

薬学研究科・薬物治療学研究室

1. 研究課題名

「多発性骨髄腫での骨破壊抑制におけるターゲット分子の検索及びアポトーシス誘導効果を有する機能性分子の探索とその作用機序の解明」

2. 研究チームメンバー

西田 升三

近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・教授

椿 正寛

近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・助手

3. 研究成果

がんは様々なシグナル伝達因子を活性化させることにより増殖、生存、転移、およびがん固有の病態を発現させる。このことから補完代替医療における医薬シーズの抗腫瘍作用を検討する上で、がん細胞でのシグナル伝達および分子標的のターゲットとなりえる因子を検索しなければならない。当研究室では多発性骨髄腫における骨破壊でのターゲット分子、および天然薬物から見出した化合物のアポトーシス誘導作用について解析したので報告する。

3-1. 多発性骨髄腫での骨破壊促進機序とそれらを抑制するターゲット分子の検索

骨破壊は骨髄腫の末期において、急速に進行し、この原因で起こる骨の痛みまたは骨折は顕著に患者の QOL を減少させる。この骨破壊の原因として、現在までに interleukin-6 や TNF- α などの骨髄腫細胞から分泌される因子が関与するとされていたが、病態の進行度と相関性がないため別の因子が考えられている。MIP-1 α は正常血清中では検出されないが骨髄腫患者の血清中で多量に存在することが報告されている。また、その分泌量は病態と相関することも示されているものの、その詳細は不明であり、また MIP-1 α による骨破壊メカニズムは明らかにされていない。また、多発性骨髄腫における骨破壊性病変では、骨髄間質細胞および骨芽細胞における receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 発現が促進されていることが示されている。このことから多発性骨髄腫細胞から分泌される MIP-1 α によって骨髄間質細胞および骨芽細胞における RANKL 発現が増加している可能性が考えられる。今回、MIP-1 α による骨髄間質細胞や骨芽細胞での RANKL 発現誘導の有無および破骨細胞活性化の機序を検討した。

我々はマウス骨髄間質細胞株 ST-2 細胞およびマウス骨芽細胞 MC-3T3-E1 細胞において MIP-1 α 刺激

により RANKL mRNA 発現は、MIP-1 α 濃度依存的に上昇した。また、MIP-1 α の添加後、1 時

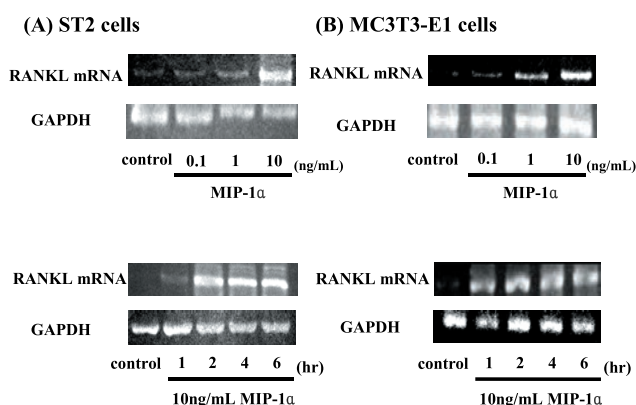


Fig. 1. MIP-1 α induces RANKL mRNA expression of bone marrow stromal cells or osteoblast in a concentration- and time-dependent manner. Equal amounts of RNA were reverse transcribed to generate cDNA that was used for PCR analysis of RANKL mRNA expression in bone marrow stromal cells (A, ST2 cells) or osteoblast (B, MC3T3-E1 cells). MIP-1 α markedly increased RANKL mRNA expression in concentration- and time-dependent.

間で増加し始め、2時間最大となり、その後、持続性発現が認められた (Fig.1)。RANKL タンパク発現においても western blotting により検討したところ、発現増加が認められた (Fig.2)。

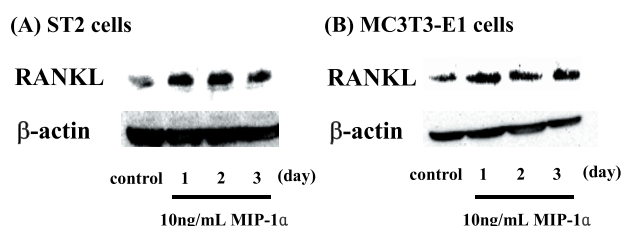


Fig. 2. Confirmation of RANKL expression from ST2 cells or MC3T3-E1 cells at the time of MIP-1 α stimulation. Photograph revealed the Western blot analysis for RANKL protein. MIP-1 α markedly increased RANKL expression in (A) ST2 cells or (B) MC3T3-E1 cells.

また、これら RANKL 発現増加に関与するシグナル伝達因子について western blotting により検討したところ、MIP-1 α 添加後、リン酸化 ERK1/2 およびリン酸化 Akt の発現増加を認めた (Fig.3)。

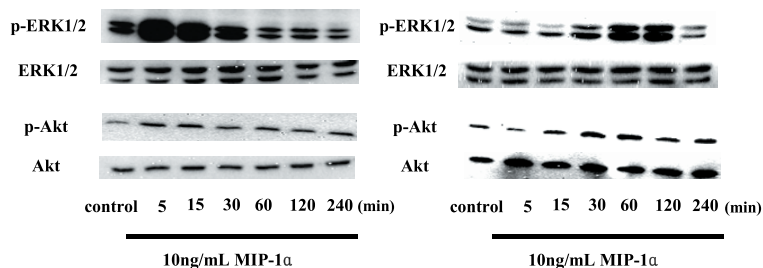


Fig. 3. MIP-1 α induced activation of ERK1/2 and Akt in ST2 cells or MC3T3-E1. (A) ST2 cells or (B) MC3T3-E1 cells were cultured in the presence of 10 ng/ml MIP-1 α for 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min. Whole cell lysates were generated and immunoblotted with an antibody against phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), phosphorylated Akt (p-Akt), ERK1/2, and Akt. In the MIP-1 α treatment, the expression of p-ERK1/2 and p-Akt was higher than that of controls.

さらに、MIP-1 α は、骨髓間質細胞及び骨芽細胞との共培養で C7 細胞単独と比較し、より分化を促進することが認められた (Fig.4)。これらの結果は、MIP-1 α が直接、破骨前駆細胞に作用して、破骨細胞分化を誘導することを示唆した。また、骨髓間質細胞と骨芽細胞の RANKL 発現の増加を介して、間接的に破骨細胞分化を誘導することも示した。

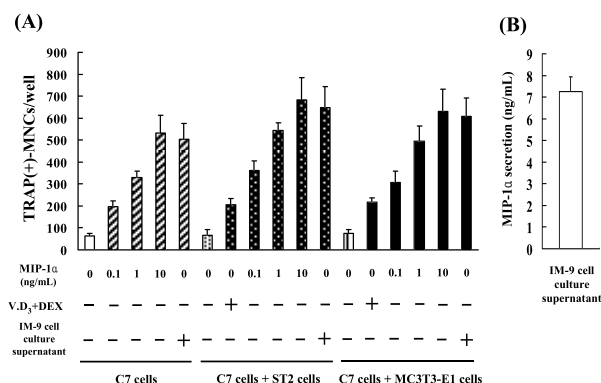


Fig. 4. Effect of MIP-1 α and multiple myeloma cell culture supernatant on the number of TRAP-positive cells with and without the co-culture of ST2 or MC3T3-E1 cells and C7 cells. (A) After culturing ST2 cells or MC3T3-E1 cells, the cells were co-culture with C7 cells, having the potential to differentiate into osteoclast, and TRAP-positive multinucleated cells (3 or more nuclei) were counted under a microscope after 12 days. When ST2 cells or MC3T3-E1 cells were treated with MIP-1 α , the number of TRAP-positive cells significantly increased in a concentration-dependent manner. Furthermore, IM-9 cell culture supernatant induces of TRAP-positive multinucleated cells. These results are representative of five independent experiments. (B) IM-9 cells were incubated for 48 h. Supernatant were collected in culture and analyzed for MIP-1 α by ELISA. Data represent means \pm SDs for at least quintuple samples.

この結果は、MEK/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の活性化が骨髓間質細胞と骨芽細胞で MIP-1 α

により誘導される RANKL 発現に関与していることを示唆した。これらの結果は MIP-1 α が骨破壊抑制のターゲット分子となることを示し、また MIP-1 α により発現亢進が認められた RANKL、RANKL 発現に関与する ERK1/2 および Akt も骨破壊抑制のターゲット分子となりうることを示唆した。さらに多発性骨髄腫における骨破壊では MIP-1 α を抑制することが重要であることが考えられる。

3-2 新規 bisphosphonate, YM529/ONO-5920 による骨髄腫細胞での MIP-1 α 分泌抑制効果

次いで我々は、新規 bisphosphonates である YM529/ONO-5920 により骨髄腫細胞からの MIP-1 α 分泌を抑制できるか否か検討を試みた。まず、骨髄腫細胞株である MOPC-31C 細胞における MIP-1 α 発現を検討した。この細胞にリポポリサッカライドで刺激すると MIP-1 α mRNA 発現及びタンパク分泌が増加することを認めた (Fig.5)。

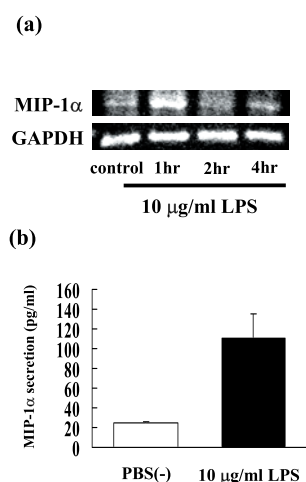


Fig. 5. Confirmation of macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) secretion from MOPC-31C mouse myeloma cells at the time of lipopolysaccharide (LPS) stimulation. (a) Equal amounts of RNA were reverse transcribed to generate cDNA that was used for polymerase chain reaction (PCR) analysis of MIP-1 α mRNA expression in MOPC-31C cells. (b) MOPC-31C cells (1×10^3 cells/well) were incubated for 96 h with or without 10 μ g/mL LPS. Culture supernatant was collected and analyzed for MIP-1 α by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data represent means \pm standard deviations (SD) for at least quintuple samples.

また、YM529/ONO-5920 が MOPC-31C 細胞における MIP-1 α 分泌を抑制するか検討したところ、YM529/ONO-5920 は濃度依存的に MIP-1 α mRNA 発現及びタンパク分泌を阻害することを確認した (Fig.6)。

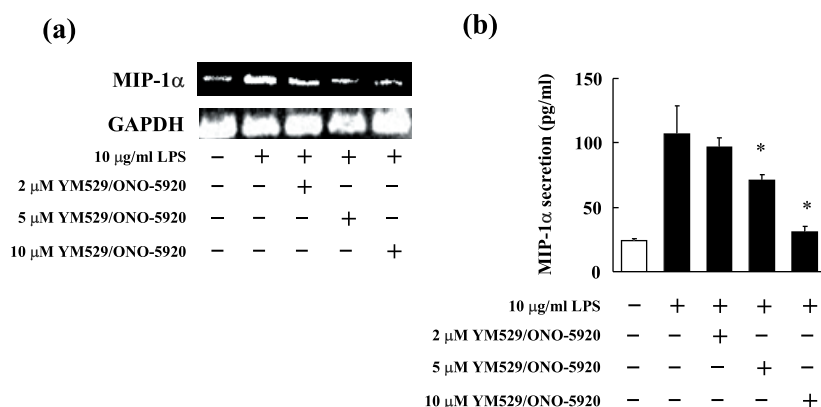


Fig. 6. Inhibitory effect of YM529/ONO-5920 on macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) mRNA expression and MIP-1 α secretion in MOPC-31C mouse myeloma cells. (a) MOPC-31C cells were treated with 2, 5, and 10 μ M YM529/ONO-5920. After incubation for 72 h, lipopolysaccharide (LPS) was added to give the final concentration of 10 μ g/mL. After incubation for 1 h, RNA was extracted, and MIP-1 α mRNA expression was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Photograph revealed the RT-PCR analysis for MIP-1 α mRNA. (b) MOPC-31C cells were treated with 2, 5, and 10 μ M YM529/ONO-5920 for 72 h. These cells receiving YM529/ONO-5920 were cultured in the presence of LPS for 24 h. Culture supernatant was collected in culture and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. These results are representative of five independent experiments. * $P < 0.01$, compared to control.

またリポポリサッカライド刺激時においてリン酸化ERK及びAktの一過性の活性化を認め、YM529/ONO-5920によりその活性化は抑制された (Fig.7)。

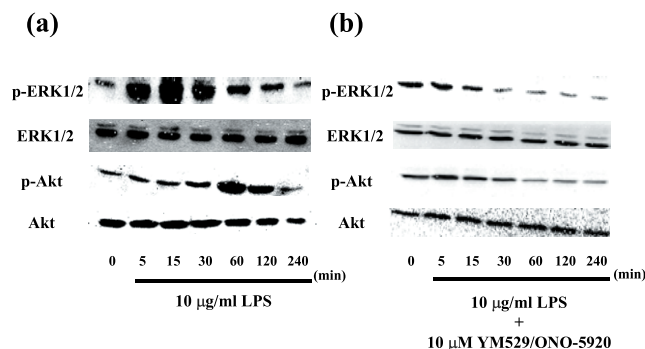


Fig. 7. Time-course changes in phosphorylated extracellular-regulated kinase (ERK) and Akt observed in MOPC-31C mouse myeloma cells at the time of lipopolysaccharide (LPS) stimulation with or without YM529/ONO-5920 pretreatment. (a) MOPC-31C cells were cultured in the presence of 10 µg/mL LPS for 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min. Whole cell lysates were generated and immunoblotted with an antibody against phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), phosphorylated Akt (p-Akt), ERK1/2 and Akt. (b) MOPC-31C cells were treated with 10 µM YM529/ONO-5920 for 72 h. These cells receiving YM529/ONO-5920 were cultured in the presence of 10 µg/mL LPS.

これらの結果はYM529/ONO-5920がRas/MEK/ERK経路及びRas/PI3K/Akt経路を抑制することでMIP-1 α の発現、分泌を阻害することを示唆した。このことからYM529/ONO-5920は骨破壊やMIP-1 α 依存性の骨髄腫細胞増殖の治療に有効である可能性が示唆された。また、多発性骨髄腫における骨破壊抑制でのターゲット因子はMIP-1 α 、Ras、ERK、およびAktであり、今回得た結果からこれらを抑制するような天然物シードの検索を今後、行っていく予定である。

3-3. マンギフェリンによるNF- κ B阻害を介したアポトーシス誘導効果

マンギフェリンは天然物に由来するポリフェノールであり、*Phaleria cumingii*, Onga el をはじめとするThymera ceaeファミリーに属する植物の葉や幹に含まれる成分である。近年、マンギフェリンにより抗腫瘍効果が報告されたが、その詳細な機序は不明のままである。今回、我々は造血器系腫瘍であるHL60細胞を用いてアポトーシス誘導機序を解明することを試みた。

マンギフェリンは濃度依存的に細胞にアポトーシスを誘導することを認めた (Fig.8)。

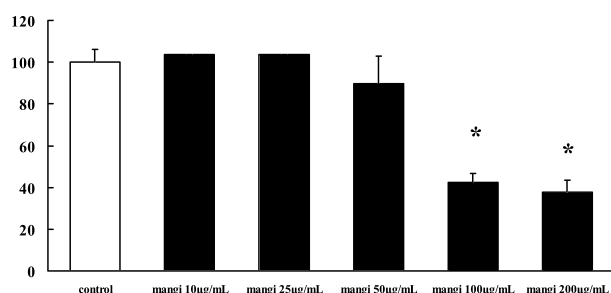


Fig. 8. The effect of mangiferin on the viability of HL60 cells, which was measured by trypan blue dye assay. The cells were treated with 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, and 200 µg/mL mangiferin for 3 days. Mangiferin induced a time-dependent inhibition of cell viability. The results are expressed as a percentage of control. The results are representative of 5 independent experiments. *, $P < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

また、そのアポトーシス誘導機序は western blotting によりシグナル伝達因子を検討した結果、NF- κ B の核移行阻害であることが認められた (Fig.9)。

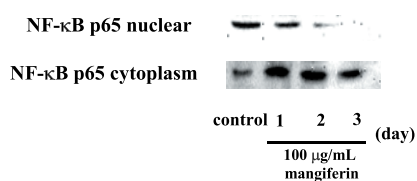


Fig. 9. Mangiferin specifically suppresses the nuclear entry of NF- κ B p65 in HL60 cells. The HL60 cells were treated with 100 μ g/ml mangiferin for 1, 2, or 3 days. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against NF- κ B p65.

以上のことから、マンギフェリンはNF- κ B の核移行を阻害することでHL60細胞に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。これらの結果はマンギフェリンが造血器系腫瘍をはじめとするNF- κ B が活性化しているような癌に対して効果が期待できる可能性を示している。