

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860780

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における腫瘍細胞自身のVE-cadherin発現と病態機構の解明

研究課題名(英文) The expression of VE-cadherin and clarification of the pathological mechanism of tumor cells on multiple myeloma

研究代表者

入内島 裕乃 (IRIUCHISHIMA, HIRONO)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10621576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多発性骨髄腫(MM)腫瘍細胞自身におけるVE-cadherin発現は、骨髄液を用いたフローサイトメトリー法、および骨髄組織を用いた免疫組織化学法において認められなかったことより、その可能性は低いと考えられた。一方、MMにおける他の血管新生関連分子の一つと報告されているinterleukin-8に關与が示されているCD28に關しては、再発・治療抵抗性MMに高発現しており、種々の細胞株においてボルテゾミブ耐性を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was unlikely that the expression of VE-cadherin in human multiple myeloma (MM) cells. Because it was not detected by flow cytometry analysis and immunohistochemistry of the bone marrow in patients with MM. In contrast, CD28, which is indicated the involvement with interleukin-8, it has been noted that another angiogenesis related gene, was highly expressed in patients with relapse and/or refractory MM. Furthermore, several MM cell lines showed bortezomib-resistance in CD28 positive fractions.

研究分野：血液内科

キーワード：多発性骨髄腫 CD28 CD56 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) は、終末分化した B 細胞である形質細胞が単クローン性に腫瘍化したものと考えられている。骨髄中には、“ニッチ細胞”と呼ばれる骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞などの間質細胞、サイトカインや細胞外マトリックス、カルシウムイオン濃度、酸素分圧およびそこに存在する幹細胞から構成される骨髄微小環境が存在している。骨髄微小環境は正常な造血幹細胞のみならず、白血病などの癌幹細胞の維持や病態の進展にも重要な役割を果たしており、MM においても腫瘍細胞の増殖や骨病変の進展、治療抵抗性など MM の病態生理の維持に重要な役割を果たしているといわれている[1]。われわれはこれまでに、ヒト MM 細胞株(U266 細胞)を極めて重度な免疫不全を呈する NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  KO (NOG)マウスに移植した、ヒト MM モデル(NOG-hMM モデル)を用いて、MM における“ニッチ細胞”の細胞学的、解剖学的特徴を明らかにし、さらに新規抗腫瘍薬であるベンダムスチンの MM 腫瘍細胞と MM ニッチへの抗腫瘍効果について明らかにしてきた[2]。

MM に特徴的かつ病勢を反映する組織学的特徴として、血管新生が挙げられる。われわれは NOG-hMM モデルにおいて、骨髄腫抗原 CD138 陽性細胞の一部に、血管内皮細胞に特徴的な接着分子 VE-cadherin 陽性の亜集団が存在することを見出した。興味深いことに、*In vitro* の培養条件下では腫瘍細胞は VE-cadherin を発現しておらず、NOG マウスに移植されて初めて VE-cadherin を発現する分画が出現していた (図 1)。また免疫組織染色において、これらの細胞が血管様構造を呈していることを明らかにした。

(図 1)

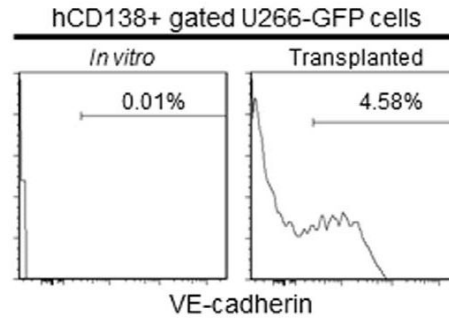


図 1. ヒト CD138 陽性分画における VE-cadherin の発現。U266 細胞は移植前(*in vitro*)では発現しないが、移植後 NOG マウス骨髄にて VE-cadherin を発現するようになる。

これまでに glioblastoma ではがん幹細胞分画が血管内皮細胞になり、自身が腫瘍のニッチとなって働くことが知られているが[3,4]、MM でも同様の性質があると考えられる。VE-cadherin の発現は低酸素誘導性転写因子ファミリーである hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ )によって転写活性化されることが知られており[5]、事実われわれは VE-cadherin 陽性骨髄腫細胞では陰性分画に比べて低酸素状態にあり、HIF-2 $\alpha$  蛋白の発現も高いことを明らかにした。

ベンダムスチンは現在本邦において、再発・難治性低悪性度非ホジキンリンパ腫、および再発・難治性マントル細胞リンパ腫に承認されているが、MM に対しては臨床試験段階の新薬であり、詳細な *in vivo* における抗腫瘍効果、抗腫瘍メカニズムは明らかにされていない。これまでにわれわれは、U266 細胞を移植した NOG マウスにベンダムスチンを投与すると MM 腫瘍細胞は著明に減少し、腫瘍周囲のニッチ細胞をも正常に維持する能力を併せ持っている可能性を見出した。しかし、その中に治療抵抗性の腫瘍細胞が存在しそれらの一部は VE-cadherin 陽性であることが明らかとなり、MM の薬剤耐性メカニズムの要因の一つに VE-cadherin が関与している可能性を示唆した。

上述のように、われわれはヒト化マウスモ

デルを用いた MM の系で腫瘍細胞の中に VE-cadherin を発現し、それが血管擬態を呈することや治療抵抗性であることを明らかにしてきた。本研究においては、MM 臨床検体における VE-cadherin の発現を定量し、その発現機構を解明して、さらには VE-cadherin 発現と臨床経過、治療抵抗性との関連性を検討し、腫瘍進展における VE-cadherin の役割を明らかにすることで、MM の病態生理の解明に加えて、VE-cadherin を標的とし抗 VE-cadherin 抗体の開発や、VE-cadherin の活性化を抑制する低分子化合物開発などといった新規治療法開発へと結びつけることを目的として立案した。

## 2. 研究の目的

(1) MM における異所性の VE-cadherin 発現がみられるかを明らかにする。また、骨髄生検サンプルを用いて VE-cadherin 陽性腫瘍細胞が血管擬態を呈するかを明らかにする。これにより MM 腫瘍細胞自身による血管新生が起こる可能性を明らかにする。

(2) VE-cadherin 陽性腫瘍細胞における、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  蛋白の発現を明らかにする。これにより VE-cadherin 発現メカニズムの一因として低酸素状態が関与しているかを明らかにする。

(3) VE-cadherin 発現が明確となった際には、MM の治療経過や臨床経過と、VE-cadherin 発現量を検討し、MM の病態、腫瘍進展、および治療抵抗性に関与しているかを明らかにする。

(4) MM 腫瘍細胞における、他の血管新生関連遺伝子の発現の有無も明らかにすることで、MM 腫瘍細胞自身による VE-cadherin 以外の血管新生分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) MM 腫瘍細胞における VE-cadherin の発現機構の解明

MM 患者より得た骨髄液からフローサイトメトリーを用いて、CD138 陽性かつ VE-cadherin 陽性細胞の亜集団が存在するか

どうかを検討する。

骨髄クロット標本、および骨髄生検サンプルを用いて、CD138 陽性の腫瘍細胞における VE-cadherin の発現を免疫組織染色法で検討する。また、形態学的に VE-cadherin を発現している腫瘍細胞が血管内皮様構造を呈しているかを評価する。

VE-cadherin の発現は HIF-2 $\alpha$  によって転写活性化されることが知られているため [5]、MM 細胞株 (U266、KMS18) を低酸素培養 (1%酸素下、24 時間) 行い、VE-cadherin が誘導されるかフローサイトメトリーを用いて検討する。更に ARH77 細胞株について、低酸素培養下で HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  遺伝子が誘導されるか qPCR 法で定量する。

上記の方法で MM 腫瘍細胞における VE-cadherin の発現が認められなかった場合には、他の血管新生関連遺伝子の発現を検討する (以下 (2) 参照)。

(2) MM における CD28 発現と治療抵抗性・髄外腫瘍形成メカニズムの解明

MM 患者 (n=41)、および意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症 (MGUS) (n=16) より得た骨髄液からフローサイトメトリーを用いて、CD38 陽性かつ CD28 陽性細胞の亜集団が存在するかどうかを検討する。

CD28、CD56 の発現と MM 患者の臨床経過、治療抵抗性との関連性を検討する。

種々の MM 細胞株 (U266、ARH77、KMS11、KMS12 PE、KMS12 BM、OPM-2、RPMI8226) における CD28、CD56 の発現をフローサイトメトリーを用いて検討する。

MM 細胞株 (KMS12 PE、KMS12 BM、OPM-2) に CD28 刺激抗体を用いて刺激することで、細胞増殖能を検討する (cck-8 アッセイ)。

CD28 刺激による、MM 細胞株 (KMS12 PE、KMS12 BM、OPM-2) における細胞周期関連遺伝子 (p21、p15) の発現に関して qPCR 法で評価する。

MM 細胞株 (KMS11、ARH77) における CD28、CD56 発現の有無とボルテゾミブ薬剤耐性の有無について、AnnexinV を用いてフローサイトメトリーで検討する。

抗 CD28 抗体を用いて CD28 を阻害することで、ボルテゾミブ投与後のアポトーシスについて AnnexinV を用いてフローサイトメ

トリーで検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト MM 腫瘍細胞において VE-cadherin は発現していない

MM 患者の骨髄液を用いて MM 細胞における VE-cadherin の発現をフローサイトメトリーで解析を行ったところ、大多数において有意な発現は認められなかった。しかし、一部の治療抵抗性 MM 患者において少数ではあるが VE-cadherin 陽性の亜集団が存在することがわかった。そこで、治療抵抗性 MM 患者の骨髄生検サンプルを用いて免疫組織染色法を用いて VE-cadherin の発現有無を検討したが明らかな発現は認められず、同様に髄外腫瘍についても検討したが有意な結果は得られなかった。VE-cadherin 発現メカニズムの一因として低酸素状態が関与しているかを明らかにするために、U266、および KMS18 を用いて低酸素培養を行いフローサイトメトリーで VE-cadherin 発現を検討したが、有意な発現亢進は認められなかった。また、ARH77 を用いて低酸素培養を行い HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  遺伝子の発現を qPCR 法で検討したが、コントロールと比較して有意な発現亢進は認められなかった。

これらの結果を併せると、臨床検体の MM 細胞自身における VE-cadherin 発現の可能性は低いと考えられる。その原因として、ヒトとマウスという骨髄微小環境の違いが MM 細胞との相互関係に差を生み出したと推定される。

(2) 再発・治療抵抗性 MM に CD28 は高発現する

MM 腫瘍細胞が、VEGF-A などの血管新生に関与する蛋白を分泌することが昔から知られている[6]。MM の腫瘍進展の病態に血管新生が深く関わっていることは周知の事実であり、そこには多様な分子が複雑に関与していることが報告されている。そこでわれわ

れは、血管新生関連分子の一つと報告されている interleukin-8[7]に関与が示されている CD28 に着目した。CD28 は一般的に T 細胞表面の補助受容体で T 細胞活性化に寄与している。一方で、形質細胞にも発現しており腫瘍増殖、腫瘍生存に関わっている[8,9]とされているがそのメカニズムは明らかにされていない。

まず、初発・無治療の MM 患者、MGUS 患者、および新規治療薬で治療後再発・再燃した MM 患者における CD28 の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、有意に再発・再燃 MM 患者において CD28 の発現が上昇しており、特に形質細胞腫や、t(11;14)を有している患者に多い傾向がわかった。その原因として、腫瘍細胞における接着分子に関連性がないかを細胞接着分子である CD56 = N-CAM (natural cell adhesion molecule) に着目してフローサイトメトリーで解析したところ、CD56 発現低下が CD28 発現陽性例に多くみられることが明らかとなった。

(3) CD28 発現はボルテゾミブ耐性を有する

そこで、種々の MM 細胞株における CD28 と CD56 の発現についても検討を行ったところ、KMS11、ARH77、U266 において CD28+/CD56+ と CD28-/CD56- の 2 つの分画が存在すること、また KMS11、ARH77 においては CD28+ および CD28- の分画が存在することが分かった。次に、これらの各分画を用いて新規治療薬であるボルテゾミブ耐性の有無を比較検討した。すると、KMS11、ARH77 において CD28 陰性分画より CD28 分画の方がボルテゾミブ投与後アポトーシスを起こしにくいことが分かり、CD28 と薬剤耐性との関連性が示唆された。KMS12 PE、KMS12 BM、OPM-2 に CD28 刺激を加えて細胞増殖能を検討したところ、OPM-2 は CD28 刺激により細胞増殖能が増強する結果が得られた。同時に p21、p15 遺伝子発現を

比較検討したが、両者の発現低下はみられず、これらの細胞周期関連遺伝子の関与以外のメカニズムが存在することが示唆された。

今後更にMM細胞株におけるCD28発現の差と細胞遺伝学的背景、またMM患者の臨床経過とCD28発現の関連性を明らかにしながら、MMにおけるCD28の発現メカニズムと腫瘍増殖や治療抵抗性に関するCD28の果たす役割について検討を行っていく必要があると思われる。これは、将来的にCD28が治療のターゲットにつながる可能性も十分にあり、非常に有益な研究であると考えられる。(引用文献)

1 De Raeve HR, Vanderkerken K: The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol* 2005;20:1227-1250.

2 Iriuchishima H, Takubo K, Miyakawa Y, Nakamura-Ishizu A, Miyauchi Y, Fujita N, Miyamoto K, Miyamoto T, Ikeda E, Kizaki M, Nojima Y, Suda T: Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. *PLoS One* 2012;7:e30557.

3 Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R: Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010;468:824-828.

4 Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V: Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010;468:829-833.

5 Le Bras A, Lionneton F, Mattot V, Lelievre E, Caetano B, Spruyt N, Soncin F: Hif-2alpha specifically activates the ve-cadherin promoter independently of

hypoxia and in synergy with ets-1 through two essential ets-binding sites. *Oncogene* 2007;26:7480-7489.

6 Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:728-733.

7 Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A: Endogenous cd28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: Implications for multiple myeloma progression. *Blood* 2001;98:187-193.

8 Murray ME, Gavile CM, Nair JR, Koorella C, Carlson LM, Buac D, Utley A, Chesi M, Bergsagel PL, Boise LH, Lee KP: Cd28-mediated pro-survival signaling induces chemotherapeutic resistance in multiple myeloma. *Blood* 2014;123:3770-3779.

9 Bahlis NJ, King AM, Kolonias D, Carlson LM, Liu HY, Hussein MA, Terebelo HR, Byrne GE, Jr., Levine BL, Boise LH, Lee KP: Cd28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood* 2007;109:5002-5010.

## 5 . 主な発表論文等

### 6 . 研究組織

#### (1)研究代表者

入内島裕乃 ( IRIUCHISHIMA HIRONO )

群馬大学 医学部附属病院 医員

研究者番号 : 10621576