

# 免疫调节剂治疗多发性骨髓瘤的作用机制研究进展

王珊 靳凤艳

**Advances on immunomodulatory drugs against multiple myeloma** Wang shan, Jin fengyan

Corresponding author: Jin fengyan, Cancer Center, the First Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China. Email: fengyanjin@jlu.edu.cn

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)发病率占所有恶性肿瘤的1%,占血液肿瘤的13%<sup>[1]</sup>,有资料显示美国每年新诊断的MM约26 850例<sup>[2]</sup>。MM的主要特征是骨髓恶性浆细胞浸润伴外周血高水平的M蛋白。在MM发生及疾病进展过程中,骨髓微环境起着非常重要的作用,介导了MM细胞的存活、生长、分化、转移及耐药发生<sup>[3]</sup>。微环境中的骨髓基质细胞和MM细胞之间通过细胞因子、受体及黏附分子相互作用,其中细胞因子包括IL-6、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、胰岛素样生长因子1(IGF1)、基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )及巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )和MIP-1 $\beta$ 等,这些细胞因子与其受体作用促进了MM细胞的增殖、生存、耐药、转移、血管新生及骨破坏发生<sup>[4]</sup>;此外,MM细胞分泌大量的免疫抑制因子,如TGF- $\beta$ 、IL-10及IL-6,通过抑制树突细胞、T细胞、NK细胞及B细胞功能,并激活调节性T细胞,从而诱导免疫耐受<sup>[5]</sup>。

近年来,以沙利度胺及其衍生物来那度胺为代表的免疫调节剂(immunomodulatory drug, IMiD)和以硼替佐米为代表的小分子蛋白酶抑制剂的的应用,不仅提高了MM患者的缓解率,增加了缓解深度,而且明显延长患者的生存时间,是MM治疗领域中里程碑式的进展<sup>[6]</sup>。其中,IMiD通过作用于MM细胞和骨髓微环境发挥直接肿瘤细胞杀伤及免疫调节的双重作用<sup>[7]</sup>。IMiD治疗MM是从临床到基础研究转化的典范<sup>[8]</sup>,近年来的基础研究在IMiD的作用机制方面有了突破性进展,我们在本文中将其作用机制做一综述。

## 一、IMiD具有肿瘤细胞杀伤和免疫调节双重作用

半个世纪以前,第一代IMiD沙利度胺作为镇静剂广泛地用于缓解早孕反应,因海豹儿事件撤出了大部分市场<sup>[9]</sup>。此后发现沙利度胺通过抑制TNF- $\alpha$ 分泌产生抗炎作用<sup>[10]</sup>,也因此而得名IMiD。

1994年,肿瘤血管新生的提出者Folkman的研究团队发现沙利度胺通过抑制碱性成纤维细胞生长因子的表达,产生

抗血管新生作用<sup>[11]</sup>。此后一系列临床研究不仅证实沙利度胺治疗MM有效,而且进一步发现沙利度胺与地塞米松具有协同抗肿瘤作用,从而开启了沙利度胺治疗MM的新纪元。其中在最具有影响的一项研究中,Singhal等<sup>[12]</sup>观察了沙利度胺单药治疗84例复发难治性MM患者的临床疗效,结果显示总反应率为32%,1年的总生存率和无事件生存率分别为58%和22%,其中10%的MM患者达到完全缓解或者接近完全缓解。即使对于反复应用过高剂量化疗药物的MM患者,也显示了一定的疗效。虽然该项研究奠定了沙利度胺在MM治疗中的地位,但由于应用剂量过大,不良反应明显,甚至不耐受,从而推动了沙利度胺衍生物如来那度胺和泊马度胺的问世。

IMiD有效治疗MM,大量的基础研究开始了对其作用机制的进行探索。最初的研究发现沙利度胺和其他IMiD通过上调p21和使细胞周期阻滞在G<sub>1</sub>期对MM细胞系和MM患者的原代细胞产生直接杀伤作用<sup>[13]</sup>,联合地塞米松可增强对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[14]</sup>。另有研究证实IMiD还通过作用于骨髓微环境改变MM细胞的表现遗传状态而产生抗肿瘤作用<sup>[15]</sup>。而IMiD的免疫调节作用主要是通过刺激T细胞分泌IL-2和增强NK细胞的自然杀伤能力<sup>[16]</sup>。虽然对于IMiD的双重作用研究比较透彻,但对其作用机制,尤其是作用靶点仍不清楚。

## 二、IMiD作用机制研究

直到2010年对IMiD作用机制的研究才有了突破性进展,Ito等<sup>[17]</sup>通过蛋白质组学技术鉴定出沙利度胺的结合蛋白cereblon(CRBN)和DNA损伤结合蛋白-1(DDB1),两者作为E3泛素连接酶的重要成分,与Cul4和Roc1共同形成了E3泛素连接酶复合体<sup>[18]</sup>。Ito等<sup>[17]</sup>的研究最初只发现沙利度胺与其底物CRBN结合抑制了CRBN的自我磷酸化;进一步研究证实CRBN是沙利度胺致畸的靶点:沙利度胺处理后斑马鱼会出现肢体发育缺陷,而CRBN突变阻断了其与沙利度胺的结合逆转了其致畸作用。总之,沙利度胺通过结合CRBN抑制成纤维细胞生长因子-8(组织发育过程中的一种重要分泌性调控信号分子),导致肢体发育缺陷,从而揭开了半个世纪以来沙利度胺致畸之谜。

上述成果迅速转化到MM的研究中,证实了IMiD的抗肿瘤细胞作用可能依赖于CRBN,并有一系列重要发现:和沙利度胺一样,来那度胺和泊马度胺也抑制CRBN的自我磷酸化<sup>[19]</sup>;CRBN基因敲除后可降低MM细胞的存活率和存活MM细胞的CRBN水平,并对来那度胺和泊马度胺产生高度耐药<sup>[20]</sup>;CRBN过表达增加了对IMiD的敏感性<sup>[19]</sup>,并通过敲除CRBN基因建立了来那度胺耐药细胞系<sup>[19-20]</sup>;与体外实验

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.03.021

基金项目:国家自然科学基金(81471165);吉林省卫生计生科 研计划(20142041)

作者单位:130021 长春,吉林大学白求恩第一医院肿瘤中心

通信作者:靳凤艳,Email: fengyanjin@jlu.edu.cn

一致,CRBN高表达的MM患者对IMiD治疗反应较低表达者好<sup>[21]</sup>。因而,CRBN可能成为预测IMiD治疗反应的生物标志物。

更为重要的是发现了IMiD-CRBN的效应分子:干扰素调节因子4(IRF4)和IL-2,成功地应用一元论解释了IMiD的双重作用。研究发现IMiD处理的MM细胞IRF4表达下调,IRF4是MM细胞增殖至关重要的转录因子,敲除IRF4促进MM细胞凋亡<sup>[20]</sup>。此外,IRF4促进MYC基因的表达,后者作为癌基因,通常在成熟浆细胞中表达很低,而在MM细胞中高表达,在MM细胞的增殖和疾病进展中起关键作用<sup>[22]</sup>。因此,IMiD肿瘤细胞杀伤的作用可能是通过靶向结合CRBN后介导下游关键转录因子IRF4,促进MYC表达而发挥作用<sup>[23-24]</sup>。此外,研究证实IMiD通过作用于CRBN促进IL-2分泌<sup>[25]</sup>,也解释了其免疫调节的作用机制。然而,通过结合CRBN抑制泛素连接酶复合物似乎很难完全解释IMiD强大的肿瘤细胞杀伤和免疫调节作用。此外,IMiD靶向结合CRBN后应该促进底物快速泛素化,被26S蛋白酶体降解系统识别并降解,那么该底物究竟是什么呢?

分别来自于3个不同实验室的研究者应用3种不同却互补的蛋白组学技术同时对IMiD作用机制进行了研究,结果显示IMiD直接结合CRBN,促进CRBN依赖的底物Ikaros家族成员锌指蛋白-1(IKZF1,Ikaros)和锌指蛋白-3(IKZF3,Aiolos)泛素化并经过蛋白酶体降解,从而产生肿瘤细胞杀伤和免疫调节作用<sup>[23,25-26]</sup>。IKZF1/3作为有锌指结构的转录因子,在淋巴细胞的分化和发育过程中起着重要的调控作用,也是多数MM细胞系存活所必须的。IKZF1结合并激活IRF4的启动子,后者进一步激活下游的MYC基因,促进MM细胞增殖。因此,IKZF1的降解最终导致IRF4和MYC表达降低<sup>[27]</sup>。然而,来那度胺也能够抑制某些基线高表达IRF4的MM细胞增殖,但并未降低IRF4的表达,提示IKZF1/3还可能通过其他下游靶基因发挥作用。此外,IKZF1/3是IL-2启动子的抑制因子,IMiD诱导IKZF1/3降解,从而解除对IL-2启动子的抑制作用,这也可以解释IMiD通过促进T细胞分泌IL-2而发挥免疫调节作用<sup>[25-26]</sup>。Zhu等<sup>[28]</sup>的研究结果也证实低表达IKZF1的MM患者对IMiD治疗反应差,其总生存期明显缩短。IMiD作用机制研究的意义,不仅有助于筛选出预测疗效的生物标志物,更有望研制出更为精准有效的靶向药物。

### 三、问题与展望

与蛋白酶体抑制剂(如硼替佐米、卡非佐米等)不同,IMiD对MM细胞的直接杀伤作用非常有限(至少在体外单一细胞培养中),提示其通过免疫调节和骨髓微环境的作用可能更重要。因此新发现的CRBN-IKZF1/3-IRF4/MYC等机理,还不能完全解释IMiD的作用机制和耐药机制,所以IMiD的免疫调节(除与CRBN相关的IL-2以外)和骨髓微环境机制,仍然是悬而未决的问题。

尽管对IMiD在MM中作用机制的研究取得了重大进展,但目前还有很多不能通过该机制解释的问题,如:理论上

蛋白酶体抑制剂硼替佐米通过抑制来那度胺对IKZF1/3的降解应产生拮抗来那度胺的抗肿瘤作用,而临床实践却证实硼替佐米联合来那度胺具有协同作用,并被推荐为高危MM患者的一线治疗方案<sup>[29]</sup>。此外,IKZF1突变缺失是急性淋巴细胞白血病的独立不良预后因素<sup>[30]</sup>。那么IKZF1在不同的疾病谱发挥截然相反的作用,可能是由于不同的IKZF1异构体调节所致:来那度胺通过作用于IKZF1对MM细胞具有杀伤作用,而对pre-B淋巴瘤细胞具有促进作用。即使来那度胺靶向结合CRBN,但在不同的疾病,其底物可能会不同:在MM中底物泛素化主要降解IKZF1和IKZF3蛋白,而在伴5q-的骨髓增生异常综合征中,来那度胺降解定位于伴5q-染色体编码的CSNK1A1发挥作用<sup>[31]</sup>。可见CRBN底物的多样性可能造成了IMiD在不同疾病中作用机制的差异,而且,有趣的是,CSNK1A1只受来那度胺的影响,而对沙利度胺无反应<sup>[31]</sup>。这都值得深入研究。

IMiD在不同肿瘤中作用底物不同,也提示是否可能在不同的MM分子亚型中,也存在CRBN底物的差异,从而造成了对IMiD的不同反应,其耐药性可包括①原发耐药:除CRBN/IKZF低表达,可能有CRBN以外的其他促肿瘤细胞增殖性底物的低表达或突变;②继发耐药:由于CRBN底物的多样性,是否存在某种或某些肿瘤细胞抑制性底物的下调,从而代偿或削弱了CRBN/IKZF的抑制作用。已有研究表明在MM,来那度胺耐药的机制并不完全依赖于CRBN<sup>[20]</sup>,提示IMiD作用机制的复杂性,可能还存在其他的靶点和作用机制,需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2015, 125(20): 3076-3084. doi: 10.1182/blood-2014-09-568915.
- [2] SEER Stat Fact Sheets: Myeloma [DB/OL]. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>.
- [3] Mimura N, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(8): 732-741. doi: 10.1016/j.exphem.2015.04.010.
- [4] Pagnucco G, Cardinale G, Gervasi F. Targeting multiple myeloma cells and their bone marrow microenvironment [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1028: 390-399.
- [5] Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 22-32. doi: 10.1038/leu.2009.236.
- [6] Ocio EM, Mitsiades CS, Orlowski RZ, et al. Future agents and treatment directions in multiple myeloma [J]. *Expert Rev Hematol*, 2014, 7(1): 127-141. doi: 10.1586/17474086.2014.858595.
- [7] Anderson KC. Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action-- similarities and differences [J]. *Semin Hematol*, 2005, 42(4 Suppl 4): S3-8.
- [8] Anderson KC. The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-

- bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30 (4): 445-452. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8919.
- [9] Zhou S, Wang F, Hsieh TC, et al. Thalidomide- a notorious sedative to a wonder anticancer drug [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(33): 4102-4108.
- [10] Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes [J]. *J Exp Med*, 1991, 173(3): 699-703.
- [11] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9): 4082-4085.
- [12] Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(21): 1565-1571.
- [13] Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cell to conventional therapy [J]. *Blood*, 2000, 96 (9): 2943-2950.
- [14] Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (10): 906-917. doi: 10.1056/NEJMoa1402551.
- [15] Boyle EM, Davies FE, Leleu X, et al. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma [J]. *Haematologica*, 2014, 99(4): 605-612. doi: 10.3324/haematol.2013.097907.
- [16] Davies FE, Raje N, Hideshima T, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2001, 98(1): 210-216.
- [17] Ito T, Ando H, Suzuki T, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity [J]. *Science*, 2010, 327 (5971): 1345-1350. doi: 10.1126/science.1177319.
- [18] Lupas AN, Zhu H, Korycinski M. The thalidomide-binding domain of cereblon defines the CULT domain family and is a new member of the  $\beta$ -tent fold [J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11 (1): e1004023. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004023.
- [19] Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide [J]. *Leukemia*, 2012, 26(11): 2326-2335. doi: 10.1038/leu.2012.119.
- [20] Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide [J]. *Blood*, 2011, 118 (18): 4771-4779. doi: 10.1182/blood-2011-05-356063.
- [21] Gandhi AK, Mendy D, Waldman M, et al. Measuring cereblon as a biomarker of response or resistance to lenalidomide and pomalidomide requires use of standardized reagents and understanding of gene complexity [J]. *Br J Haematol*, 2014, 164(2): 233-244. doi: 10.1111/bjh.12622.
- [22] Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma [J]. *Nature*, 2008, 454 (7201): 226-231. doi: 10.1038/nature07064.
- [23] Lu G, Middleton RE, Sun H, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins [J]. *Science*, 2014, 343 (6168): 305-309. doi: 10.1126/science.1244917.
- [24] Gopalakrishnan R, Matta1 H, Tolani B, et al. Immunomodulatory drugs target IKZF1-IRF4-MYC axis in primary effusion lymphoma in a cereblon-dependent manner and display synergistic cytotoxicity with BRD4 inhibitors [J]. *Oncogene*, 2015. doi: 10.1038/onc.2015.245. [Epub ahead of print]
- [25] Krönke J, Udeshi ND, Narla A. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma Cells [J]. *Science*, 2014, 343 (6168): 301-305. doi: 10.1126/science.1244851.
- [26] Gandhi AK, Kang J, Havens CG, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4 (CRBN) [J]. *Br J Haematol*, 2014, 164 (6): 811-821. doi: 10.1111/bjh.12708.
- [27] Krönke J, Hurst SN, Ebert BL. Lenalidomide induces degradation of IKZF1 and IKZF3 [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3 (7): e941742.
- [28] Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2014, 124 (4): 536-545. doi: 10.1182/blood-2014-02-557819.
- [29] Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(21):2133-2142.
- [30] Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(5): 470-480. doi: 10.1056/NEJMoa0808253.
- [31] Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1a in del(5q) MDS [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 183-188. doi: 10.1038/nature14610.

(收稿日期:2015-09-30)

(本文编辑:刘志红)