



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1624号
学位記番号	第1159号
氏名	木下 史緒理
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	<p>Potent anti-tumor effect of combination therapy with sub-optimal doses of Akt inhibitors and pomalidomide plus dexamethasone in multiple myeloma (Akt 阻害剤とポマリドミド+デキサメサゾン療法の併用による効果的な骨髄腫治療法の開発)</p> <p>Oncol Lett; accepted for publication</p>
論文審査担当者	主査： 稲垣 宏 副査： 高橋 智, 飯田 真介

論 文 内 容 の 要 旨

多発性骨髄腫の治療はプロテオソーム阻害薬と免疫調節薬 (IMiDs) の登場で大きく変化した。さらに、近年多数の新薬が開発、承認されている。Akt 阻害薬である Afuresertib (AFU) は、単剤で多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果を示しており、標準治療との併用での効果が期待されている薬剤である。今回我々は、より効果的で副作用の少ない併用療法を検討するため、IMiDs の一つである Pomalidomide (POM) と AFU の併用療法について検討した。

初めに、多発性骨髄腫由来細胞株を用いて、各薬剤の sub-optimal dose における抗腫瘍活性について検討した。POM 単剤では既報通り腫瘍増殖抑制効果は乏しかったが、POM 1 μ M と dexamethasone (DEX) 100 μ M の併用では多くの細胞株で 50%以上の腫瘍増殖抑制が認められたため、sub-optimal dose は POM1 μ M、DEX10 μ M とした。AFU 単剤では 10 μ M で著明な腫瘍増殖抑制効果が得られたため、sub-optimal dose は 1 μ M と 3 μ M とした。続いて、AFU の抗腫瘍効果が比較的弱い細胞株 XG-7、U266 を選択し、POM + DEX (PD) + AFU の抗腫瘍効果を検討した。Sub-optimal dose の PD + AFU は、PD または AFU と比較して、有意に腫瘍増殖抑制効果が高く、有意にアポトーシスが増加した。続いて western blotting 法にて、PD + AFU の作用機序を検討した。PD + AFU は PD または AFU 単剤に比較し、caspase 活性化の増強効果を認めた。Akt 経路では FOXO1、4EBP1 の脱リン酸化、CRBN 関連因子では IKZF1、IKZF3、IRF4 の発現の抑制が、PD + AFU で認められた。XG-7 では、PD と比較し、PD + AFU でより IKZF1、IKZF3 の発現が抑制された。多発性骨髄腫患者の骨髄検体を用いた western blotting では、PD + AFU において、cleaved caspase-3 の発現増強、FOXO1、4EBP1 の脱リン酸化、IKZF3 の発現抑制が認められた。

以上の結果から、PD + AFU 併用による抗腫瘍活性増強効果を考える上で、特に 4EBP1 の脱リン酸化と FOXO1 の変化に注目した。

4EBP1 は eIF4E の制御因子のひとつであり、eIF4E と複合体を形成することで eIF4E を不活化する。4EBP1 がリン酸化され、eIF4E から離れることで eIF4E が活性化し、C/EBP1 の転写を促進することにより、IRF4 の転写促進に働く。今回、PD + AFU により、4EBP1 は脱リン酸化された。4EBP1 が脱リン酸化されることで、eIF4E は複合体から離れられなくなり、結果として IRF4 の転写を抑制し、抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。

FOXO1 は癌抑制遺伝子産物であるが、pro-apoptotic factor として働くと報告されている。FOXO1 は核内に存在し、細胞周期の静止や細胞死のプロセスのトリガーとなる。しかし、Akt 経路が恒常的に活性化状態にある骨髄腫など多くの腫瘍では、FOXO1 はリン酸化され、核内から細胞質へ移動し不活化している。Akt 阻害薬である AFU により FOXO1 は脱リン酸化されるが、今回の研究において、XG-7 では PD により FOXO1 がより強くリン酸化された。しかし、PD + AFU では FOXO1 は脱リン酸化されており、PD による FOXO1 の変化は AFU との併用で解消された。

PD + AFU は PD または AFU と比較し、多発性骨髄腫に対してより強い抗腫瘍効果を示した。また、PD と AFU は併用しても、それぞれの効果は阻害されず、併用による 4EBP1、FOXO1 の脱リン酸化、IKZF1、IKZF3 の抑制増強などの作用により、抗腫瘍効果がさらに高まったと考察する。免疫調節薬に AFU を併用することは、IMiDs の抗腫瘍効果を増強させるのみでなく、IMiDs の耐性克服につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

【背景】多発性骨髄腫の治療はプロテオソーム阻害薬と免疫調節薬（IMiDs）の登場で大きく変化した。さらに、近年多数の新薬が開発、承認されている。Akt 阻害薬であるアフレサーティブ（afuresertib:AFU）は、単剤で多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果を示しており、標準治療との併用での効果が期待されている薬剤である。今回我々は、より効果的で副作用の少ない併用療法を検討するため、IMiDs の一つであるポマリドミド（pomalidomide:POM）と AFU の併用療法について検討した。

【方法と結果】多発性骨髄腫由来細胞株を用いて、各薬剤の sub-optimal dose における抗腫瘍活性について検討した。単剤での MTS アッセイの結果より、sub-optimal dose は POM 1 μ M、デキサメタゾン(dexamethasone:DEX) 10 μ M、AFU 1 μ M と 3 μ M とした。Sub-optimal dose の PD + AFU では、腫瘍増殖抑制効果の増強、アポトーシスの増加が確認された。続いて western blotting 法にて、PD + AFU の作用機序を検討した。PD + AFU は PD または AFU 単剤に比較し、caspase-8, -3 活性化の増強を認めた。Akt 経路では FOXO1、4EBP1 の脱リン酸化、CRBN 関連因子では IKZF1、IKZF3、IRF4 の発現の抑制が、PD + AFU で認められた。XG7 細胞株では、IKZF1、IKZF3 のより強い発現低下が認められた。多発性骨髄腫患者由来の骨髄検体を用いた場合も同様の抗腫瘍活性を認めた。

【考察】

PD + AFU は PD または AFU と比較し、多発性骨髄腫に対してより強い抗腫瘍効果を示した。4EBP1、FOXO1 の脱リン酸化、IKZF1、IKZF3 の抑制増強などの作用により、抗腫瘍効果がさらに高まったと考察する。免疫調節薬に AFU を併用することは、IMiDs の抗腫瘍効果を増強させるのみでなく、IMiDs の耐性克服につながることを期待される。

【審査の内容】主査の稲垣教授より、sub-optimal dose の意味、サリドマイド・レナリドミド・ポマリドミドは構造が類似しているが作用機序の違いはあるのか、ポマリドミドとアフレサーティブの併用効果は相加的か相乗的かなどの 10 項目、第一副査の高橋教授からは、併用療法ではカスパーゼ-8 に加えカスパーゼ-9 も活性化していたのか、両者の併用療法で劇的に変化したシグナルは何か、Akt 阻害剤のアフレサーティブ曝露でリン酸化 Akt 量が増加する理由など 14 項目、そして第二副査の飯田教授からは原発不明がんの診断と治療方針、がんに対する免疫療法の進歩、がん免疫療法におけるバイオマーカー研究の 3 項目の専門領域における質問がなされた。一部の質問に対して回答に窮する場面もあったが、それ以外は概ね適切な回答が得られ、申請者は学位論文の趣旨を理解し専門領域の知識も有しているものと判断した。本前臨床研究により新たな併用療法の有効性が示されたことは、臨床開発へと応用する上で重要な意義がある。以上より、審査委員会は申請者に対して博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 稲垣 宏

副査 高橋 智、 飯田 真介