

授与番号	甲第 1876 号
------	-----------

論文内容の要旨

Stauprimide suppresses proliferation and survival via inhibition of IRF4 expression and activation of JNK in multiple myeloma cells

(スタウプリミドは骨髄腫細胞株において IRF4 の発現抑制と JNK の活性化を介して増殖と生存を抑制する)

清原千貴, 伊藤薫樹

(Journal of Iwate Medical Association 74 巻, 2 号, 令和 4 年 6 月掲載)

I. 研究目的

多発性骨髄腫(multiple myeloma: MM)は難治性の形質細胞性腫瘍である。プロテアソーム阻害薬や免疫調節薬などの新規薬剤により治療成績は向上したが、未だ治癒の得られない疾患であり、新たな治療薬の開発が期待されている。スタウプリミドはインドロカルバゾール類のスタウロスポリンファミリーの半合成アナログである。スタウプリミドは胚性幹細胞において、Nucleoside diphosphate kinase B(NME2)に結合し、c-MYC 転写を抑制することが分かっている。

多発性骨髄腫では c-MYC が病態に重要な役割を果たしており、スタウプリミドが MYC の抑制を介して抗腫瘍効果を示す可能性がある。本研究では骨髄腫細胞株を用いてスタウプリミドの抗腫瘍効果およびその機序を明らかにすることを目的とする。

II. 研究対象ならび方法

対象として 2 つのヒト骨髄腫細胞株(RPMI8226, KMS-28PE)を用いた。各細胞株は、10 % 胎児ウシ血清加 RPMI1640 メディウムで培養した。各濃度のスタウプリミドで細胞を 24 時間および 48 時間で処理後、トリパンブルー染色法により、細胞増殖抑制割合を測定した。細胞死割合は、スタウプリミドで 24 時間処理後、アネキシン V およびプロピジウムイオダイド染色によりフローサイトメトリ法で測定した。細胞周期の解析は、スタウプリミド存在下・非存在下で 24 時間培養後に DNA 染色を行い細胞周期分布をフローサイトメトリ法で測定した。

作用機序を検討するため、RPMI8226 および KMS-28PE を用いてスタウプリミド処理によるアポトーシス実行分子、抗アポトーシス分子、転写因子の発現に対する影響をウェスタンブロット法で検討した。

データは平均±標準偏差 (SD) として表した。統計解析はスチューデントの t 検定を用いた。P 値<0.05 を統計学的に有意差ありとした。

III. 研究結果

1. スタウプリミドはコントロールと比較して濃度依存性に MM 細胞株の増殖を抑制した (24 時間後の対照群の細胞数を 100%とした時の生存細胞割合 : KMS-28PE 1 μ M; 33.7 \pm 18.8%, 10 μ M; 19.4 \pm 13.2%, $P < 0.01$, RPMI8226 1 μ M; 63.3 \pm 8.2%, 10 μ M; 33.8 \pm 8.5%, $P < 0.01$).
2. スタウプリミドは 5 μ M の濃度で細胞死を誘導した (KMS-28PE コントロール; 6.1 \pm 1.6%, 5 μ M; 25.8 \pm 4.5%, $P < 0.05$, RPMI8226 コントロール; 4.1 \pm 0.7 %, 5 μ M; 23.6 \pm 2.4%, $P < 0.05$).
3. スタウプリミドは濃度依存性に G2M 期において細胞周期停止を誘導した (G2M 期割合 : KMS-28PE コントロール; 11.1 \pm 1.0%, 1 μ M; 14.8 \pm 0.8%, 10 μ M; 37.3 \pm 1.8%, $P < 0.05$, RPMI8226 コントロール; 17.7 \pm 1.0 %, 1 μ M; 22.0 \pm 0.8%, 10 μ M; 44.0 \pm 0.9 %, $P < 0.05$).
4. スタウプリミドは, KMS-28PE および RPMI8226 細胞株において c-MYC と IRF-4 の発現を抑制し, PARP の活性化を誘導した. KMS-28PE 細胞では caspase-3 の活性化を誘導した. 今回検討した抗アポトーシス分子への影響は認められなかった.
5. スタウプリミドは, KMS-28PE 細胞株において PKC α のリン酸化を抑制し, JNK の活性化および c-Jun の発現を誘導した.

IV. 結 語

我々の研究では, スタウプリミドは MM 細胞株の増殖を用量依存的に抑制し, 高濃度でアポトーシスを誘導した. スタウプリミドは分裂期で細胞周期を停止させることにより増殖を抑制することを明らかにした. 詳細な機序に関しては今後さらなる検討が必要ではあるが, c-MYC および IRF-4 の発現が低下していたこと, PKC α の抑制および JNK の活性化ならびに PARP の活性化を認めたことから, 骨髄腫細胞ではこれらの蛋白が増殖抑制およびアポトーシス誘導に関与していることが示唆された.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 鈴木 啓二郎 (臨床検査医学講座)

副査 教授 板持 弘明 (臨床腫瘍学講座)

副査 講師 古和田 周吾 (内科学講座血液腫瘍内科学分野)

多発性骨髄腫(MM)はプロテアソーム阻害薬や免疫調節薬, モノクローナル抗体による抗体医薬により治療成績は向上したものの薬物療法で治癒は見られず, 新規治療薬の開発が望まれている. MM は転写因子 *c-Myc* の過剰発現が病態形成に重要であると報告されている. また, スタウロsporinファミリーの半合成アナログ, スタウプリミドは胚性幹細胞やヒト癌細胞株で *c-Myc* 発現を抑制することが示されている. 本論文はスタウプリミドの抗腫瘍効果とその機序を検討した.

スタウプリミドがヒト MM 細胞株 PMI8226 および KMS-28PE に与える影響, すなわち細胞増殖, アポトーシス誘導, 細胞周期の変化, *c-Myc* および *interferon regulatory factor4 (IRF4)* 発現, アポトーシス実行分子および抗アポトーシス分子の発現, ならびに *programmed death-1 ligand (PD-L1)* の発現を検討した. スタウプリミドはコントロール(ctl)と比較して容量依存性に 24 時間後の両細胞株の増殖を優位に抑制し(ctl 細胞数 100%, KMS-28PE 1 μ M 33.7%, 10 μ M 19.4%; PMI8226 1 μ M 63.3%, 10 μ M 33.8%), アネキシシン V 陽性細胞を優位に誘導した(RPMI8226 5 μ M 23.6%, ctl 4.1%; PMI8226 5 μ M 25.8%, ctl 6.1%). また, スタウプリミドは両細胞株の細胞周期 G2/M 期での停止を誘導し(PMI8226 ctl 17.7%, 1 μ M 22.0%, 10 μ M 44.0%; KMS-28PE ctl 11.1%, 1 μ M 14.8%, 10 μ M 37.3%), 両細胞株で *c-Myc* と *IRF4* の発現を抑制した. アポトーシス関連分子では, 両細胞株で Poly(ADP-ribose) polymerase 活性化, KMS-28PE で Caspase-3・Caspase-9 活性化を誘導した. PD-L1 は両細胞株で発現が誘導された.

本論文はスタウプリミドの MM 細胞株での作用機序を明らかにし, 同薬が新たな MM の治療戦略となり得る有用な知見を示した. 本論文は学位に値する.

試験・試問の結果の要旨

審査では, 研究の背景, 方法, 結果, および考察をスライドで明確に示し, 研究手法や結果の解釈に関する諮問(実験方法や統計学的手法とその解釈など)を行い, 適切な回答を得た. 学位に値する学識を有していると考えられる. また, 学位論文の作成にあたって, 剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した.

参考文献

- 1) Successful treatment with Nivolumab in a patient with metastatic salivary duct carcinoma (佐々木剛, 他 8 名と共著). *Case Reports in Oncology*, in press.
- 2) Loss of CD38 expression in myelomatous pleural effusion in a patient with myeloma treated with daratumumab: Report of a case (佐々木奈都紀, 他 12 名と共著). *Diagnostic cytopathology*, 49 号 1 巻(2021 年): p168–170.
- 3) Autophagosome-rich platelets are increased in immune thrombocytopenia (大津瑛裕, 他 9 名と共著). *Journal of Iwate Medical Association*, 72 号 3 巻(2020 年): p103–113.