

令和元年5月28日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09489

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群における骨髄微小環境の薬剤耐性付与機構の解析

研究課題名(英文) Bone marrow microenvironment and drug resistance in myelodysplastic syndromes

研究代表者

鈴木 隆浩 (SUZUKI, TAKAHIRO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：40345210

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)：骨髄異形成症候群(MDS)は難治性の血球減少をきたす治療抵抗性造血器腫瘍である。MDSの腫瘍細胞は抗癌剤に対して抵抗性を示すことが多く、その克服が大きな課題となってきた。本研究では骨髄微小環境がMDS腫瘍細胞に薬剤抵抗性を付与する可能性について研究を行い、細胞株を用いた実験でストローマ細胞がdel(5q)由来MDS細胞にレナリドミド耐性を付与することを確認したが、インテグリンなど表面の接着分子の発現には有意な変化は認めず、これらの薬剤耐性は接着分子を介しているものではないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では骨髄異形成症候群(MDS)の腫瘍細胞が骨髄微小環境から薬剤耐性を付与されることについて検討を行った。その結果、del(5q) MDS細胞は骨髄ストローマ細胞によってレナリドミドに対する耐性を付与されることを確認した。表面の接着分子の発現量には変化が認められず、薬剤耐性機序は明確になっていないが、本領域において一つの知見を提供できたものと考えられる。また、本研究では臨床検体からのストローマ細胞の分離の試みも準備を進め、実際の患者における腫瘍と骨髄微小環境の関連を検討する足がかりを形成できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a hematological malignant disease that is characterized by refractory cytopenias. Malignant cells frequently show resistance to conventional chemotherapeutic drugs, and it is an important issue to overcome the resistance. This research aimed for revealing mechanisms how bone marrow microenvironment affects the resistance of tumor cells in MDS. We found that co-culturing MDS cells with stromal cells gives MDS cells resistance to lenalidomide, but expression of surface adhesion molecules on these cells showed no significant change in the co-culture condition. Our results show that stromal cells do not give drug resistance via expression of adhesion molecules.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 骨髄微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は難治性の血球減少をきたす治療抵抗性造血器腫瘍である。これまで様々な抗腫瘍剤が開発されてきたが、依然腫瘍細胞の根絶は困難であり現在でも根治療法は造血幹細胞移植のみとされている。

MDS では寛解後の再発率の高さが指摘されており、化学療法によって一旦寛解が得られた後でも極めて多くの症例で再発が認められる。寛解が得られた症例の腫瘍細胞は抗腫瘍剤に対して感受性を持つと考えられるため、再発症例では何らかの形で腫瘍細胞が抗腫瘍剤の毒性を回避したと想定されるが、毒性回避メカニズムの一つとして、腫瘍周囲の微小環境による生存維持、薬剤耐性付与作用が指摘されている (腫瘍ニッチ)。腫瘍ニッチによる薬剤耐性付与は、それ自体が腫瘍細胞に薬剤への初期耐性を与えるのみならず、より耐性の強いクローンの発生源母体となり得るものであり、疾患の悪性化に直結する臨床的に極めて重要な問題である。

MDS に代表される難治性血液腫瘍の治療成績向上のためには、腫瘍細胞側だけではなく、腫瘍を保護する微小環境についても同時に対策を考える必要があり、微小環境による薬剤耐性機序の付与についての解析が必須と考えられる。近年様々な殺細胞効果を高めた薬剤が開発されているにも関わらず、再発率を低減することができていない現状は、腫瘍細胞のみを標的にすることの限界を示しているとも考えられる。

現在、腫瘍周辺環境についての研究は徐々に進み始めているものの依然十分なものではなく、特に MDS については知見が限られている。そこで本研究では MDS における骨髄微小環境の薬剤耐性への影響について検討を行うこととした。

また、本研究の大部分は細胞株を用いて行うが、実際の MDS 症例において骨髄微小環境がどのように変化しており、どのように MDS 細胞の生存・増殖に関係しているのかは明らかではない。そこで、本研究では MDS 患者から間葉系幹細胞や間葉系ストローマ細胞を分離し、その造血支持能や薬剤耐性付与能について個々の症例で検討を行うこととした。また、得られた検体細胞をライブラリ化し、将来の発展的研究に使用することを試みることにした。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の2点を主な目的とした。

骨髄ストローマ細胞が MDS 細胞に与える薬剤耐性の分子生物学的機序を明らかにする

ストローマ細胞および MDS 細胞として細胞株および患者から採取した primary 細胞を用いて薬剤耐性機序について解析を行い、その分子機構を明らかにする。薬剤としては、MDS 治療の key drug となっているレナリドミドやその他の薬剤について検討を行う。そして最終的には腫瘍ニッチの本体について知見を得ることを目的とした。

また、骨髄間葉系細胞の評価のために、マウス骨髄間葉系幹細胞の取得・培養・増幅系の確立を行うことも合わせて目的とした。

骨髄系腫瘍患者における未分化骨髄ストローマ細胞の細胞ライブラリの作成

本研究では、個々の症例における骨髄間葉系細胞の造血支持能や薬剤耐性付与能について、実際の患者検体を用いて検討を行うが、得られたストローマ細胞は増幅、保存が可能であるため、細胞をライブラリ化して保存し、適切な倫理上の手続きの後に将来の発展的研究で使用できるように準備を行うことを目的とした

## 3. 研究の方法

骨髄ストローマ細胞が MDS に与える薬剤耐性機序についての解析

まず、第一段階としてストローマ細胞株が MDS 細胞株に与える影響について共培養の系で解析を行った。MDS は細胞株が極めて少ないことで知られるが、今回はわが国で del(5q) MDS 患者より樹立された MDS-L 細胞 (Tohyama K et al., 1997) を用いて検討を行った。ストローマ細胞株としては、脂肪・骨格筋への分化能力を持ち、細胞形態も比較的正常に近い UBET7 細胞を用いた。MDS-L 細胞と UBET7 細胞を共培養し、レナリドミドおよび他薬剤添加による増殖・アポトーシスの変化について検討を行った。

そして、薬剤添加後の腫瘍細胞およびストローマ細胞の、各種接着因子の発現量の変化について解析を行い、薬剤添加前後の細胞内外シグナルの変化について検討を行った。

骨髄 primary ストローマ細胞および間葉系幹細胞の分離

既報の手段に従い (Houlihan DD et al., 2012)、マウスより大腿骨を取り出し、細切した後コラゲナーゼで処理を行い、CD45(-)Ter119(-)PDGFRa(+)/Sca1(+)分画を取り出し、マウス間葉系幹細胞を取得する。

ヒト臨床検体からの骨髄ストローマ細胞の分離およびライブラリの作成

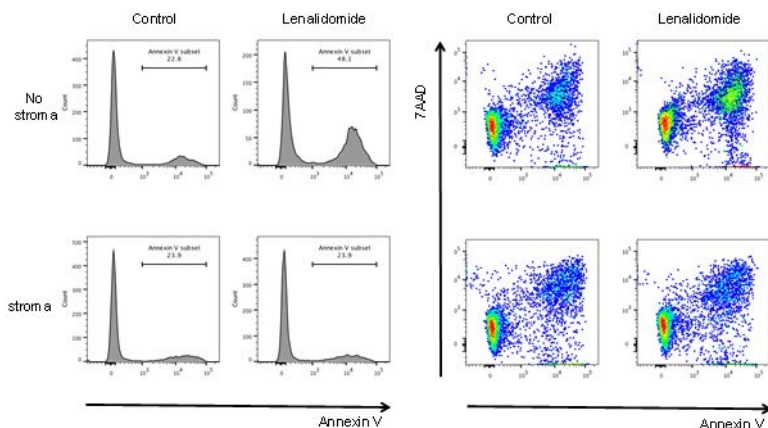
倫理委員会承認の後、MDS をはじめとする各種骨髄性造血器腫瘍患者から検体をいただき、間葉系幹細胞など骨髄ストローマ細胞の分離を行う。検体は通常診療で行われる通常検査の際に数 mL の骨髄液を余分に採取させていただき、単核球分離後にマウス間葉系幹細胞に相当するとされる、CD45-/CD129a-/LNGFR+/Thy1+/VCAM1+ 細胞を分離して培養増幅を行う (Mabuchi et al., 2013)。また、残りの分画からは従来法である接着培養法で間葉系ストローマ細胞を作成する。

## 4. 研究成果

## 骨髄ストローマ細胞株とMDS細胞株の相互作用

MDS-L細胞とUBET7細胞の共培養を行ってレナリドミドを添加し、レナリドミドによるMDS-L細胞のアポトーシスの状態について、7AADとAnnexin Vを用いて解析を行ったところ、ストローマ細胞非存在下では、MDS-L細胞に有意なアポトーシスの増加が認められたものの、UBET7存在下においては、アポトーシスが、レナリドミド非添加と同様なレベルまで

抑制されており、UBET7細胞によるアポトーシスの抑制が確認された。



ストローマ細胞との共培養によって、lenalidomideによるMDS-L細胞のアポトーシス誘導はほとんど回避されている

他腫瘍細胞株における検討において、ストローマ細胞との共培養による薬剤耐性付与はcell adhesion modulated drug resistance (CAMDR)として知られており、その主体には各種接着因子が関わることが知られている。

そこで、次にUBET7細胞存在下、非存在下におけるレナリドミド添加前後のMDS-L細胞株上

の接着因子の変化について解析を行った。その結果、CD29(  $\alpha 1$  インテグリン)、CD44、CD49d(  $\alpha 4$  インテグリン)、CD49e(  $\alpha 5$  インテグリン)、CD54(ICAM)、VCAM1について解析を行ったが、これらの表面抗原発現には変化が認められなかった。薬剤を変更しプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブを用いて同様の実験を行ったところ、本薬剤では死細胞が多くストローマの有無によるアポトーシスの差は認められなかった。

これらの結果により、MDS細胞はストローマ細胞との共培養にて特異的作用薬であるレナリドミドに対する薬剤耐性を獲得するが、その機序はインテグリンなど細胞の接着因子の発現変化によるものではないことが明らかとなった。

## 骨髄 primary ストローマ細胞および間葉系幹細胞の分離

マウス骨髄からの間葉系幹細胞の樹立系の確立を試みた。本手法はコラゲナーゼ処理や骨からの細胞分離に工夫を要するため当初分離がかなり困難であったが、手技の工夫を行ったところ、時間を要したが最終的に安定して細胞を分離することが可能となった(左図)。実験系の確立に時間を要したためまだ解析は不十分であるが、今後は細胞株をprimary細胞に切り替えて、薬剤耐性について検討を進める。

ヒト臨床検体からの骨髄ストローマ細胞の分離およびライブラリの作成

MDS患者をはじめとする各種骨髄性造血器腫瘍患者から検体をいただき、ストローマ細胞の分離、およびヒト間葉系幹細胞の分離を行う予定であり、倫理委員会申請準備を進めていたが、研究代表者が別施設へ異動することとなり、新たな施設における診療科内の研究体制の確立に時間を要したため、ストローマ細胞分離についての計画は、現在のところ倫理委員会申請準備段階となっている。

ストローマ細胞の分離および保管は国内でも行われている施設は少ないため、本研究終了後も計画を継続していく方針である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Matsuda A, Kawabata H, Tohyama K, Maeda T, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nohgawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Nakao S, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Mitani K, Takaori-Kondo A; Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. Interobserver concordance of assessments of dysplasia and blast counts for the diagnosis of patients with cytopenia: From the Japanese central review study. Leuk

Res. 2018;74:137-43. 査読有

Ishida T, Akagawa N, Miyata T, Tominaga N, Iizuka T, Higashihara M, Suzuki T, Miyazaki K. Dasatinib-associated reversible demyelinating peripheral polyneuropathy in a case of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2018;107(3):373-377. 査読有 2017;3(1). 査読有

Ueda Y, Ogura M, Miyakoshi S, Suzuki T, Heike Y, Tagashira S, Tsuchiya S, Ohyashiki K, Miyazaki Y A phase 1/2 study of the WT1 peptide cancer vaccine WT4869 in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Sci.* 2017;108(12):2445-2453. 査読有 Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Mitani K, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Takaori-Kondo A; Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry. *Int J Hematol.* 2017;106(3):375-384. 査読有

Nakano H, Fujiwara SI, Ito S, Mashima K, Umino K, Minakata D, Yamasaki R, Kawasaki Y, Sugimoto M, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Okazuka K, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Muroi K, Kanda Y. The prognostic significance of rapid peripheral blood blast clearance during the initial course of induction chemotherapy in young patients with de novo acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol.* 2017;35(3):357-364. 査読有

Fujiwara SI, Muroi K, Yamamoto C, Hatano K, Okazuka K, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Ozawa K. CD25 as an adverse prognostic factor in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2017;22(6):347-353. 査読有

Ikuta K, Hatayama M, Addo L, Toki Y, Sasaki K, Tatsumi Y, Hattori A, Kato A, Kato K, Hayashi H, Suzuki T, Kobune M, Tsutsui M, Gotoh A, Aota Y, Matsuura M, Hamada Y, Tokuda T, Komatsu N, Kohgo Y. Iron overload patients with unknown etiology from national survey in Japan. *Int J Hematol.* 2017;105(3):353-360. 査読有

Suzuki T, Kobayashi H, Kawasaki Y, Okazuka K, Hatano K, Fujiwara S, Oh I, Ohmine K, Kanda Y. Efficacy of combination therapy with anti-thymocyte globulin and cyclosporine A as a first-line treatment in adult patients with aplastic anemia: a comparison of rabbit and horse formulations. *Int J Hematol.* 2016;104(4):446-53. 査読有

Yamamoto C, Ito S, Mashima K, Umino K, Minakata D, Yamasaki R, Kawasaki Y, Sugimoto M, Nakano H, Ashizawa M, Okazuka K, Hatano K, Sato K, Oh I, Fujiwara S, Ohmine K, Suzuki T, Muroi K, Kanda Y. Dose-reduced combination of mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (miniMEC) for relapsed and refractory acute leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2016 Nov;57(11):2541-7. 査読有

Minakata D, Fujiwara S, Ito S, Mashima K, Umino K, Nakano H, Kawasaki Y, Sugimoto M, Yamasaki R, Yamamoto C, Ashizawa M, Hatano K, Okazuka K, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Muroi K, Kanda Y. A low-dose cytarabine, aclarubicin and granulocyte colony-stimulating factor priming regimen versus a daunorubicin plus cytarabine regimen as induction therapy for older patients with acute myeloid leukemia: A propensity score analysis. *Leuk Res.* 2016 Mar;42:82-7. 査読有

Kobayashi S, Ueda Y, Nannya Y, Shibayama H, Tamura H, Ogata K, Akatsuka Y, Usuki K, Ito Y, Okada M, Suzuki T, Hata T, Matsuda A, Tohyama K, Kakumoto K, Koga D, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Prognostic significance of Wilms tumor 1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Biomark.* 2016 Mar 31;17(1):21-32. 査読有

Nakano H, Fujiwara SI, Ito S, Mashima K, Umino K, Minakata D, Yamasaki R, Kawasaki Y, Sugimoto M, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Okazuka K, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Muroi K, Kanda Y. The prognostic significance of rapid peripheral blood blast clearance during the initial course of induction chemotherapy in young patients with de novo acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol.* 2017 Sep;35(3):357-364. 査読有

Suzuki T, Oh I, Ohmine K, Meguro A, Mori M, Fujiwara SI, Yamamoto C, Nagai T, Ozawa K. Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2015 Jan;101(1):32-6. 査読有

[学会発表](計5件)

鈴木隆浩. 骨髄異形成症候群 - 診断のポイント - . 第 19 回 日本検査血液学会学術集会, 2018 年

鈴木隆浩. 血液疾患における鉄過剰症. 第 41 回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会,

2017 年

鈴木隆浩．鉄と造血 ～鉄欠乏と鉄過剰～．第 62 回 日本透析医学会学術集会，2017 年

鈴木隆浩．MDS の治療 - 薬物療法・移植・支持療法 - ．第 77 回 日本血液学会学術集会，2015 年

鈴木隆浩．再生不良性貧血と骨髄異形成症候群における体内鉄動態の解析．第 39 回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会，2015 年．

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。