View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Kanazawa University Repository for Academic Resources

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

著者	本田 歩美
著者別表示	Honda Ayumi
雑誌名	博士論文要旨Abstract
学位授与番号	13301甲第4888号
学位名	博士(創薬科学)
学位授与年月日	2019-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/00058891

doi: https://doi.org/10.1038/s41408-018-0098-z

Creative Commons : 表示 - 非営利 - 改変禁止
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.ja

氏　　　　　名	本田　歩美
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲 261 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第４条第１項）
学位授与の題目	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
論文審査委員	主査　金田　勝幸
	副査　松永　司
	副査　後藤（中川）享子
	副査　小川　数馬
	副査　檜井　栄一

学位論文要旨

Autocrine and paracrine secretion of proliferation and differentiation cytokines by myeloma cells and bone marrow stromal cells is involved in the pathology of multiple myeloma (MM). Osteoclast differentiation factors induce aberrant osteoclast activation leading to osteolysis. Janus kinase 2 (JAK2) and Src kinase play important roles in the downstream effects of these proliferation and differentiation cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). We have investigated the effect of NS-018, a JAK2/Src kinase dual inhibitor, on the IL-6/JAK2 signaling pathway in myeloma cell lines and myeloma-induced osteolysis. NS-018 suppressed the IL-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and the proliferation of myeloma cells in a dose-dependent manner. NS-018 inhibited the adhesion of myeloma cells to cell-adhesion molecules. NS-018 also suppressed RANKL-induced osteoclast formation in vitro. To confirm the anti-osteolytic activity of NS-018 in vivo, we administered NS-018 to the mice model of MM-induced focal osteolysis. NS-018 suppressed the MM-induced osteolysis of trabecular bone and osteoclast activation. These findings suggest that Src kinase inhibition is a potential new therapeutic approach to MM complicated by osteolysis. NS-018 may have multiple therapeutic effects on the pathogenesis of MM by blocking the JAK2/Src signaling pathway.

【背景・目的】

多発性骨髄腫は形質細胞が腫瘍化する血液がんであり、溶骨性変化を特徴とする。病態形成には骨髄腫細胞と骨髄微小環境の相互作用が密接に関連している。骨髄腫細胞や骨髄間質細胞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、骨融解をもたらす。サイトカインの例として、interleukin-6（IL-6）や receptor activator of NF-kappaB ligand（RANKL）があり、そのシグナル伝達には Janus kinase 2（JAK2）キナーゼや Src キナーゼが重要な役割を果たしている。移植非適用の多発性骨髄腫患者には従来の化学療法に加えて近年ではプロテアソーム阻害剤や免疫調節剤といった新規薬剤が使用されている。しかし依然として完治は困難であり、多くの患者で再発することから、新たなメカニズムの薬剤が求められている。NS-018 は日本新薬で創製され、骨髄線維症を対象に臨床試験を実施中の ATP 競合型の JAK2 キナーゼ阻害剤である。他社の JAK キナーゼ阻害剤と異なり、JAK2 キナーゼと共に Src キナーゼを強く阻害するという特徴を持つ。本研究では 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証した。

【方法】

1. IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用

複数の多発性骨髄腫細胞株を用いて、IL-6 の添加による signal transducer and activator of transcription 3（STAT3）のリン酸化およびリン酸化 STAT3 に対する NS-018 の作用を Western blotting（W.B.）法を用いて検討した。さらに、多発性骨髄腫細胞株 PCM6 における IL-6 の細胞増殖亢進作用およびその増殖に対する NS-018 の作用を MTT 法にて検討した。

2. Src キナーゼに対する NS-018 の作用

まず酵素を用いたキナーゼアッセイによって NS-018 の Src 阻害作用を検討した。次に 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い、その結合様式を NS-018 と JAK2 キナーゼの結合様式と比較した。さらに、NIH3T3/v-Src 細胞や多発性骨髄腫細胞株を用いて細胞における Src キナーゼシグナルに対する NS-018 の作用を W.B.法を用いて検討した。

3. 細胞接着に対する NS-018 の作用

多発性骨髄腫細胞株 RPMI 8226 を接着分子や細胞外マトリックスとして知られる I 型コラーゲンまたはフィブネクチンまたは VCAM-1 がコーティングされたプレートに播種した後、NS-018 または Src キナーゼ阻害剤ダサチニブまたは JAK1/2 キナーゼ阻害剤 Ruxolitinib を添加し、一定時間後の接着細胞数を測定した。

4. 破骨細胞に対する NS-018 の作用

ヒト破骨前駆細胞に分化誘導因子を加え、NS-018 またはダサチニブまたは Ruxolitinib を添加し、7 日間培養後に Tartrate-Resistant Acid Phosphatase（TRAP）染色を行い、成熟多核破骨細胞数を測定した。次に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、RPMI 8226 脛骨移植マウスモデルを作製した。移植した翌日から 5 週間連続で 1 日 2 回 NS-018（50 mg/kg）を経口投与した。投与終了後、マウスを安楽殺させ脛骨を採取して標本を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色および TRAP 染色を行い、海綿骨量および活性化破骨細胞数を測定した。

【結果】

1. IL-6/JAK2/STAT3 シグナルに対する NS-018 の作用

用いた全ての多発性骨髄腫細胞株において IL-6 の添加によりリン酸化 STAT3 量の上昇が認められた。そのリン酸化 STAT3 の上昇を NS-018 は濃度依存的に減少した。PCM6 において IL-6 の添加により細胞増殖の亢進が認められ、亢進した細胞増殖を NS-018 は濃度依存的に抑制した。

2. Src キナーゼに対する NS-018 の作用

酵素を用いたキナーゼアッセイ系において NS-018 は Src キナーゼを 12 nM の IC_{50} で阻害した。ドッキング解析によって 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）と近接していることが示され、JAK2 キナーゼにおける Gly のように、この位置のアミノ酸残基のサイズが小さいことが分かった。細胞を用いた検討において NS-018 によるリン酸化 Src およびその下流に存在するリン酸化 FAK の抑制が認められた。

3. 細胞接着に対する NS-018 の作用

いずれの接着分子コーティングプレートにおいても、接着する RPMI 8226 細胞数は NS-018 およびダサチニブによって減少した。一方 Src キナーゼ阻害作用を持たない Ruxolitinib ではその作用は認められなかった。

4. 破骨細胞に対する NS-018 の作用

NS-018 およびダサチニブは成熟破骨細胞の形成を抑制し、一方 Ruxolitinib でその作用は認められなかった。RPMI 8226 細胞を脛骨に移植したマウスでは海綿骨量が有意に減少したのに対し、NS-018 投与群では海綿骨量の減少は認められなかった。また、NS-018 を投与したマウスでは成熟破骨細胞数が少ないことが分かった。

【考察】

本研究結果より、JAK2/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。さらに破骨細胞活性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。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つ。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。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。

審査結果の要旨

本研究は、完治が難しく予後不良である多発性骨髄腫に対する新規治療薬の開発を目的とした。多発性骨髄腫の病態には骨髄微小環境との相互作用が深く関与している。骨髄腫細胞は骨髄間質細胞から分泌される Interleukin-6（IL-6）等のサイトカインにより増殖が亢進し、また、骨髄間質細胞との接着により薬剤耐性を獲得する。さらに相互作用による破骨細胞の活性化は骨融解をもたらすことが知られている。これらに Janus kinase（JAK2）キナーゼまたは Src キナーゼが関与していることに着目し、JAK2/Src キナーゼ阻害剤 NS-018 の有用性を検討した。その結果、NS-018 は骨髄腫細胞において IL-6 刺激による JAK2/signal transducer and activator of transcription-3（STAT3）シグナルを抑制し、IL-6 依存性の細胞増殖を抑制した。また、NS-018 は Src/Focal adhesion kinase（FAK）シグナル抑制作用により骨髄腫細胞と接着分子の結合を抑制した。さらに、骨融解マウスモデルにおいて、NS-018 は破骨細胞分化を抑制することで骨融解を抑制した。

以上の研究成績は、NS-018 が多発性骨髄腫に対する新規薬剤として有用である可能性を示すとともに、一剤で複数の作用を示すという新たなコンセプトを示し、さらなる治療薬開発の足がかりとなると期待できる。多発性骨髄腫治療の進歩に貢献できると考えられる点で評価できるため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。