

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09465

研究課題名(和文) 骨髄微小環境の老化は多発性骨髄腫の治療標的になりうる：細胞老化と個体老化の接点

研究課題名(英文) A new therapeutic strategy for multiple myeloma by targeting senescence of bone marrow microenvironment

研究代表者

兼平 雅彦 (Kanehira, Masahiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90374941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫の進展において、骨髄内で骨髄腫細胞が間葉系幹細胞(BMSCs)と密接にクロストークすることが重要であることが知られていた。研究代表者(兼平)は、BMSCsがリゾホスファチジン酸(LPA)と呼ばれる脂質メディエーターからの刺激により、その表現型を劇的に変化させること、そして、LPA受容体サブタイプ1(LPA1)と3(LPA3)のシグナルが、BMSCsの細胞老化をそれぞれ正と負に調節することで、骨髄腫細胞増殖をそれぞれ負と正にレギュレートすることを見出した。本研究は、これまでに知られていた、多発性骨髄腫の発症率・重篤度が加齢とともに上昇するという現象に明確な根拠を与えたものである。

研究成果の概要(英文)：It has widely been known that mutual crosstalk between myeloma cells and mesenchymal stromal cells (MSCs) in bone marrow is important for progression of multiple myeloma. In this study, we clearly demonstrated that lysophosphatidic acid (LPA), a kind of lipid mediators, drastically changes phenotypes of MSCs, namely, myeloma-supportive or myeloma-suppressive. From the results by gene silencing of MSCs using siRNA, signaling via LPA receptor subtype 1 (LPA1) and 3 (LPA3) modulates cellular senescence of MSCs positively and negatively, respectively, and also regulated proliferation of myeloma cells positively and negatively, respectively. This study produced clear evidence toward etiology of multiple myeloma that its incidence rate and severity proportionally increase with aging.

研究分野：血液内科学

キーワード：リゾホスファチジン酸 間葉系幹細胞 多発性骨髄腫 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、骨髄腫細胞(抗体を産生する形質細胞が腫瘍化したもの)が異常増殖する疾患である。これまでに、加齢とともに発症率ならびに重篤度が上昇することが報告されてきたが、その原因は不明であった。一方で、骨髄腫細胞の維持・増殖には、骨髄内微小環境が重要であり、その一端を担う細胞として、間葉系幹細胞(Mesenchymal stromal cells; MSCs)が提唱されてきた。特に、骨髄腫細胞とMSCsの相互が緊密にクロストークすることが多発性骨髄腫の進展に重要であるという報告が相次いでいる。

研究代表者(兼平)はこれまでに、MSCsを始めとした組織幹細胞の細胞老化についての研究を行ってきた。その過程で、リゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid; LPA)と呼ばれる脂質メディエーターがMSCsの細胞老化に重要な役割を果たすという知見を得た。興味深いことに、多発性骨髄腫の患者血清中のLPA濃度は、健常者の約3倍であるという報告がなされた。そこで申請者は、LPAのシグナルが骨髄内のMSCsに細胞老化を誘導し、多発性骨髄腫を進展させること、加えてMSCsの細胞老化こそが、加齢と多発性骨髄腫の発症率上昇を結び“key”であると予想した。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄腫細胞とMSCsのクロストークを担う分子の一つがLPAであること、加えて、LPAによるMSCsの細胞老化が骨髄腫細胞の維持・増殖に重要であることを明らかにすることを目的とした。最終的には、加齢と多発性骨髄腫を結びつけるものがMSCsの細胞老化であること、そして、MSCsの細胞老化を抑制する化学物質を用いることで、多発性骨髄腫の病態を軽減することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄腫細胞とMSCsのクロストーク

MSCsを播種したディッシュ上で、3種類の骨髄腫細胞の細胞株(OPM-2, RPM18226, IM-9)を培養し、骨髄腫細胞の増殖能と同時に、MSCsの表現型(形態、増殖能など)をモニタリングした。

(2) 多発性骨髄腫マウスモデルの構築

ヒト由来骨髄腫細胞は、マウスへの生着が最も難しい腫瘍細胞の一つである。その理由として、増殖をサポートする細胞の存在が必要であることが挙げられる。そこで、骨髄腫細胞をMSCsと混合し、ヌードマウス皮下へ移植することで、触知可能な腫瘍塊を形成させた。

(3) MSCsの細胞老化に重要なLPA受容体の同定

MSCsのLPA受容体のサブタイプ1~6(LPA1-6)をsiRNAを用いて遺伝子ノックダウンし、MSCsの表現型の変化(細胞老化)を観察した。

(4) MSCsの細胞老化と多発性骨髄腫の進展

LPA受容体をノックダウンしたMSCsを用いた多発性骨髄腫マウスモデルにより、MSCsの細胞老化と多発性骨髄腫の進展の関係を明らかにした。具体的には、腫瘍塊の体積、重量、ならびに血管新生を指標に評価した。(5) LPA受容体アンタゴニストによる多発性骨髄腫治療効果の検討

多発性骨髄腫マウスモデルへLPA受容体アンタゴニストのKi16425を腹腔内投与し、腫瘍塊の退縮を指標に治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) MSCsは骨髄腫細胞による何らかの刺激に応答し、LPA産生に必須の酵素であるAutotaxin(ATX)の産生を亢進することがわかった。そしてその過程には、MSCs上のToll-like receptor 4(TLR4)からのシグナルによるNF-κBの活性化が関与することが明らかとなった(図1)。

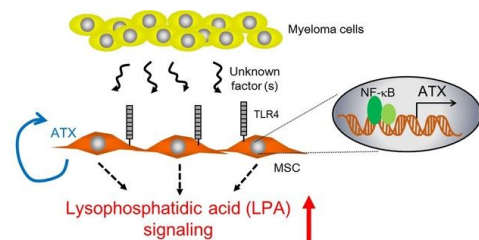


図1 MSCsは骨髄腫細胞に応答しATX産生を亢進する

(2) 骨髄腫細胞をMSCsと混合してヌードマウス皮下へ接種することで、骨髄腫細胞単独での接種では非常に困難であった多発性骨髄腫マウスモデルを構築することができた。形成された腫瘍塊はCD138+, Igk鎖+であり、病理組織学的に多発性骨髄腫であると認められた(図2)。

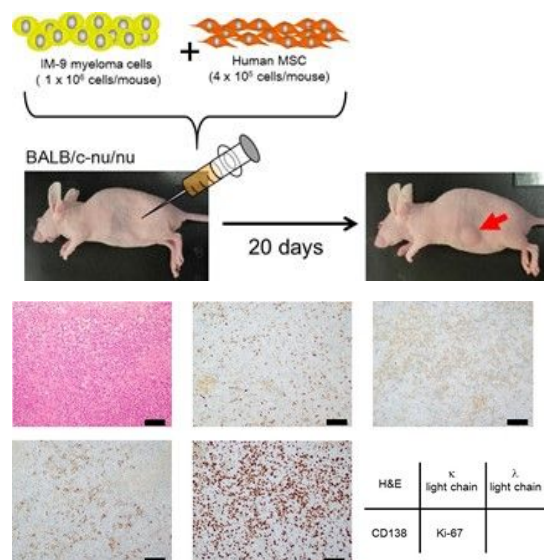


図2 多発性骨髄腫マウスモデルの構築

(3) MSCsのLPA受容体サブタイプ1(LPA1)をノックダウンすることで、MSCsの細胞老化の進行が顕著に抑制された。驚くべきことに、LPA受容体サブタイプ3(LPA3)をノックダウンすることで、LPA1とは逆に、MSCsの細胞老化の進行が促進された。このことから、

LPA1 と LPA3 は MSCs の細胞老化において, 相反する機能を有することが明らかとなった (図 3)。

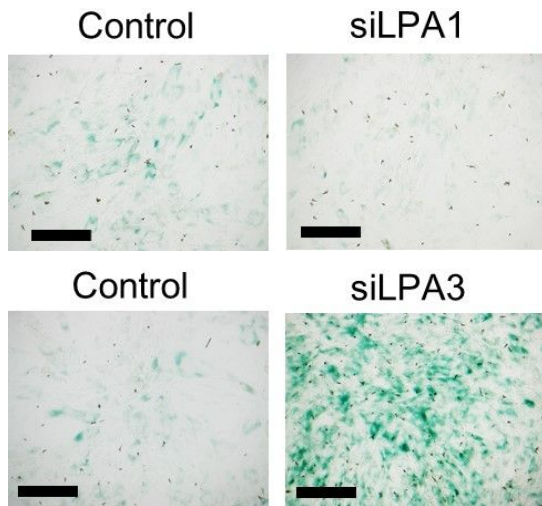


図 3 siLPA1によりMSCsの細胞老化は抑制されるが, siLPA3により細胞老化は促進される

(4) 多発性骨髄腫マウスモデルにおいて, 細胞老化が抑制された LPA1 ノックダウン MSCs (siLPA1-MSCs) は, 骨髄腫細胞の増殖を有意に抑制した (図 4)。一方で, 細胞老化が進行した LPA3 ノックダウン MSCs (siLPA3-MSCs) は, 骨髄腫細胞の増殖を有意に促進した (図 5)。

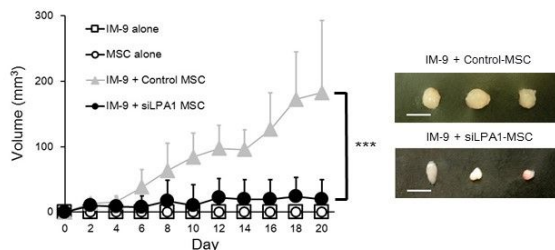
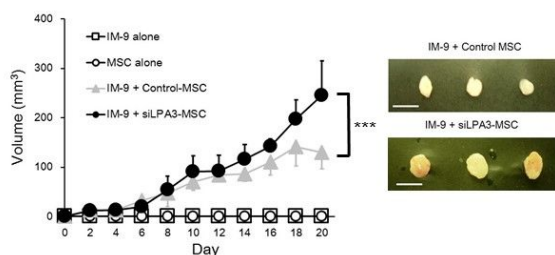


図 4 siLPA1-MSCsは骨髄腫細胞の増殖を抑制した



(5) 多発性骨髄腫マウスモデルへ LPA1 アンタゴニストである Ki16425 を腹腔内投与することで, 骨髄腫細胞の増殖を抑制することができた (図 6)。このことから, LPA シグナルを介した MSCs の細胞老化は多発性骨髄腫の治療標的となり得ることが示唆された。

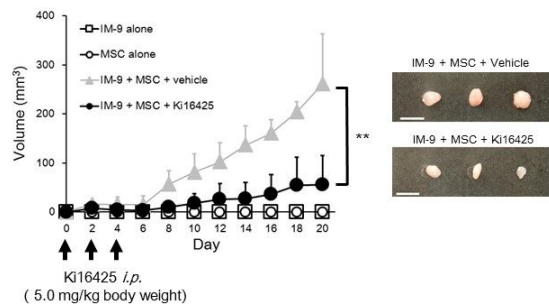


図 6 LPA1アンタゴニストであるKi16425投与により骨髄腫細胞の増殖は抑制された

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

Ishibashi N, Watanabe T, Kanehira M, Watanabe Y, Hoshikawa Y, Notsuda H, Noda M, Sakurada A, Ohkouchi S, Kondo T, Okada Y. Bone marrow mesenchymal stromal cells protect allograft lung transplants from acute rejection via the PD-L1/IL-17A axis. *Surg Today* 2018 Mar 15. 査読有
doi: 10.1007/s00595-018-1643-x.

Iki Y, Ito T, Kudo K, Noda M, Kanehira M, Sueta T, Miyoshi I, Kagaya Y, Okada Y, Unno M. Animal ethics and welfare education in wet-lab training can foster residents' ethical values toward life. *Exp Anim*. 2017 Oct 30;66(4):313-320. 査読有
doi: 10.1538/expanim.17-0026.

Watanabe T, Hoshikawa Y, Ishibashi N, Suzuki H, Notsuda H, Watanabe Y, Noda M, Kanehira M, Ohkouchi S, Kondo T, Okada Y. Mesenchymal stem cells attenuate ischemia-reperfusion injury after prolonged cold ischemia in a mouse model of lung transplantation: a preliminary study. *Surg Today*. 2017 Apr;47(4):425-431. 査読有
doi: 10.1007/s00595-016-1391-8.

Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Okada Y, Harigae H. An Lysophosphatidic Acid Receptors 1 and 3 Axis Governs Cellular Senescence of Mesenchymal Stromal Cells and Promotes Growth and Vascularization of Multiple Myeloma. *Stem Cells*. 2017 Mar;35(3):739-753. 査読有
doi: 10.1002/stem.2499.

〔学会発表〕(計3件)

Masahiko Kanehira, Tohru Fujiwara, Shinji Nakajima, Yoko Okitsu, Yasushi Ohnishi, Noriko Fukuhara, Ryo Ichinohasama and Hideo Harigae. Impaired Lysophosphatidic Acid Receptor 3

Signaling in Mesenchymal Stromal Cells Promotes Multiple Myeloma Progression through Cellular Senescence and Transdifferentiation into

Tumor-Associated Fibroblasts. 57th Annual Meeting of American Society of Hematology, オーランド (アメリカ), Dec 7, 2015

兼平雅彦, 福原規子, 一迫玲, 張替秀郎
骨髓間質細胞におけるリゾホスファチジン酸受容体シグナルは多発性骨髄腫の進展を制御する 第74回 日本癌学会学術集会名古屋国際会議場 (名古屋市) 2015年10月9日

Masahiko Kanehira, Tohru Fujiwara, Shinji Nakajima, Yoko Okitsu, Yasushi Onishi, Noriko Fukuhara, Ryo Ichinohasama, Hideo Harigae.

The signaling balance between lysophosphatidic acid receptor 1 and 3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells determines progression of multiple myeloma. 44th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology (ISEH), 国立京都国際会館 (京都市), Sep 18, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼平 雅彦 (KANEHIRA, Masahiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 90374941

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

該当なし。