

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590224

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における抗癌剤耐性機序の解明とシグナル伝達阻害薬を用いた耐性克服

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of anti-cancer drugs resistance and therapeutic strategy in multiple myeloma

研究代表者

西田 升三 (NISHIDA, Shozo)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：40208187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多発性骨髄腫細胞において種々の抗癌剤耐性株を樹立し、耐性獲得機序の解析を行い、Src活性化に基づくMDR1、Survivinの過剰発現及びBimの発現低下が関与することを見出した。さらに、Srcを阻害する分子標的薬によりMDR1、Survivinの発現低下、Bimの発現上昇を介して抗癌剤耐性を克服することを明らかにした。以上の結果は、臨床における抗癌剤耐性多発性骨髄腫出現時における治療に貢献できる可能性が考えられる。なお、本研究成果は発表論文の項にの8報に公表済みである。

研究成果の概要(英文)：To investigate the underlying mechanisms associated with resistance to anti-cancer drugs, we established anti-cancer drug-resistant multiple myeloma (MM) cell lines. The resistant cell lines overexpressed MDR1 and survivin, or showed decreased Bim expression through activation of Src. In addition, dasatinib reversed the drug-resistance of the drug-resistant cell lines. These findings suggest that Src inhibitors are potentially useful as an anti-MDR agent for the treatment of malignant tumor cells. As well, These results are summarized as section of presented paper.

研究分野：医療薬学

キーワード：抗癌剤耐性 分子標的薬 多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は予後不良の造血器腫瘍で、化学療法に頻りに抵抗性(抗癌剤耐性)を示す。この抗癌剤耐性には、multidrug resistant protein 1 (MDR1)、Multidrug resistance-associated Protein 1 (MRP1)、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) などの ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター、グルタチオンなどの高発現が報告されているが、その詳細は明らかではない。

また近年、多発性骨髄腫の薬剤耐性に cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) と呼ばれる耐性機序が注目されている。この CAM-DR は多発性骨髄腫細胞が骨髄の造血支持細胞に接着することにより、多発性骨髄腫細胞の生存シグナルが増強されるとともに、ABC トランスポーターの発現が増加することが示されている。さらに CAM-DR にはインテグリンなどの接着因子の関与が報告されているが、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では多発性骨髄腫における抗癌剤耐性獲得機構の解明及び克服法の開発を目的として、抗癌剤耐性細胞を樹立し、その耐性因子の解析を行った。また、耐性因子の発現には種々の生存シグナルの活性化が重要であることが考えられ、そのシグナル伝達経路を同定することは抗癌剤耐性を克服する治療標的となりえる。これらのことから、シグナル活性化の解析を行い、抗癌剤耐性克服法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤耐性株はアドリアマイシン (ADM)、ビンクリスチン (VCR)、デキサメタゾン (DEX)、メルファラン (L-PAM) を処理することで作製した。

(2) 細胞死の確認はトリパンブルー染色法により検討した。

(3) シグナル伝達因子及び耐性因子の確認はウエスタンブロッティング法により検討した。

4. 研究成果

本研究において作成した耐性株が抗癌剤に耐性を示すか検討した結果、ADM 耐性株 (RPMI8226/ADM)、VCR 耐性株 (RPMI8226/VCR)、DEX 耐性株 (RPMI8226/DEX)、L-PAM 耐性株 (RPMI8226/L-PAM) において、耐性が獲得されていることを認めた(図1)。

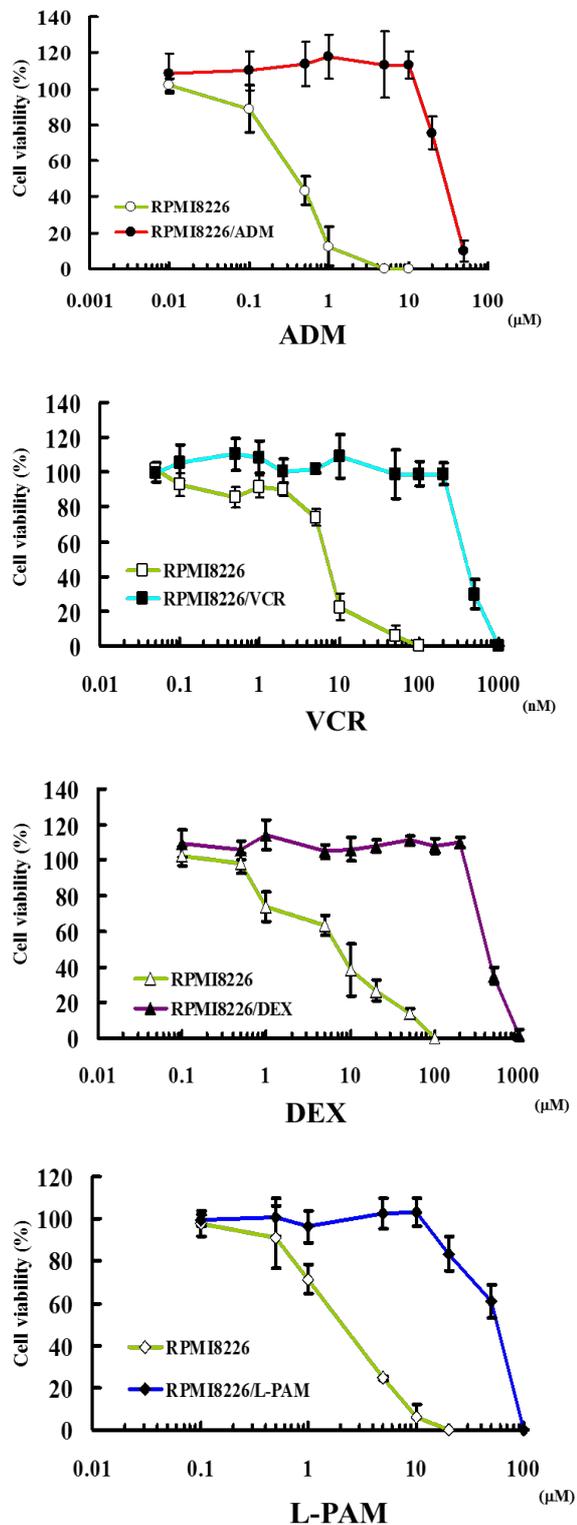


図1. 薬剤感受性の確認

次にこれら抗癌剤耐性を用いて耐性獲得因子の検討を行った。その結果、ABC トランスポーターである MDR1、細胞生存因子である Survivin の発現増加、細胞死促進因子である Bim の発現低下を認めた(図2)。

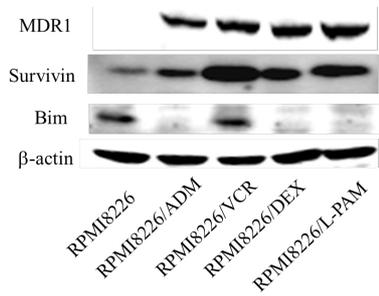


図 2 . 抗癌剤耐性因子の確認

MDR1、Survivin、Bim の発現調節にはシグナル伝達因子の活性化が関与することが考えられる。このため、上記の耐性因子の発現に関わり、多発性骨髄腫で活性化が示されている Src に着目し、その活性化を検討した。その結果、全ての耐性株において Src の活性化を認めた ( 図 3 )。

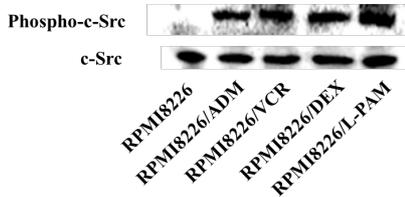


図 3 . Src 活性化の確認

上記の結果から Src 活性化により MDR1、Survivin 及び Bim の発現が調節されている可能性が考えられたため、Src 阻害薬である dasatinib により抗癌剤耐性が克服されることが考えられる。そこで dasatinib 併用することで抗癌剤耐性が克服されるか検討を行った。その結果、RPMI8226/ADM 細胞において dasatinib 添加により MDR1、Survivin の発現減少、Bim の発現が増加することを認め、ADM と併用することにより抗癌剤耐性を克服することを明らかにした ( 図 4 )。

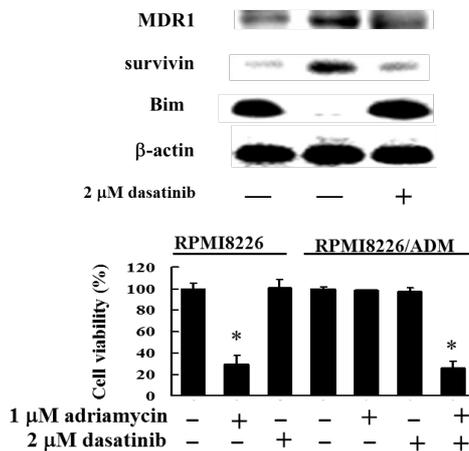


図 4 . Dasatinib 添加による抗癌剤耐性因子の発現への影響と耐性克服効果

さらに、dasatinib が CAM-DR も抑制するかについて検討を試みた。その結果、dasatinib

添加により、骨髄間質細胞との共培養で得られた抗癌剤耐性が克服されることを認めた ( 図 5 )。

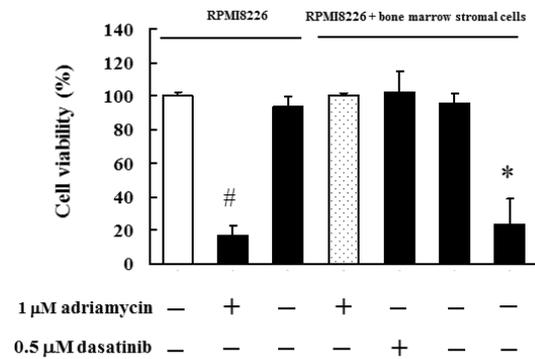


図 5 . Dasatinib による CAM-DR 抑制効果

以上の結果から、多発性骨髄腫における抗癌剤耐性には MDR1、Survivin 及び Bim の発現調節が重要であり、この発現調節には Src の活性化が関与することが明らかとなった。さらに Src の活性化を抑制する分子標的薬が抗癌剤耐性を克服することが示唆された。また、Src 阻害薬は CAM-DR も抑制することが明らかとなった。これらの結果から、臨床における抗癌剤耐性多発性骨髄腫出現時において Src 阻害薬が耐性克服に有用である可能性が期待できる。

なお、今回の科学研究費補助金による研究成果は下記、発表論文の 8 報に公表済みである。

### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

今回の科学研究費補助金による研究成果は下記、発表論文の 8 報に公表済みである。

( 雑誌論文 )( 計 8 件 )

- 1) Tsubaki M, Takeda T, Tani T, Shimaoka H, Suzuyama N, Sakamoto K, Fujita A, Ogawa N, Itoh T, Imano M, Funakami Y, Ichida S, Satou T, Nishida S. PKC/MEK inhibitors suppress oxaliplatin-induced neuropathy and potentiate the antitumor effects., *Int J Cancer.*, 137, 243-50, 2015, 査読有. DOI: 10.1002/ijc.29367.
- 2) Tsubaki M, Takeda T, Ogawa N, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Ishizaka T, Satou T, Nishida S. Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells., *Leuk Res.*, 39, 445-52, 2015, 査読有. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.01.016.
- 3) Tsubaki M, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Mashimo K, Fujiwara D, Sakaguchi K,

- Satou T, Nishida S. Bisphosphonates and statins inhibit expression and secretion of MIP-1 via suppression of Ras/MEK/ERK/AML-1A and Ras/PI3K/Akt/AML-1A pathways., *Am J Cancer Res.*, 5, 168-79, 2014, 査読有.
- 4) Tsubaki M, Ogawa N, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Dimethyl fumarate induces apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of NF- B nuclear translocation and down-regulation of Bcl-xL and XIAP., *Biomed Pharmacother.*, 68, 999-1005, 2014, 査読有. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.09.009.
  - 5) Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Takeda T, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Mukai J, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit RANKL- and M-CSF-induced osteoclast formation through the inhibition of ERK1/2 and Akt activation., *J Biomed Sci.*, 21, 10, 2014, 査読有. DOI: 10.1186/1423-0127-21-10.
  - 6) Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Takeda T, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Mukai J, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. By inhibiting Src, verapamil and dasatinib overcome multidrug resistance via increased expression of Bim and decreased expressions of MDR1 and survivin in human multidrug-resistant myeloma cells., *Leuk Res.*, 38, 121-30, 2014, 査読有. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.10.017.
  - 7) Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Takeda T, Mukai J, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Inhibition of the tumour necrosis factor-alpha autocrine loop enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to anticancer drugs., *Eur J Cancer.*, 49, 3708-17, 2013, 査読有. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.07.010.
  - 8) Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Komai M, Nishinobo M, Yamashita M, Yanae M, Yamazoe Y, Nishida S. Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells., *Leuk Res.*, 36, 1315-22, 2012, 査読有. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.07.003.
- [学会発表](計 14 件)
- 1) 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 藤田 亜里沙, 小川 直希, 眞下 恵次, 藤原 大一郎, 山添 謙, 阪口 勝彦, 石坂 敏彦, 西田 升三. Bisphosphonates 及び statins による多発性骨髄腫での MIP-1 分泌抑制効果. 日本薬学会 第 135 年会. 2015 年 3 月 26 日 神戸薬科大学 神戸
  - 2) 橋口 りえ, 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 藤田 亜梨沙, 西田 升三. DMF による NF- B 阻害を介した造血器腫瘍でのアポトーシス誘導効果. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 京都薬科大学 京都
  - 3) 上田 絵美, 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 藤田 亜梨沙, 西田 升三. 造血器腫瘍でのインテグリンを介した抗がん剤耐性機序. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 京都薬科大学 京都
  - 4) 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 藤田 亜梨沙, 西田 升三. 多発性骨髄腫での薬剤排泄トランスポーターとアポトーシス調節因子の発現調節を介した抗がん剤耐性機序の解明. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 京都薬科大学 京都
  - 5) 藤田 亜梨沙, 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 小川 直希, 山添 謙, 向井 淳治, 西田 升三. Src 阻害に基づく抗がん剤耐性多発性骨髄腫での耐性克服効果. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜 横浜
  - 6) 榎 正寛, 武田 朋也, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 藤田 亜里沙, 眞下 恵次, 藤原 大一郎, 阪口 勝彦, 西田 升三. RANK/RANKL によるシグナル伝達因子活性化を介した多発性骨髄腫での抗がん剤耐性獲得機序. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2014 年 6 月 27 日 仙台市情報・産業プラザ 宮城
  - 7) 小野 優里, 榎 正寛, 駒居 真紀子, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 小川 直希, 眞下 恵次, 藤原 大一郎, 向井 淳治, 阪口 勝彦, 西田 升三. Src 阻害を介した多発性骨髄腫での抗がん剤耐性克服機序. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2013 年 10 月 12 日 同志社女子大学 京都
  - 8) 西田 升三, 榎 正寛, 駒居 真紀子, 鳶岡 弘高, 坂本 洸太郎, 小川 直希, 眞下 恵次, 藤原 大一郎, 山添 謙, 阪口 勝彦, 向井 淳治. TNF-alpha オートクライン阻害による抗がん剤殺細胞作用増強効果. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 4 日 パシフィコ横浜 横浜
  - 9) 駒居 真紀子, 榎 正寛, 鳶岡 弘高,

坂本 洸太郎、小川 直希、眞下 恵次、  
藤原 大一郎、山添 譲、阪口 勝彦、  
向井 淳治、西田 升三。シグナル伝達  
因子活性化による多発性骨髄腫での抗がん  
剤耐性獲得機序。第 72 回日本癌学会  
学術総会。2013 年 10 月 3 日 パシフィコ  
横浜 横浜

- 10) 榎 正寛、駒居 真紀子、鳶岡 弘高、  
坂本 洸太郎、小川 直希、眞下 恵次、  
藤原 大一郎、山添 譲、向井 淳治、  
西田 升三。RANK/RANKL による多発性骨  
髄腫での抗がん剤耐性獲得機序。第 17  
回日本がん分子標的治療学会学術集会。  
2013 年 6 月 14 日 国立京都国際会館 京  
都
- 11) 駒居 真紀子、榎 正寛、鳶岡 弘高、  
坂本 洸太郎、小川 直希、眞下 恵次、  
藤原 大一郎、山添 譲、向井 淳治、  
阪口 勝彦、西田 升三。多発性骨髄腫  
における多剤耐性獲得因子の検討。第 60  
回日本生化学会近畿支部例会。2013 年 5  
月 18 日 大阪大学 大阪
- 12) 駒居 真紀子、榎 正寛、小川 直希、山添  
譲、向井 淳治、西田 升三。多発性骨髄  
腫での抗がん剤多剤耐性獲得機序。日本  
薬学会 第 133 年会。2013 年 03 月 28 日 パ  
シフィコ横浜 横浜
- 13) 駒居 真紀子、榎 正寛、小川 直希、山添  
譲、向井 淳治、西田 升三。  
Overexpression of MDR1 and survivin,  
and decreased Bim expression mediate  
multidrug-resistance in multiple  
myeloma. 第 71 回日本癌学会学術集会。  
2012 年 09 月 20 日 ホテルロイトン札幌  
札幌
- 14) 駒居 真紀子、榎 正寛、小川 直希、山添  
譲、向井 淳治、西田 升三。MDR1 及び  
survivin の過剰発現と Bim の発現低下を  
介した多発性骨髄腫での多剤耐性獲得機  
序。第 16 回日本がん分子標的治療学会  
学術集会。2012 年 6 月 28 日 西日本総  
合展示場 小倉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 升三 (NISHIDA Shozo)

近畿大学 薬学部・教授

研究者番号：40208187

### (2) 連携研究者

榎 正寛 (TSUBAKI Masanobu)

近畿大学 薬学部・講師

研究者番号：30434856