### 3.2.5. 統計解析

「細胞毒性試験の ED<sub>50</sub> 推定法—原理・SAS プログラム・使い方—」(大森崇他、1998) の MTT 法のモデル式を用いて、測定した吸光度について非線形回帰分析を行い IC<sub>50</sub> 値を推定した。統計解析ソフトは SAS version8.2 (SAS Institute) を用いた。

## 3.3. 結果

### 3.3.1. 酵素アッセイ系を用いた Src キナーゼに対する NS-018 の作用

ストレプトアジピンコート 96well プレートに NS-018 を終濃度が 0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000 nM となるように添加したのち、キナーゼアッセイを行い、NS-018 の Src キナーゼ阻害作用 (IC<sub>50</sub>) を算出した。その結果、NS-018 は Src キナーゼを 12 nM の IC<sub>50</sub> で阻害した (Table 3-1)。

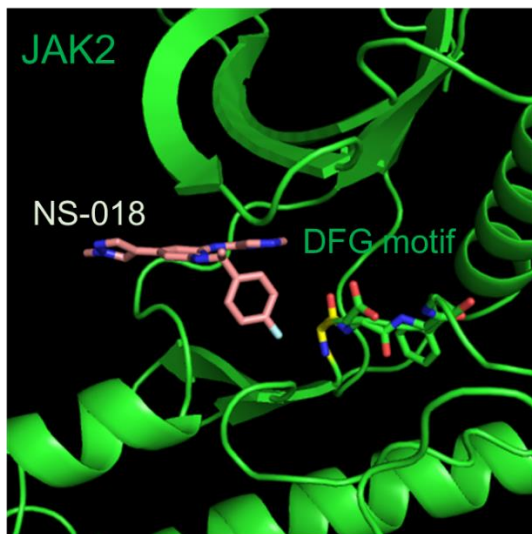
Table 3-1 Inhibition of Src kinase activity

| 化合物名   | Src キナーゼ阻害作用 (IC <sub>50</sub> , nM) |
|--------|--------------------------------------|
| NS-018 | 12                                   |

### 3.3.2. Src キナーゼと NS-018 のドッキング解析

分子レベルでの分子間相互作用の点から NS-018 の阻害作用機序を明らかにするため、Src キナーゼおよび JAK2 キナーゼと NS-018 の結合様式を比較した。NS-018 と Src キナーゼ X 線結晶構造の in silico ドッキング解析を行った結果、NS-018 は Src キナーゼの activation loop の DFG (Asp-Phe-Gly) モチーフ直前のアミノ酸 (Ala) と近接していた (Figure 3-1B)。一方 JAK2 キナーゼにおいてはその位置は Gly であり、NS-018 と JAK2 キナーゼの結合において重要なアミノ酸残基であることが報告されている (25 Nakaya et al. 2011、39 Nakaya et al. 2014) (Figure 3-1A)。JAK2 キナーゼにおける Gly や Src キナーゼにおける Ala のように、この位置のアミノ酸残基のサイズがいずれも小さいことが分かった。

### A X線結晶構造解析



### B ドッキング解析

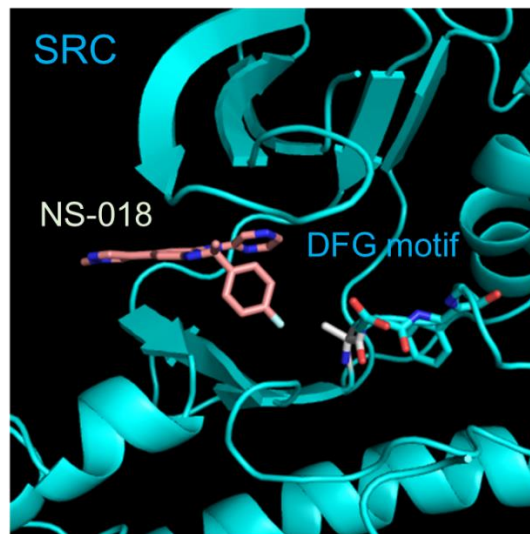
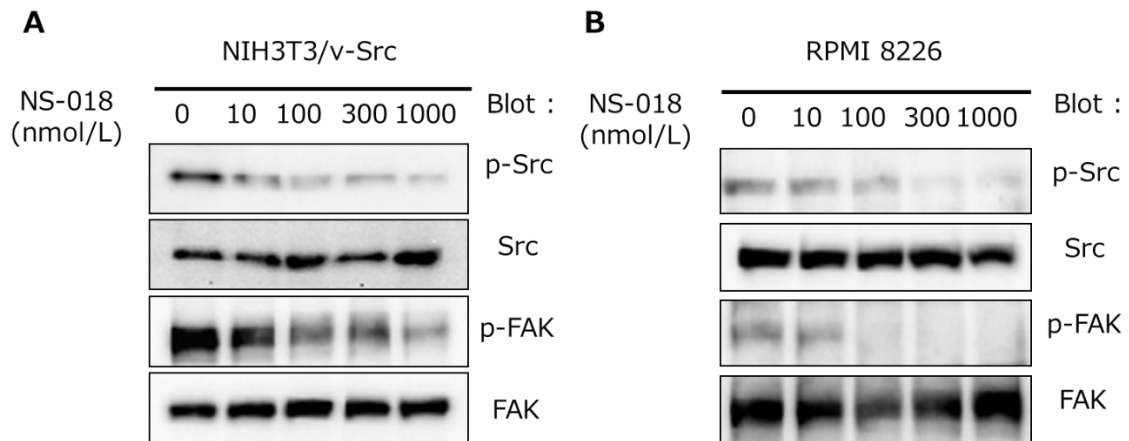


Figure 3-1 NS-018 binds to Src kinase. (Docking models)

The backbone of JAK2 is shown in green (A), the backbone of Src kinase in cyan (B), and the surface of NS-018 in pink (both panels). For clarity, only the amino acid side chains of the DFG motif are shown.

### 3.3.3. 細胞株における Src シグナルに対する NS-018 の作用

細胞における Src キナーゼシグナルに対する NS-018 の作用を検討するため、マウス胎児線維芽細胞株 NIH3T3 に c-Src の活性変異体である v-Src を過剰発現させた NIH3T3/v-Src 細胞および多発性骨髄腫細胞株 RPMI 8226 を用いた。NIH3T3/v-Src または RPMI 8226 に NS-018 (0、10、100、300、1000 nmol/L) を添加し、30 分後に細胞抽出液を回収し、Western Blotting 法によりリン酸化 Src および Src の発現、さらに Src シグナルの下流に存在するリン酸化 FAK、FAK の発現を確認した。その結果、いずれの細胞においてもリン酸化 Src およびリン酸化 FAK は NS-018 により濃度依存的に減少した (Figure 3-2)。

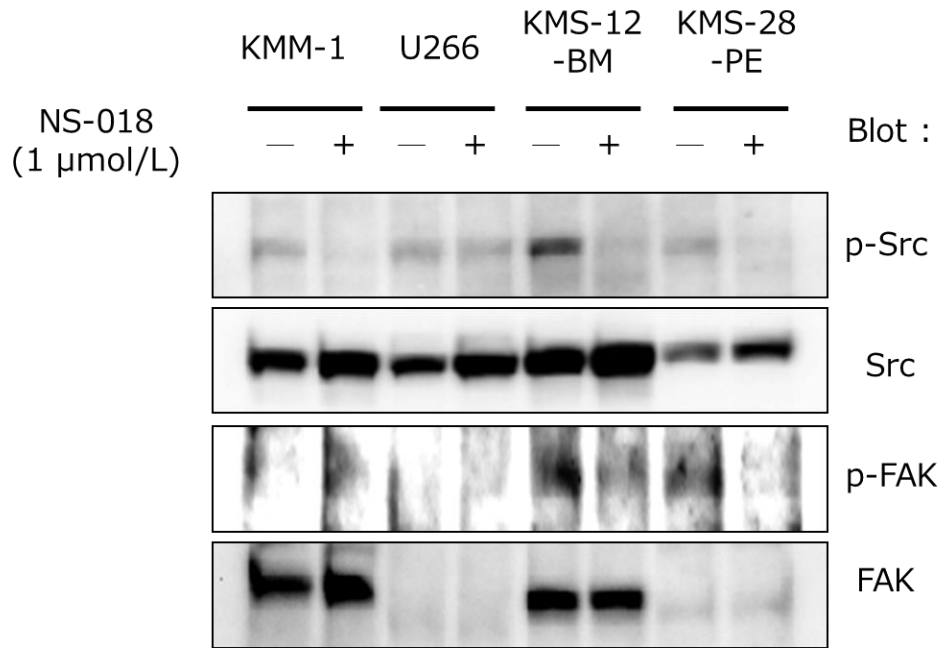


**Figure 3-2 NS-018 suppresses Src/FAK phosphorylation in NIH3T3/v-Src cells.**

(A)NIH3T3/v-Src and (B)RPMI 8226 cells were incubated with the indicated concentrations of NS-018 for 30 min. Cells were harvested and lysed with cell lysis buffer and the lysates analyzed by western blotting.

### 3.3.4. 多発性骨髄腫細胞株における Src シグナルに対する NS-018 の作用

多発性骨髄腫細胞株 KMM-1、U266、KMS-12-BM、KMS-28-PE における NS-018 の Src キナーゼに対する作用を検討した。各細胞株に NS-018 (1  $\mu$ mol/L) を添加し、30 分後に細胞抽出液を回収し、Western Blotting 法によりリン酸化 Src、Src、リン酸化 FAK および FAK の発現を確認した。その結果、用いた全ての細胞において NS-018 によるリン酸化 Src の減少が認められ、KMS-12-BM および KMS-28-PE ではリン酸化 FAK の減少も確認された (Figure 3-3)。



**Figure 3-3 NS-018 suppresses Src/FAK phosphorylation in multiple myeloma cells.**

Myeloma cells were incubated with or without 1  $\mu$ mol/L NS-018 for 30 min. The cells were harvested and lysed and the lysates analyzed for STAT3, p-STAT3, FAK and p-FAK by western blotting.

### 3.4. 考察

これまでに酵素を用いたキナーゼアッセイにおいて NS-018 が強力に JAK2 キナーゼを阻害する (IC<sub>50</sub> 値 0.72 nmol/L) (Table 3-2) とともに、Src キナーゼに対しても強い阻害作用を示すことが報告されている (100 nM における阻害率 100.6%) (Nakaya et al. 2011)。本章ではまず 3.3.1.において Src キナーゼに対する IC<sub>50</sub> 値が 12 nM であることが分かった。これは JAK2 以外の JAK ファミリーキナーゼ (JAK1、JAK3、TYK2) に対する阻害作用と比べても強く、NS-018 が強力に JAK2 キナーゼおよび Src キナーゼ阻害作用を持つことが示された。

Table 3-2 Inhibition of JAK kinase family activity (Nakaya et al. 2011 より引用)

| 化合物名   | キナーゼ阻害作用 (IC <sub>50</sub> , nM) |      |      |      |
|--------|----------------------------------|------|------|------|
|        | JAK1                             | JAK2 | JAK3 | TYK2 |
| NS-018 | 33                               | 0.72 | 39   | 22   |

次に NS-018 の Src キナーゼ阻害作用を結合様式から解析した。NS-018 と JAK2 キナーゼが結合した X 線結晶構造から、NS-018 が ATP 結合部位に結合するために activation loop の DFG モチーフ直前のアミノ酸が Gly であることが重要だということが分かっている。NS-018 と Src キナーゼの X 線結晶構造とのドッキング解析により、Src キナーゼと NS-018 の結合様式は JAK2 キナーゼと NS-018 の結合様式とよく似ており、JAK2 キナーゼの Gly に対応する位置にある Src キナーゼの Ala が NS-018 との相互作用に重要であることが示された。Gly は最も小さいアミノ酸であり、Ala は 2 番目に小さいアミノ酸であることから、キナーゼの DFG モチーフ直前に Gly や Ala といった小さいアミノ酸残基が位置していることが NS-018 との結合に重要であると考えられる。以上の JAK2 と Src の結晶構造を用いた考察により、JAK2 キナーゼと Src キナーゼに対して NS-018 が強力かつ選択的な阻害作用を持つ理由を、その結合様式の観点から説明できた。

最後に細胞を用いた検討によって、NS-018 が Src およびその下流に存在する FAK のリン酸化を阻害することが分かり、NS-018 が細胞において Src シグナル抑制作用を持つことが明らかとなった。ただし、NIH3T3/v-Src 細胞は Src シグナルが恒常的に活性化している細胞であるため、NS-018 の Src シグナル抑制作用をはっきり確認することが

出来たが、多発性骨髄腫細胞を用いた検討では Src シグナルを活性化する刺激を行っていないため、もともとリン酸化 Src 量が少なく、確認しづらい結果となった。

本章における検討から、NS-018 との結合には Src キナーゼの DFG モチーフ直前の Ala が重要であり、細胞においても NS-018 は Src キナーゼ阻害作用を有することが分かった。



# Chapter4 細胞接着に対する NS-018 の作用

## 4.1. 序文

骨髄腫細胞は骨髄環境内で接着分子を介して細胞外マトリックスや骨髄間質細胞と接着（骨髄微小環境との相互作用）している。この接着は骨髄腫細胞を骨髄内に留める役割を果たすだけでなく、骨髄腫細胞の生存や増殖の亢進、さらには薬剤耐性の獲得に重要な役割を果たしている。

骨髄腫細胞に存在する LFA-1 や VLA-4 などの接着分子は骨髄間質細胞表面の ICAM-1 や VCAM-1、フィブロネクチンと結合し、骨髄腫細胞内のシグナル伝達を誘導する。細胞外マトリックスはコラーゲン、非コラーゲン糖タンパク質（フィブロネクチンなど）、プロテオグリカンから構成されている。細胞外マトリックスは細胞を囲む網目構造を形成し、細胞の動的挙動、細胞骨格形成および細胞間情報伝達など、様々な細胞機能を制御する。

骨髄腫細胞と骨髄間質細胞および骨髄腫細胞と細胞外マトリックスの接着には接着分子インテグリン（LFA-1 や VLA-4 等）が中心的な役割を果たしている。インテグリンの活性化によって接着班キナーゼ（FAK キナーゼ）の Y397 が自己リン酸化されると SH2 ドメインを介して Src キナーゼが結合する。続いて Src キナーゼが FAK の他のチロシン残基（Y576 や Y577）をリン酸化し、シグナル伝達のアダプタータンパク質がリクルートされるとともに、Paxillin などのほかの接着班構成分子や Crk に会合している基質の p130 Cas がリン酸化される。その結果、骨髄腫細胞内で PI3K や AKT、MAPK（mitogen-activated protein kinase）/ERK（extracellular signal-regulated kinase）、NF- $\kappa$ B シグナル等のシグナル伝達が活性化し、細胞増殖、抗アポトーシス作用の誘導により薬剤耐性を獲得する（Mitra SK et al. 2006、Aoudfit F et al. 2012）。

本章では骨髄腫細胞株と I 型コラーゲン、フィブロネクチン、VCAM-1 との接着に対する NS-018 の作用を検討した。また、その作用が NS-018 のもつ JAK2 キナーゼ阻害作

用によるものか Src キナーゼ阻害作用によるものかを明らかにするため、Src キナーゼ阻害剤ダサチニブおよび JAK1/2 キナーゼ阻害剤 Ruxolitinib と比較した。

## 4.2. 方法

### 4.2.1 RPMI 8226 細胞の培養

2.2.1.の方法に準じる。

### 4.2.2. VCAM-1 コーティングプレートの作製

滅菌水に溶かして 1 mg/mL とした rhVCAM-1 (R&D systems、米国) を PBS で 100 倍希釈した後、96well plate に 40  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩インキュベートした。3 回 PBS で洗浄した後、1% BSA/PBS を 40  $\mu$ L ずつ添加し 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに PBS で 2 回洗浄し、VCAM-1 コーティングプレートとして実験に使用した。

### 4.2.3. 接着細胞数測定

インキュベート後の 96well プレートを 100g、室温で 2 分間遠心後に上清を除き、ホルムアルデヒドを 10  $\mu$ L ずつ添加し固定した。その後 PBS で 2 回洗浄後、0.05% Crystal Violet/PBS を 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートした。続いて PBS で 3 回洗浄後、100  $\mu$ L の Sorenson's Buffer (30 mM クエン酸ナトリウム、0.06% 塩酸、50% エタノール) を加え、1 分 shake した後、595 nm の吸光度を測定した。

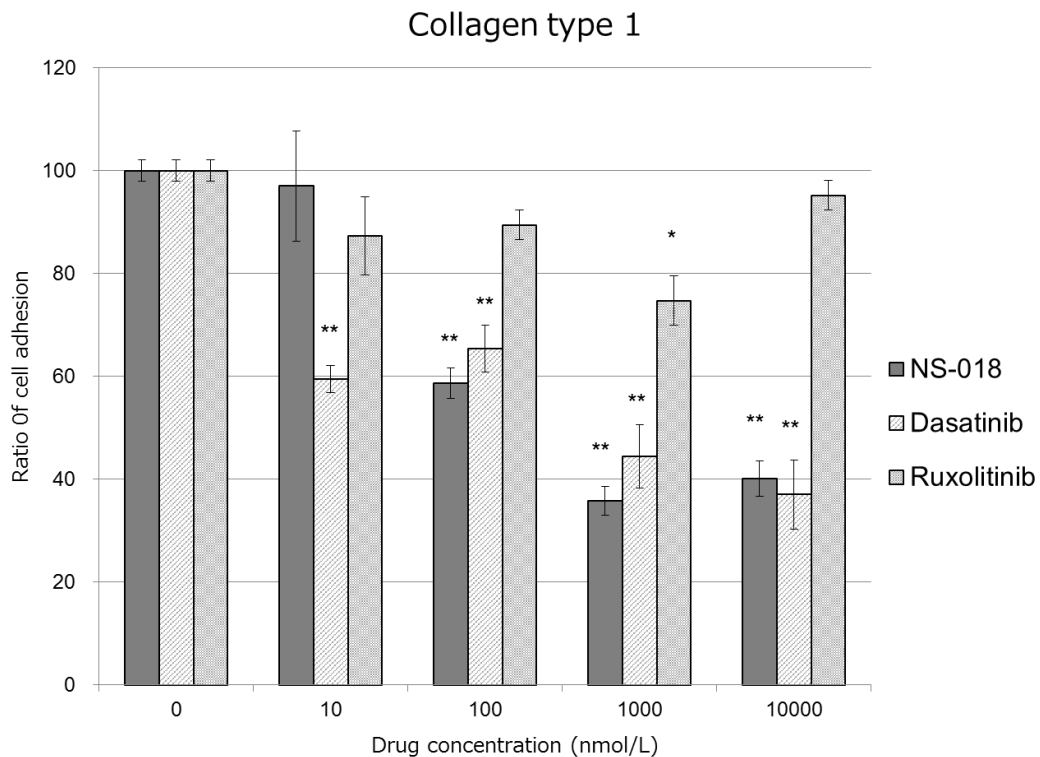
#### 4.2.4. 統計解析

計測した細胞数について SAS version 9.1.3 (SAS institute) を用いて平均値、標準誤差をもとめ、各薬物について薬物濃度 0 nmol/L を対照群として Dunnett 検定を実施した。危険率 5%未満を有意と判定した。

## 4.3. 結果

### 4.3.1. 多発性骨髄腫細胞と I 型コラーゲンの結合に対する NS-018 の作用

多発性骨髄腫細胞株 RPMI 8226 と細胞外マトリックスである I 型コラーゲンの結合に対する NS-018 の作用を検討した。RPMI 8226 細胞と NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib (0、10、100、1000、10000 nmol/L) を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で 30 分インキュベートした後、I 型コーティングプレート (Collagen Type I coated 96well plate (グライナージャパン、東京)) に播種した。37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で 1 時間インキュベートした後、接着細胞数を測定した。その結果、NS-018 およびダサチニブにより I 型コラーゲンと接着する RPMI 8226 細胞数は濃度依存的に減少した。一方 Ruxolitinib ではその作用は認められなかった (Figure 4-1)。

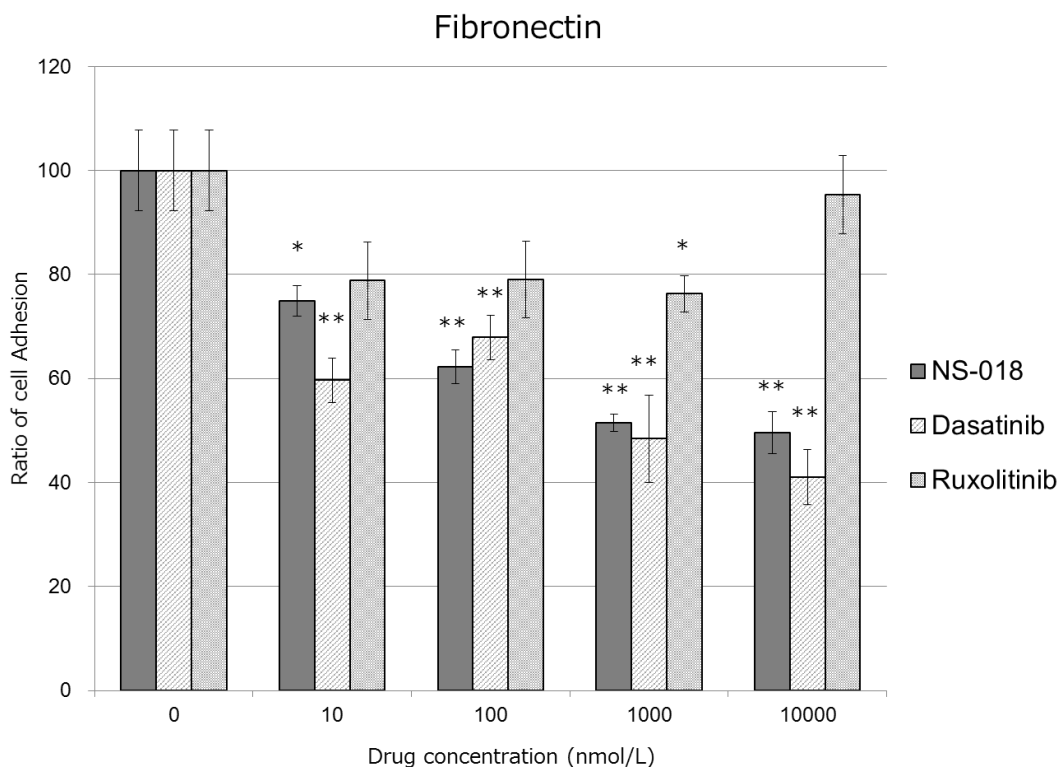


#### Figure 4-1 Inhibition of cell adhesion to collagen type 1 by NS-018

RPMI 8226 cells were treated with the indicated concentrations of tyrosine kinase inhibitor for 30 min and then seeded on a 96-well plate coated with collagen type 1 and incubated for 1h. The unattached cells were then gently washed off and the attached cells were stained with 0.05% crystal violet. The dye was dissolved with 50% ethanol and the absorbance at 595 nm was measured. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). Statistical significance was determined by Dunnett's test (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01 vs. 0 nmol/L).

### 4.3.2. 多発性骨髄腫細胞とフィブロネクチンの結合 に対する NS-018 の作用

RPMI 8226 と接着分子フィブロネクチンの結合に対する NS-018 の作用を検討した。RPMI 8226 細胞と NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib (0、10、100、1000、10000 nmol/L) を 37°C、5%CO<sub>2</sub>環境で 30 分インキュベート後、フィブロネクチンコーティングプレート (Fibronectin coated 96well plate (Corning、米国)) に播種した。37°C、5%CO<sub>2</sub>環境で 1 時間インキュベートした後、接着細胞数を測定した。その結果、NS-018 およびダサチニブは濃度依存的にフィブロネクチンと結合する RPMI 8226 細胞数を減少した。一方 Ruxolitinib では減少しなかった (Figure 4-2)。



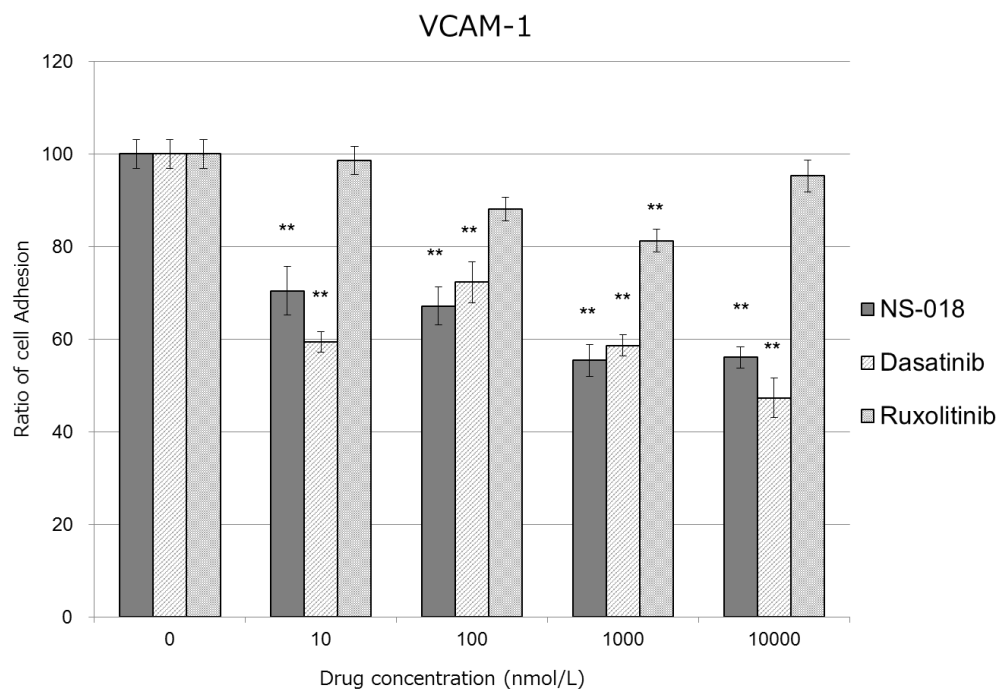
**Figure 4-2 Inhibition of cell adhesion to fibronectin by NS-018**

RPMI 8226 cells were treated with the indicated concentrations of tyrosine kinase inhibitor for 30 min and then seeded on a 96-well plate coated with fibronectin and incubated for 1h. The unattached cells were then gently washed off and the attached cells were stained with 0.05% crystal violet. The dye was dissolved with 50% ethanol and the absorbance at 595 nm was measured. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). Statistical significance was determined by Dunnett's test (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01 vs. 0 nmol/L).

### 4.3.3. 多発性骨髄腫細胞と VCAM-1 の結合に対する NS-018 の作用

次に RPMI 8226 と接着分子 VCAM-1 の結合に対する NS-018 の作用を検討した。RPMI 8226 細胞と NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib (0、10、100、1000、10000 nmol/L) を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で 30 分インキュベートした後、VCAM-1 をコーティングした 96well プレートに播種した。37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で 1 時間インキュベートした後、接着細胞数を測定した。その結果、NS-018 およびダサチニブにより濃度依存的に

VCAM-1 と結合する RPMI 8226 細胞数が減少した。Ruxolitinib ではその作用は認められなかった (Figure 4-3)。



**Figure 4-3 Inhibition of cell adhesion to VCAM-1 by NS-018**

RPMI 8226 cells were treated with the indicated concentrations of tyrosine kinase inhibitor for 30 min and then seeded on a 96-well plate coated with VCAM-1 and incubated for 1h. The unattached cells were then gently washed off and the attached cells were stained with 0.05% crystal violet. The dye was dissolved with 50% ethanol and the absorbance at 595 nm was measured. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). Statistical significance was determined by Dunnett's test (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01 vs. 0 nmol/L).



## 4.4. 考察

本章において骨髄腫細胞と細胞外マトリックスや接着分子との接着が NS-018 によって阻害されることが分かった。本結果は NS-018 が骨髄腫細胞と細胞外マトリックスおよび骨髄腫細胞と骨髄間質細胞の接着を抑制する作用をもつことを示唆している。また、Src キナーゼ阻害剤ダサチニブにおいても同様に骨髄腫細胞と細胞外マトリックスや接着分子との接着に対する阻害作用が認められた。一方、Src キナーゼ阻害作用を持たないことが明らかとなっている JAK1/2 キナーゼ阻害剤 Ruxolitinib (Quintás-Cardama et al. 2010) では接着阻害作用が認められなかったことから、NS-018 の接着阻害作用は Src キナーゼ阻害作用によるものと考えられる。接着分子インテグリンの下流に Src キナーゼが存在していることもこの仮説を支持する。

多発性骨髄腫細胞と微小環境の接着は薬剤抵抗性に関わることが報告されている (Hideshima et al. 2007)。骨髄腫細胞が骨髄間質細胞と接着すると骨髄間質細胞で NF- $\kappa$ B シグナル等が活性化し、IL-6 をはじめとするサイトカインが放出され、さらなる骨髄腫細胞の増殖促進、生存、薬剤抵抗性につながる。骨髄腫細胞と微小環境の相互作用は接着分子を介した接着による直接的な作用と、接着によって放出されるサイトカインを介した間接的な作用の両方により、骨髄腫細胞内での増殖シグナル促進や抗アポトーシスシグナルの活性化をもたらす。NS-018 はその直接的な作用を Src キナーゼ阻害作用により抑制し、間接的な作用を Chapter2 で検討した結果の通り JAK2 キナーゼ阻害作用により抑制することが予想され、両方の面から多発性骨髄腫に有用であると考えられる。

# Chapter5 破骨細胞に対する NS-018 の作用

## 5.1. 序文

多発性骨髄腫における骨破壊性病変は進行性であり、骨痛や骨折のため患者の QOL は大幅に低下し、日常動作が制限される。さらに進行すると高カルシウム血症や脊椎圧迫骨折による脊髄麻痺などを併発し、生命予後を悪化させる。

骨破壊は骨髄腫細胞由来の液性因子や骨髄腫細胞と微小環境との相互作用による骨吸収の促進、つまり骨融解に基づくと考えられている。破骨前駆細胞は、macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) により前破骨細胞へ分化が誘導されるとその細胞表面に receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) を発現するようになる。また骨吸収促進作用を持つサイトカインや生理活性物質は、骨髄間質細胞に作用し、破骨細胞の分化・活性化に必須である RANKL の発現を誘導する。前破骨細胞は RANKL を発現した骨髄間質細胞との相互作用により成熟破骨細胞へと分化し、活性化される。RANKL の作用は、おとり受容体である OPG により阻害される。骨破壊性病変を有する患者の骨髄腫細胞において MIP-1 $\alpha$  および MIP-1 $\beta$  の産生が亢進している (Hashimoto et al. 2004)。骨髄腫細胞が産生する MIP-1 $\alpha$  および MIP-1 $\beta$  は骨髄腫細胞の接着分子である VLA-4 を活性化し、骨髄間質細胞の VCAM-1 との接着を高めることにより、RANKL の発現亢進や OPG の産生抑制を引き起こす。多発性骨髄腫患者の骨髄生検検体では RANKL の発現が亢進し、OPG の発現が低下していることが報告されている (Pearse et al. 2001)。

Src キナーゼは RANKL シグナルや Wnt シグナルを介して骨代謝に関与している (Saad et al. 2009、Wada et al. 2006、Almeida et al. 2005)。Src 遺伝子を欠損したマウスでは破骨細胞活性化阻害剤による大理石骨病様の症状を呈する。(Soriano et al. 1991、Lowe et al. 1993) またダサチニブや AZD0530 といった Src 阻害剤が破骨細胞成熟分化を抑制すること、破骨細胞の骨吸収作用を抑制することが報告されている (Vandyke et al. 2010、Garcia-Gomez et al. 2012、de Vries et al. 2009)。これらのことから、Src シグナルは破骨細胞形成に重要な役割を果たしていると考えられるが、多発性骨髄腫における骨病変に対

する支持療法として臨床で使用されている Src キナーゼ阻害剤はない。

そこで本章では Src キナーゼ阻害作用をもつ NS-018 の破骨細胞成熟分化に対する作用およびマウスモデルを用いて多発性骨髄腫細胞による骨融解に対する作用を検討した。

## 5.2. 方法

### 5.2.1. 細胞培養

健常人由来ヒト破骨前駆細胞 (Lonza Inc.、米国) は専用培地 (osteoclast precursor basal medium (ロンザジャパン、東京)) 中で、RAW264.7 細胞 (DS ファーマバイオメディカル、大阪) は 10%FBS を含む DMEM (シグマアルドリッチジャパン、東京) 中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 5.2.2. TRAP 染色

培養 7 日目に培地を除き、4% パラホルムアルデヒド含有 PBS を加え、室温で 15 分間静置して固定した。PBS で 2 回洗浄後、EtOH : Acetone = 1 : 1 混合液を加え、1 分間静置して細胞を可溶化した。PBS で 2 回洗浄し、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) /alkaline phosphatase (ALP) stain kit (和光純薬、大阪) を加えて 37°C で 15 分間静置し染色した。顕微鏡下で観察し、赤く染色され且つ核を 3 個以上含む細胞を破骨細胞と見なし、細胞数を計測した。

### 5.2.3. 増殖アッセイ (MTT 法)

2.2.5 の方法に準じる。

### 5.2.4. 動物を用いた検討

#### ・動物の飼育

CB-17 SCID マウス (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl、日本クレア、東京) は 5 週齢、雌を購入し 1 週間の検疫後、6 週齢で使用した。飼育は温度 20~26°C、湿度 35~75%、換気 15

回以上/時間、照明時間 8:00～20:00 の条件下で行った。餌および水は自由に摂取させた。実験はすべて動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 26 年 5 月 30 日最終改正）に基づき定められた日本新薬株式会社の動物実験に関する社内規程に従い実施した。

#### ・RPMI 8226 頸骨移植モデル作製

多発性骨髄腫由来 RPMI8226 細胞を 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で培養し、300g、4℃で 3 分間遠心回収後、PBS で再懸濁して  $1 \times 10^8$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。マウスは体重を基に SAS (Ver. 9.3、SAS Institute、米国) を用いて層別無作為化法（乱塊法）で 3 群に群分けし、細胞懸濁液 10  $\mu$ L を左右の脛骨骨髓内に過去の報告を参考に移植した (27 Berlin et al. 2009)。翌日から溶媒または 50 mg/kg の NS-018 投与液を 1 日 2 回、5 週間連続で経口投与を行った。溶媒には 0.5% Methylcellulose を用いた。

#### ・骨形態計測

投与終了後に炭酸ガス吸入により安楽殺し、両後肢の脛骨を採取した。脛骨の標本作製および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、TRAP 染色は株式会社アプライドメディカルリサーチ (大阪) に委託した。HE 染色標本を顕微鏡付きカメラ (Olympus BX50、Olympus FX380) で撮影し、得られた画像の一定エリア内の組織面積および骨面積を計測した。骨面積を組織面積で除算した値を骨量とした。また TRAP 染色により染色された骨表面上の細胞数および骨表面の長さを計測した。細胞数を骨表面の長さで除算した値を活性化破骨細胞数とした。解析には Laica Qwin V3 (Leica Microsystems、ドイツ) を使用した。

### 5.2.5. 統計解析

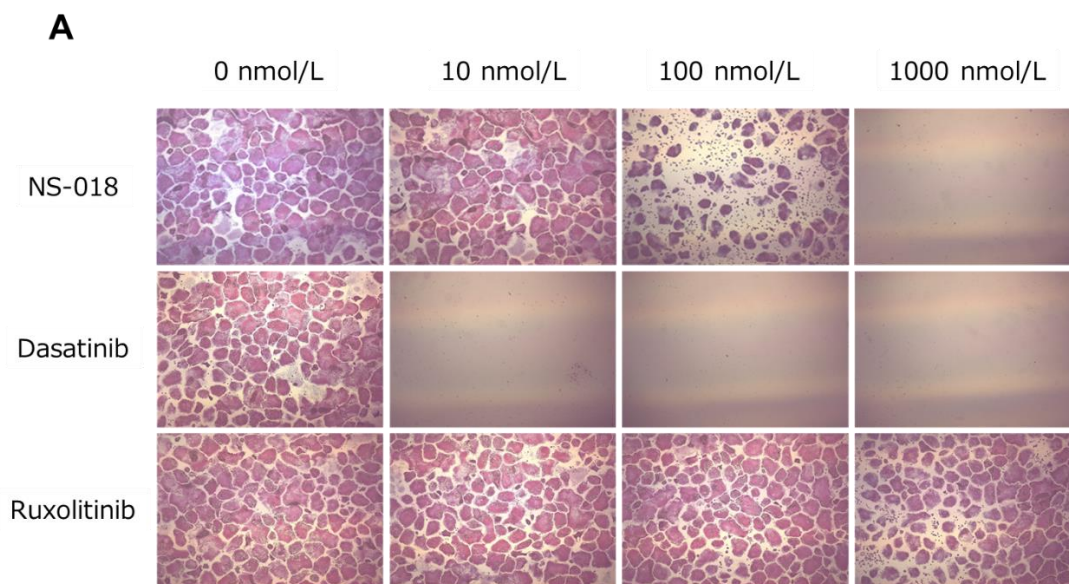
細胞を用いた成熟破骨細胞形成の検討においては各薬物について薬物濃度 0 nmol/L を対照群として Dunnett 検定を実施した。動物を用いた検討において骨量については Sham 群と Vehicle 群、Vehicle 群と NS-018 群に対して、また破骨細胞数については Vehicle 群と NS-018 群に対して Student の t 検定を行った。いずれも統計解析は SAS version 9.1.3 を用いて行い、危険率 5%未満を有意と判定した。

## 5.3. 結果

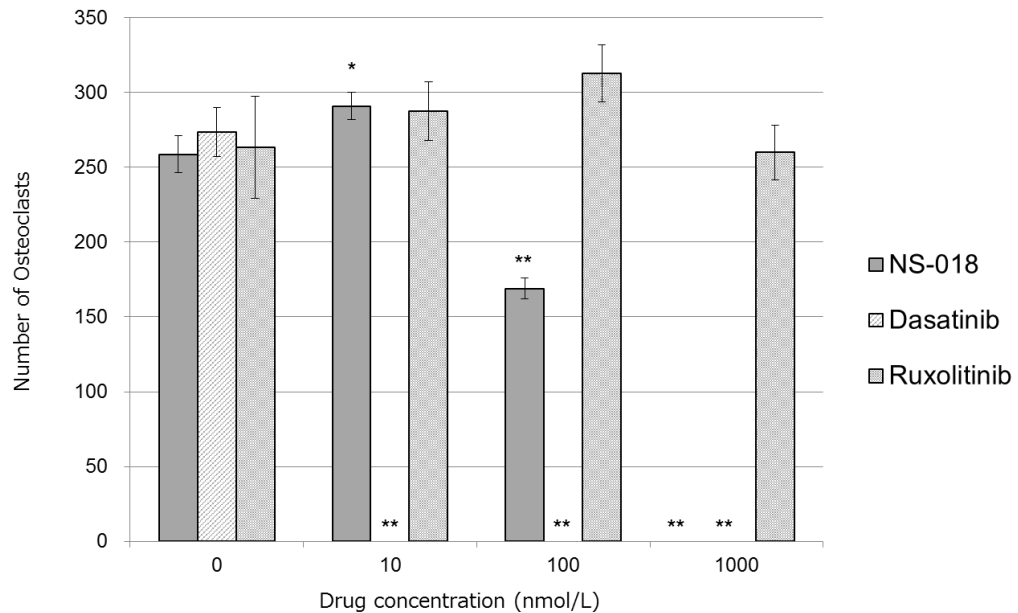
### 5.3.1 成熟破骨細胞形成に対する NS-018 の作用

Src キナーゼが破骨細胞の活性化に重要な役割を果たすという知見から、Src キナーゼ阻害作用を持つ NS-018 が破骨細胞の活性化抑制作用があると予想し、NS-018 の破骨細胞活性化に対する作用を検証した。

ヒト健常人破骨前駆細胞に可溶性 RANKL (66 ng/mL) と M-CSF (33 ng/mL) を添加し分化を促すとともに、NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib (0、10、100、1000 nmol/L) を添加した。37°C、5%CO<sub>2</sub>環境下で7日間インキュベートした後、TRAP 染色を行い TRAP 陽性の成熟多核破骨細胞数を計測した。その結果、NS-018 は 100 nmol/L で強く成熟破骨細胞の形成を阻害し、Bcr-Abl/Src キナーゼ阻害剤ダサチニブは 10 nmol/L で完全に成熟破骨細胞の形成を阻害した。一方、選択的 JAK1/2 キナーゼ阻害剤 Ruxolitinib は 1000 nmol/L においてもそのような作用は認められなかった (Figure 5-1)。



**B**



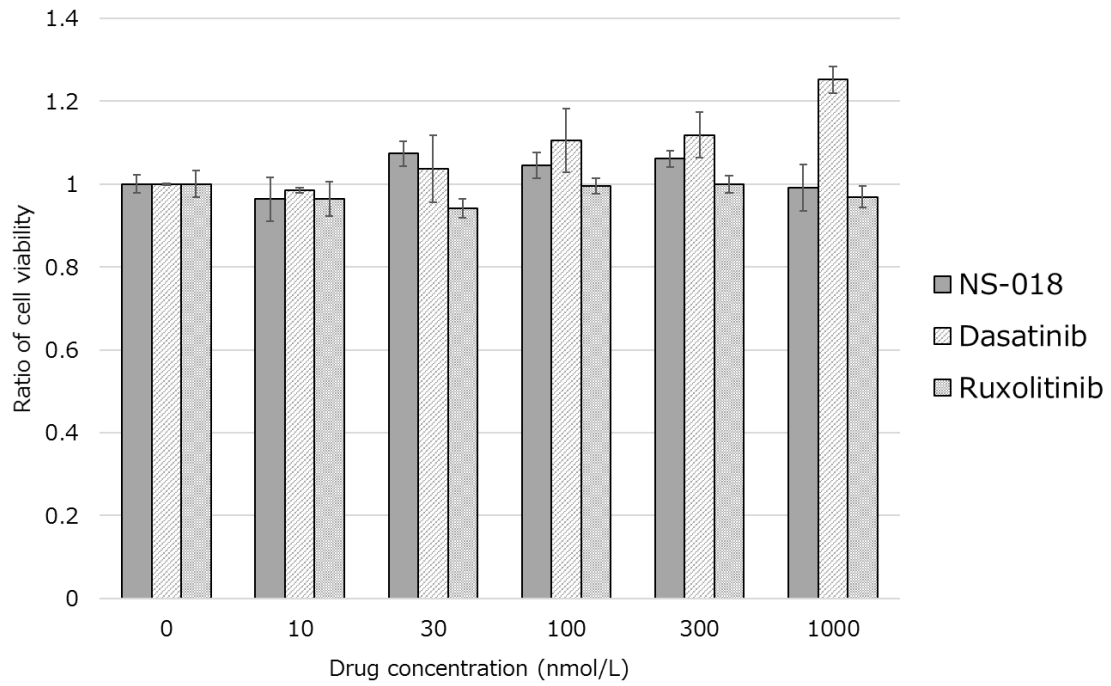
**Figure 5-1 Osteoclasts observed at various concentrations of tyrosine kinase inhibitors.**

(A) Cells that had differentiated to osteoclasts were stained magenta by TRAP staining. The images were photographed under phase-contrast microscopy. Original magnification x100 for all panels.

(B) Cells staining magenta with TRAP staining assay and containing more than three nuclei were counted as osteoclasts. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5). Statistical significance was determined by Dunnett's test (\*, P < 0.05 vs. 0 nmol/L).

### 5.3.2. RAW264.7 細胞増殖に対する NS-018 の作用

5.3.1 で認められた NS-018 の破骨細胞形成阻害作用が分化抑制作用ではなく細胞死誘導作用である可能性を検証する目的で、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞の増殖アッセイを行った。RAW264.7 細胞はヒト破骨前駆細胞と同様に RANKL によって成熟破骨細胞に分化することが知られている。RAW264.7 細胞に NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib (0、10、30、100、300、1000 nmol/L) を添加し、3 日間インキュベートした後に MTT 法にて細胞数を測定した。その結果、NS-018、ダサチニブおよび Ruxolitinib のいずれによっても RAW264.7 細胞数の減少作用は認められなかった (Figure 5-2)。



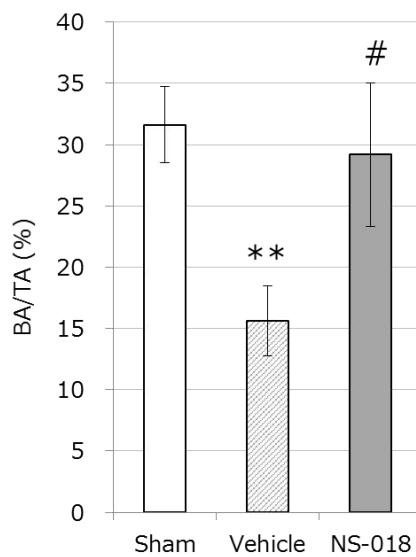
**Figure 5-2 Antiproliferative effect of NS-018 against RAW264.7.**

RAW264.7 cells incubated with the indicated concentrations of tyrosine kinase inhibitor for 3 days and cell viability was analyzed by MTT assay. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).



### 5.3.3. RPMI 8226 細胞脛骨移植モデルにおける骨量 に対する NS-018 の作用

多発性骨髄腫細胞による骨融解に対する NS-018 の作用を *in vivo* で検証するため、多発性骨髄腫細胞株 RPMI 8226 を CB-17 SCID マウスの脛骨内に直接注入するモデルを作製した。このモデルでは移植後 4-6 週間で骨融解が認められることが報告されている。(Diamond et al. 2009、Labrinidis et al. 2009) 動物 24 匹を 8 匹ずつ 3 群に分け、Sham 群は生理食塩水 (大塚生食注、徳島) を、Vehicle、NS-018 群は RPMI 8226 を移植した。移植した翌日から溶媒 (Sham 群、Vehicle 群) または NS-018 (50 mg/kg、NS-018 群) を 5 週間連続で 1 日 2 回経口投与した。投与期間終了後安楽殺させ、両足の脛骨を採取し切片作製後、HE 染色を行った。この用量においてマウスの体重減少や状態悪化は認められなかった。Sham 群と比べて Vehicle 群では核が大きく偏在している細胞が数多く観察されたことから、RPMI 8226 細胞が骨髄内に正着し、増殖したことが確認できた。骨量を計測したところ、Sham 群と比較して Vehicle 群で有意に減少しており、NS-018 群では減少が認められなかった (Figure 5-3)。採取の際に骨端が折れてしまった骨は計測から除外した。

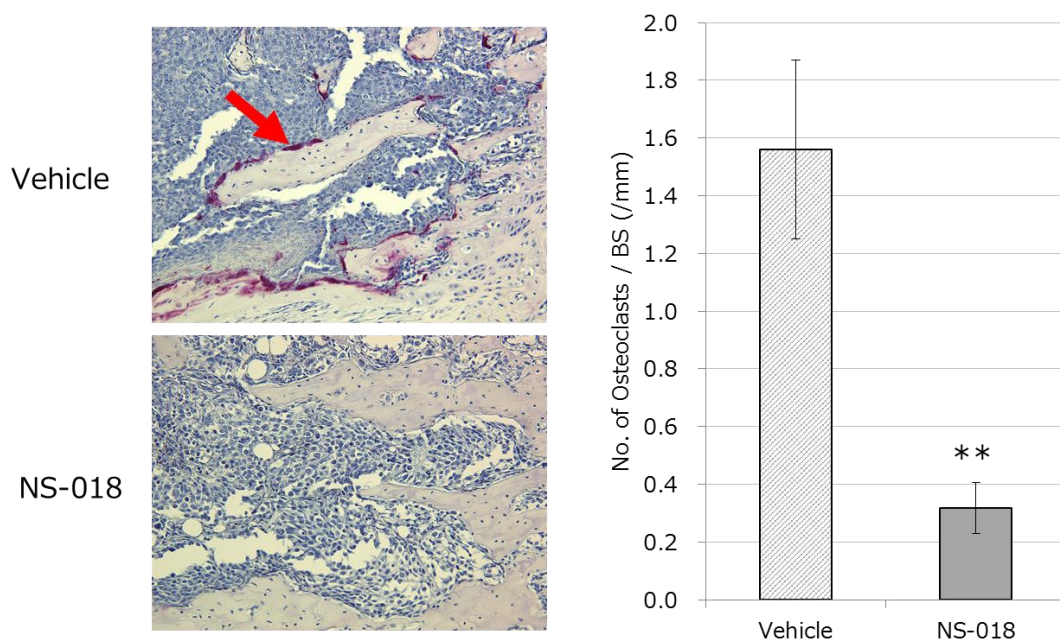


**Figure 5-3 NS-018 treatment suppresses osteolysis in mice with intratibial transplantation of RPMI 8226 cells.**

Hematoxylin-eosin-stained tibial sections from Sham mice (left micrograph) and myeloma-bearing mice (middle micrograph, vehicle-treated; right micrograph, treated with 50 mg/kg b.i.d. NS-018). Arrows indicate trabecular bone. Original magnification x40. In the graph showing the trabecular bone area as a percentage of the total tissue area, bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (Sham, n = 15; vehicle or NS-018 treated, n=11). Statistical significance was assessed by Student's t-test (\*\*, P < 0.01 vs. Sham; #, P < 0.05 vs. vehicle-treated).

### 5.3.4. RPMI 8226 細胞脛骨移植モデルにおける活性化破骨細胞数に対する NS-018 の作用

次に Vehicle 群と NS-018 群の脛骨切片で TRAP 染色を行った。活性化破骨細胞数を計測し、Vehicle 群と NS-018 群を比較した。その結果、Vehicle 群で多く認められた活性化破骨細胞は NS-018 群では減少していることが明らかとなった (Figure 5-4)。採取の際に骨端が折れてしまった骨は計測から除外した。



**Figure 5-4 NS-018 treatment suppresses the number of osteoclasts in mice with intratibial transplantation of RPMI-8226 cells.**

TRAP-stained section of tibia from myeloma-bearing mice (left micrograph, vehicle-treated; right micrograph, treated with 50 mg/kg b.i.d. NS-018). The arrow indicates a TRAP-stained osteoclast. Original magnification x200. In the graph showing the numbers of osteoclasts per millimeter lining the bone surface, bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (vehicle-treated, n = 10; NS-018-treated, n = 9). Statistical significance was assessed by Student's t-test (\*\*, P < 0.01 vs. vehicle-treated).

## 5.4. 考察

本章では NS-018 が破骨細胞の成熟分化を抑制する作用を持ち、骨髄中において多発性骨髄腫細胞株による骨融解作用を抑制することが示された。

まず 5.3.1 における検討結果より、NS-018 は破骨細胞の成熟分化を抑制する作用を持つことが示された。なお 5.3.2.において、細胞が異なるが NS-018 は破骨前駆細胞に対し細胞死誘導作用を持っていないことが示されたため、5.3.1.の結果は NS-018 が破骨前駆細胞に対して細胞死を誘導しているのではなく、成熟分化を抑制しているものと考えられる。また JAK1/2 キナーゼ阻害剤であり、Src キナーゼ阻害作用を有していない Ruxolitinib では成熟分化抑制作用は認められなかったことから、NS-018 の作用は Src キナーゼを介するものと考えられる。なお、抑制作用が NS-018 と比べてダサチニブで 10 倍以上強かったが、ダサチニブの酵素を用いた *in vitro* アッセイ系における Src キナーゼ阻害作用は IC<sub>50</sub> 値が 0.6 nM と報告されている (藤井裕 他, 2009)。一方、3.3.1.において NS-018 の Src キナーゼに対する IC<sub>50</sub> 値は 12 nM であった。実験条件が同じでないため単純に比較は出来ないが、10 倍以上ダサチニブの Src キナーゼ阻害剤が強いことが示唆される。よって、5.3.1.における検討においてもダサチニブが強く抑制したと考えられる。

多発性骨髄腫細胞株である RPMI 8226 細胞は MIP-1 や TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、RANKL といった破骨細胞活性化サイトカインを産生し、マウスの脛骨内に RPMI 8226 を投与すると、骨融解を引き起こす (Diamond et al. 2009、Labrinidis et al. 2009)。本研究においても、RPMI 8226 による海綿骨の骨融解が認められ、その骨融解は NS-018 投与によって抑制された。さらに、NS-018 投与によって活性化破骨細胞が減少した。一方、5.3.3.における HE 染色の結果から計測はしていないが核が大きくて偏在している細胞 (RPMI 8226) は減少していないようであった。これは、2.3.6.の検討において RPMI 8226 に対する NS-018 の増殖抑制作用は認められなかった結果と一致する。Chapter2 で考察したとおり、RPMI 8226 細胞の増殖は IL-6 に非依存であるためだと考えられる。これらのことから、マウスモデルにおける NS-018 による骨融解抑制作用はがん細胞の増殖を抑制したためではなく、活性化破骨細胞の減少作用によるものと示唆される。活性化破骨細胞の減少は 5.3.1.の検討結果のとおり Src キナーゼ阻害による破骨細胞の分化成熟抑制作用によるものの他に、Chapter4 で検討した NS-018 の接着阻害作用により NS-018 が RPMI 8226

と微小環境との相互作用を抑制することで、RPMI 8226 から分泌される破骨細胞活性化サイトカイン量を減少する間接的な作用も関与しているかもしれない。

Heusschen らはマウス多発性骨髄腫細胞株をマウスに移植したモデルにおいて Src キナーゼ阻害剤サラチニブが骨融解を抑制したことを報告している (Heusschen et al. 2016)。一方、ヒトの多発性骨髄腫細胞株をマウスに移植して Src キナーゼ阻害剤の薬効を示したのは本検討が初めてである。なお、2.3.6.の検討で NS-018 による増殖抑制作用が認められたヒト多発性骨髄腫細胞株 PCM6 は、増殖がヒト IL-6 に依存している細胞である。IL-6 はヒトとマウスで交差性がなく、PCM6 をマウスに移植してもマウス体内で増殖することが出来ないためマウスモデル作製に使用出来なかった。

骨のホメオスタシスは骨破壊と骨形成のバランスで成り立っている。多発性骨髄腫細胞は破骨細胞分化促進作用のみではなく、secretor frizzled-related protein-2 (sFRP-2) や Dickkopf-1 (DKK-1) などの骨芽細胞阻害因子を産生することにより、骨芽細胞の分化を抑制することも分かっている (Tian et al. 2003、Oshima et al. 2005)。多発性骨髄腫では骨吸収が亢進している一方で骨形成は抑制されており、これらにより著明な骨病変が形成されるのである。

Src キナーゼが破骨細胞の成熟分化に重要な役割を果たすことはよく知られていることだが、Src キナーゼ阻害剤が骨芽細胞の分化を促進するという報告があり、Src キナーゼは破骨細胞だけでなく、骨芽細胞の分化にも関与していると示唆されている。例えば Src キナーゼ阻害剤ダサチニブはやサラチニブ間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進する。(Lee et al. 2010、Id Boufker et al. 2010、Yang et al. 2010) 本研究において骨芽細胞に対する作用は未検討だが NS-018 も Src キナーゼ阻害作用により、骨芽細胞分化促進作用をもつ可能性が十分に考えられる。

## Chapter6 おわりに

以上の結果から、JAK2 キナーゼおよび Src キナーゼ阻害剤 NS-018 は多発性骨髄腫細胞の IL-6 依存性の細胞増殖を抑制するとともに、骨髄腫細胞と微小環境の接着を阻害することが分かった。さらに破骨細胞分化抑制作用を持ち骨髄腫細胞が誘導する骨融解を抑制することが示された (Figure 6)。NS-018 は多発性骨髄腫細胞の細胞増殖を直接抑制する作用を持つとともに、骨髄微小環境に働くことで既存薬に耐性を持つ骨髄腫細胞に有効である可能性がある。さらに、QOL 低下の原因となる骨融解を抑制する作用を持ち、骨関連事象の発生を抑制すると考えられる。これらのことから NS-018 は一剤で複数の作用を示すという、多発性骨髄腫患者に対する新たなコンセプトの新規薬剤となり得る。

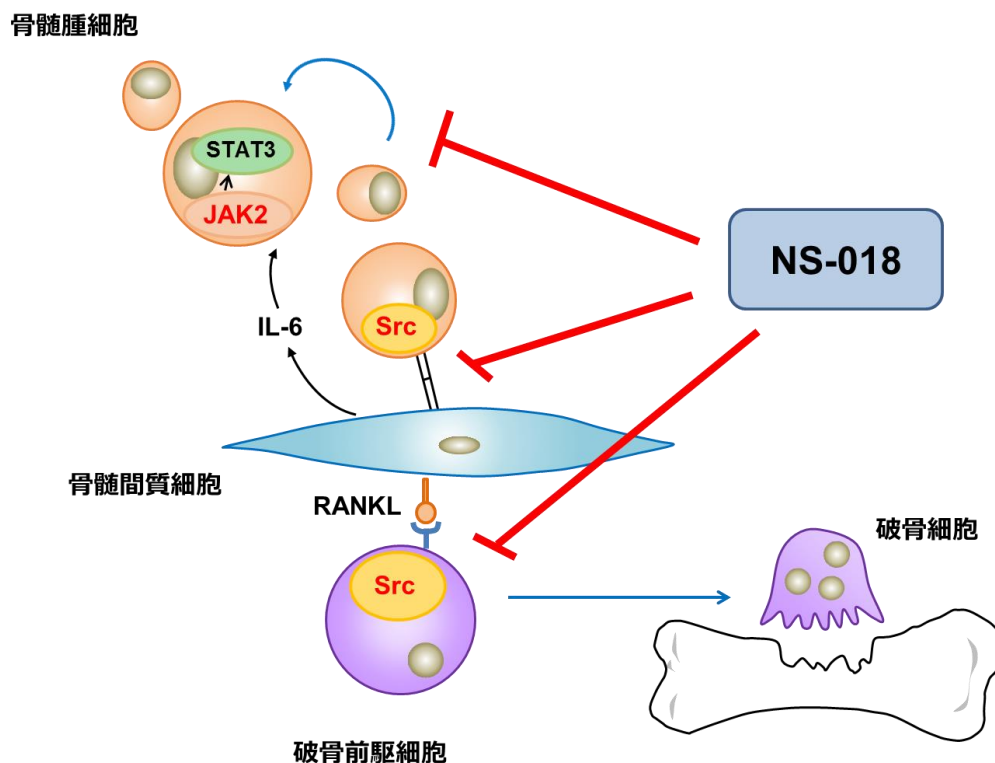


Figure 6 Hypothesis

プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブはプロテアソームの機能阻害、小胞体ストレスの誘導、活性酸素の蓄積によって直接的な抗腫瘍効果を示すとともに、血管新生抑制、サ

イトカイン分泌抑制といった骨髄微小環境への作用を介した間接的な作用により多発性骨髄腫に有効性を示し、従来の化学療法以上の治療効果を示している。しかし、ボルテゾミブに対する耐性獲得や不応例も報告されており、今もなお新規治療剤が求められている。NS-018 はプロテアソーム阻害剤と異なる機序で多発性骨髄腫細胞に薬効を示すため、それらの耐性化細胞や不応細胞にも有用であることが予想されるが、明らかにするためには今後、プロテアソーム阻害剤に不応の患者細胞や耐性細胞株を用いた検討等が必要である。また、NS-018 の有用性をさらに高めるために Chapter5 で考察したとおり、骨芽細胞に対する作用も検討したい。

NS-018 は骨髄線維症を対象に米国にて臨床試験実施中の薬剤である。骨髄線維症は、骨髄が線維化することで、正常な血液産生が妨げられる進行性の造血器腫瘍である。NS-018 は他の JAK キナーゼ阻害剤での治療において不耐容または再発・難治となった骨髄線維症患者に対し有効性を示すことが報告され、悪性度の高い骨髄線維症に対する新規薬剤として期待されている (Verstovsek et al. 2016)。また、NS-018 が骨髄異形成症候群患者のうち高リスク患者由来細胞に対し増殖を抑制し、リン酸化 STAT3 を抑制したことを報告している (Kuroda et al. 2014)。骨髄異形成症候群は造血幹細胞に異常が生じて正常な血液細胞が減少する疾患であるが、この結果から NS-018 は高リスク骨髄異形成症候群患者にも有用であることが示唆される。これらに加え本検討において、不応または耐性獲得の理由で現在の薬剤の有効性が低く悪性度の高い多発性骨髄腫患者に対する新たな薬剤として NS-018 が有用である可能性が示された。NS-018 は臨床試験にて 1 日 1 回 300 mg 投与における忍容性が良好であり、安全性に優れていることが分かっている。

造血器腫瘍は固形癌と比較すると希少な疾患ではあるが、薬物療法に高感受性である疾患が多く、慢性骨髄性白血病は分子標的薬の登場により著しく予後が改善した。一方感受性はあるものの再発を繰り返し、予後不良であり新規薬剤が望まれる疾患は依然として多い。本検討が多発性骨髄腫の新たな治療アプローチの足掛かりとなり、治療薬の開発を推進し、多発性骨髄腫患者の QOL および生命予後の向上につながることを期待したい。

# 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行する上において終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、ご校閲を頂きました金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 創薬科学専攻 薬理学研究室、金田勝幸教授に厚く御礼申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 創薬科学専攻 遺伝情報制御学研究室 松永司教授、同専攻 薬理学研究室 檜井栄一准教授、同専攻 分子生薬学 後藤（中川）享子准教授、同専攻 臨床分析科学 小川数馬准教授に感謝申し上げます。

また、共同研究者としてご協力いただきました日本新薬株式会社 創薬研究所 内藤はるな博士、倉本和也博士に厚く御礼申し上げます。

学位取得にあたり、特別休暇の取得など様々な面でご協力いただきました日本新薬株式会社 研開業務部 岡野昌彦部長、寺坂真紀子課長に厚く御礼申し上げます。

最後に、いつも励まし、温かく見守り、協力してくれた家族に深く感謝いたします。



## 引用文献

Saad F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*. 2007;110(8):1860-1867.

Richardson PG, San Miguel JF, Moreau P, Hajek R, Dimopoulos MA, Laubach JP, et al. Interpreting clinical trial data in multiple myeloma: translating findings to the real-world setting. *Blood Cancer J*. 2018;8(11):109.

Raje N, Terpose E, Willenbacher W, Shimizu K, Garcia-Sanz R, Durie B, et al. Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomized, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):370-381.

Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 585–598.

Saad F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*. 2007; **110**: 1860–1867.

Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer*. 2003; **97**: 2440–2452.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798-809.

Beldi-Ferchiou A, Skouri N, Ben Ali C, Safra I, Abdelkefi A, Ladeb S, et al. Abnormal repression of SHP-1, SHP-2 and SOCS-1 transcription sustains the activation of the JAK/STAT3 pathway and the progression of the disease in multiple myeloma. *PLoS ONE* 12(4):e0174835.

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11581-11586.

Hashimoto T, Abe M, Oshima T, Shibata H, Ozaki S, Inoue D, et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2004;125(1):38-41.

Nakaya Y, Shide K, Niwa T, Homan J, Sugahara S, Horio T, et al. Efficacy of NS-018, a potent and selective JAK2/Src inhibitor, in primary cells and mouse models of myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J*. 2011;1(7):e29.

Nakaya Y, Shide K, Naito H, Niwa T, Horio T, Miyake J, et al. Effect of NS-018, a selective JAK2V617F inhibitor, in a murine model of myelofibrosis. *Blood Cancer J* 2014; 4: e174. doi: 10.1038/bcj.2013.73.

Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):287-96.

Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(10):1307-16.

Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-35.

De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen- activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol*. 2000;109:823–828.

Pedrazzini L, Dechow T, Berishaj M, Comenzo R, Zhou P, Azare J, et al. Pyridone 6, A Pan-Janus-Activated Kinase Inhibitor, Induces Growth Inhibition of Multiple Myeloma Cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9714-9721.

Li J, Favata M, Kelley JA, Caulder E, Thomas B, Wen X, et al. INCB16562, a JAK1/2 selective inhibitor, is efficacious against multiple myeloma cells and reverses the protective effects of cytokine and stromal cell support. *Neoplasia*. 2010;12(1):28-38.

Scuto A, Krejci P, Popplewell L, Wu J, Wang Y, Kujawski M, et al. The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. *Leukemia*. 2011;25(3):538-550.

Monaghan KA, Khong T, Burns CJ, Spencer A. The novel JAK inhibitor CYT387 suppresses multiple signalling pathways, prevents proliferation and induces apoptosis in phenotypically diverse myeloma cells. *Leukemia*. 2011;25(12):1891-1899.

Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*. 2010;115(17):3541-3552.

Ikedioji ON, Davies H, Bignell G, Edkins S, Stevens C, O'Meara S, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(11):2606-2612.

Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest*. 1989;84(6):2008–2011.

Merico F, Bergui L, Gregoretti MG, Ghia P, Aimo G, Lindley IJ, et al. Cytokines involved in the progression of multiple myeloma. *Clin Exp Immunol*. 1993;92(1):27-31.

Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):516-523.

Aoudfit F, Vuori K. Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:283181.

Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshour T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109-3117.

Saad F. Src as a therapeutic target in men with prostate cancer and bone metastases. *BJU Int*. 2009;103(4):434-440.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25.

Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem*. 2005;280(50):41342-41351.

Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*. 1991;64(4):693-702.

Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P. Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(10):4485-4489.

Vandyke K, Dewar AL, Diamond P, Fitter S, Schultz CG, Sims NA, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib dysregulates bone remodeling through inhibition of osteoclasts in vivo. *J Bone Miner Res*. 2010;25(8):1759-1770.

Garcia-Gomez A, Ocio EM, Crusoe E, Santamaria C, Hernandez-Campo P, Blanco JF, et al. Dasatinib as a bone-modifying agent: anabolic and anti-resorptive effects. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34914.

de Vries TJ, Mullender MG, van Duin MA, Semeins CM, James N, Green TP, et al. The Src inhibitor AZD0530 reversibly inhibits the formation and activity of human osteoclasts. *Mol Cancer Res*. 2009;7(4):476-488.

Diamond P, Labrinidis A, Martin SK, Farruqia AN, Gronthos S, To LB, et al. Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss. *J Bone Miner Res*. 2009;24(7):1150-1161.

Labrinidis A, Diamond P, Martin S, Hay S, Liapis V, Zinonos I, et al. Apo2L/TRAIL inhibits tumor growth and bone destruction in a murine model of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):1998-2009.

Heusschen R, Muller J, Binsfeld M, Marty C, Plougouven E, Dubois S, et al. SRC kinase inhibition with saracatinib limits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Oncotarget* 2016; 7: 30712–30729.

Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barloqie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349(26):2483-2494.

Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*. 2005;106(9):3160-3165.

Lee YC, Huang CF, Murshed M, Chu K, Araujo JC, Ye X, et al. Src family kinase/abl inhibitor dasatinib suppresses proliferation and enhances differentiation of osteoblasts. *Oncogene*. 2010;29(22):3196-3207.

Id Boufker H, Lagneaux L, Najar M, Piccart M, Ghanem G, Body JJ, et al. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *BMC Cancer*. 2010;10:298.

Yang JC, Bai L, Yap S, Gao AC, Kung HJ, Evans CP. Effect of the specific Src family kinase inhibitor saracatinib on osteolytic lesions using the PC-3 bone model. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1629-1637.

Verstovsek S, Talpaz M, Ritchie EK, Wadleigh M, Odenike O, Jamieson C, et al. Phase 1/2 Study of NS-018, an Oral JAK2 Inhibitor, in Patients with Primary Myelofibrosis (PMF), Post-Polycythemia Vera Myelofibrosis (postPV MF), or Post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis (postET MF). *Blood* 2016 128:1936;

Kuroda J, Kodama A, Chinen Y, Shimura Y, Mizutani S, Nagoshi H et al. NS-018, a selective JAK2 inhibitor, preferentially inhibits CFU-GM colony formation by bone marrow mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*. 2014;38(5):619-624

金倉 譲、伊豆津 宏二、プリンシプル血液疾患の臨床 リンパ腫・骨髄腫の最新療法、中山書店、2014年

大森 崇、加藤 麻矢子、医薬安全性研究会モノグラム・シリーズ No4. 細胞毒性試験の ED<sub>50</sub> 推定法—原理・SAS プログラム・使い方—、サイエンティスト社、東京、1998 年

藤井 裕、天野 学、芹生 卓、慢性骨髄性白血病およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病治療薬ダサチニブ（スプリセル®錠 20 mg, 50 mg）の薬理学的特性および臨床効果、日薬理誌（Folia Pharmacol. Jpn.）134, 159-167（2009）