

令和元年6月21日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09837

研究課題名(和文)低酸素ストレス環境における骨髄腫SP分画の治療標的分子探索

研究課題名(英文)Therapeutic target molecule search for myeloma SP fraction in hypoxic stress environment

研究代表者

奈良 美保 (NARA, MIHO)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10649479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄内の骨内膜低酸素ニッチには治療抵抗性の骨髄腫幹細胞が潜んでいるといわれるが、骨髄腫幹細胞の特異的マーカーは未知である。今回我々は、低酸素培養とside populationを組み合わせ、多発性骨髄腫の新規治療標的分子を同定することを目的とし研究を行い、低酸素ストレスにおける治療抵抗性の誘導にHMOX1が関与していることを同定した。HMOX1はヘムオキシゲナーゼ1をコードする遺伝子で、酸化ストレスに対するアポトーシス抵抗性に寄与する。低酸素ストレスとHMOX1の関係は、骨髄腫においては報告されておらず、低酸素下骨髄腫SPにおいて新しい発見であるといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は骨髄腫低酸素SPに特徴的な遺伝子としてHMOX1を特定した。HO-1はIRF4やMYCといった重要ながん遺伝子を正に制御することが報告されたが、骨髄腫において低酸素とHO-1にかかわる報告はない。今回の我々の検討では、低酸素に暴露したときのHMOX1の上昇はMPよりSPで顕著であった。骨髄腫細胞が播種する際、低酸素微小環境から出て、骨髄を出て血管を通り、新たな骨髄にホーミングする。これは、低酸素ストレスや再酸素化に耐え、播種の主役となるのはSPであることを示唆する。よって、低酸素SPで高発現する遺伝子を標的とした治療は有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：While endometrial hypoxia niche in the bone marrow is to harbor treatment-resistant myeloma stem cells, we still have cancer stem cell-like properties because specific markers for myeloma stem cells are not yet known. SO, we are conducting research aimed at identifying the therapeutic target molecules for multiple myeloma by combining hypoxic culture and side population, and we detected HMOX1 is involved in induction of therapeutic resistance in hypoxic stress. HMOX1 is a gene encoding hemoxygenase 1 and contributes to apoptosis resistance to oxidative stress. The relationship between hypoxic stress and HMOX1 has not been reported in myeloma.

研究分野：血液内科

キーワード：低酸素環境 骨髄腫SP分画 HMOX1

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は悪性の形質細胞腫瘍であり、現在においても代表的な予後不良の血液腫瘍である。また、高齢者で発症しやすく、高齢化の進む日本において今後患者数の増加が見込まれている。近年、プロテアソーム阻害薬(ボルテゾミブ、カーフィルゾミブ、イクサゾミブ)、免疫調節薬(サリドマイド、レプラミド、ポマリドミド)が実用化され、予後は延長しているものの、治療抵抗性のクローンが増加することで薬剤耐性を獲得し制御不能となるため、新規治療戦略の検討はまだまだ重要である。

一般的にがんの治療抵抗性獲得の原因として、再発・再燃に寄与するがん幹細胞の存在が想定されている。大腸癌などいくつかの固形癌ではがん幹細胞の特異的マーカーが報告されているが、骨髄腫細胞におけるそれはいまだ特定されていない。そこで我々は薬剤排泄トランスポーターが高発現する side population (SP) 細胞の網羅的遺伝子発現を行い、骨髄腫における癌幹細胞様分画の特性について報告した(Nara et al., PLOS ONE 2013)。SP細胞はDNAのAT配列に結合し、UVで励起される色素Hoechst33342を積極的に排出する分画であり、癌幹細胞様性質が高いことでよく研究対象とされる。この報告は、以降の骨髄腫SP細胞に関するほとんどの論文に引用されており(Wen et al., IJC 2015, Du et al., Oncotarget 2015)、当テーマにおける中心的研究論文の一つと位置付けられている。他方、近年さまざまな固形腫瘍において、治療抵抗性の原因として生体内のストレス環境による遺伝子発現の変化が報告されてきている。例えば、固形癌中心部の乏血管領域では、低酸素、低栄養、そして低pHといった化学的ストレスにさらされ、細胞周期の停止や血管新生因子の増加を通して、化学療法や放射線療法に抵抗性になることが一般的な見解となってきた。一方骨髄腫細胞は、もともと低酸素である骨髄内に好んでホーミングし、さらに血流に乏しい骨内膜ニッチに「骨髄腫幹細胞」がひそんでいると考えられている。骨髄腫細胞の低酸素応答に関しては、解糖系の亢進や、CD138などの形質細胞表面マーカーの変化、さらにoct-4やNanogといった幹細胞マーカーの上昇が報告されている。しかしこれらの研究は低酸素による遺伝子発現変化という一面をみているにすぎない恐れがある。そこで我々は、SP分画を正確に純化し詳細な検討ができる技能の蓄積を生かし、骨内膜ニッチを想定した慢性的な低酸素環境において、骨髄腫SP細胞にどのような遺伝子発現変化が起こるか特定し、その遺伝子や経路をターゲットとした治療を構築することを目的として研究を行う。

## 2. 研究の目的

悪性の血液腫瘍である多発性骨髄腫は新規薬剤の登場により予後は延長しているが、長期生存例においても新規薬剤への抵抗性を獲得しいずれ治療抵抗性となることから、新たな治療戦略の必要性はまだまだ高い。骨髄内の骨内膜低酸素ニッチには治療抵抗性の骨髄腫幹細胞が潜んでいるといわれる一方で、骨髄腫幹細胞の特異的マーカーはいまだ知られていないことから、我々は癌幹細胞様性質を持つ side population 分画の遺伝子発現に対する研究を行ってきた。今回我々は、低酸素培養と side population を組み合わせ、多発性骨髄腫の新規治療標的分子を同定することを目的とし研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 低酸素培養と正常酸素培養における SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析 (~H28)

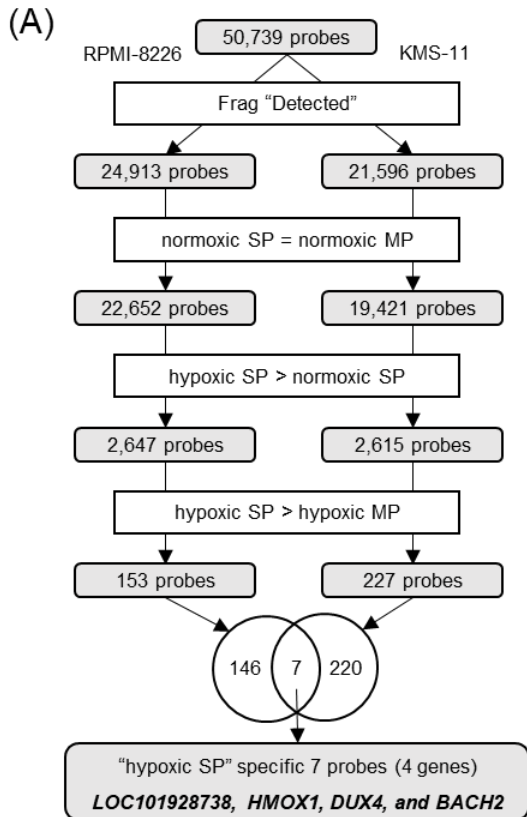
骨髄腫細胞株を低酸素培養・正常酸素で培養した後、SP細胞のRNA化およびタンパク抽出を行う。当研究室で網羅的遺伝子発現解析を行うことでコストを抑えることが可能である。

### (2) 特定した遺伝子、microRNA の機能解析 (in vitro: H28-29, in vivo: H29-30)

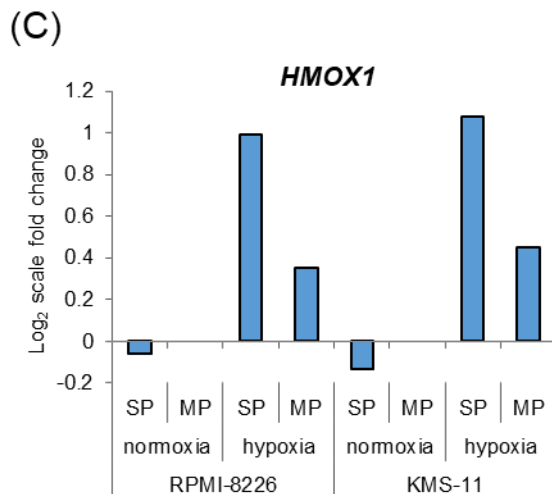
上記で特定した低酸素SP細胞で特異的に上昇する遺伝子の機能解析を行う。siRNA法によりノックダウンを行い、in vitroでの表現型変化、免疫不全マウスへの骨髄移植により、治療標的となりうるか検討する。

#### 4. 研究成果

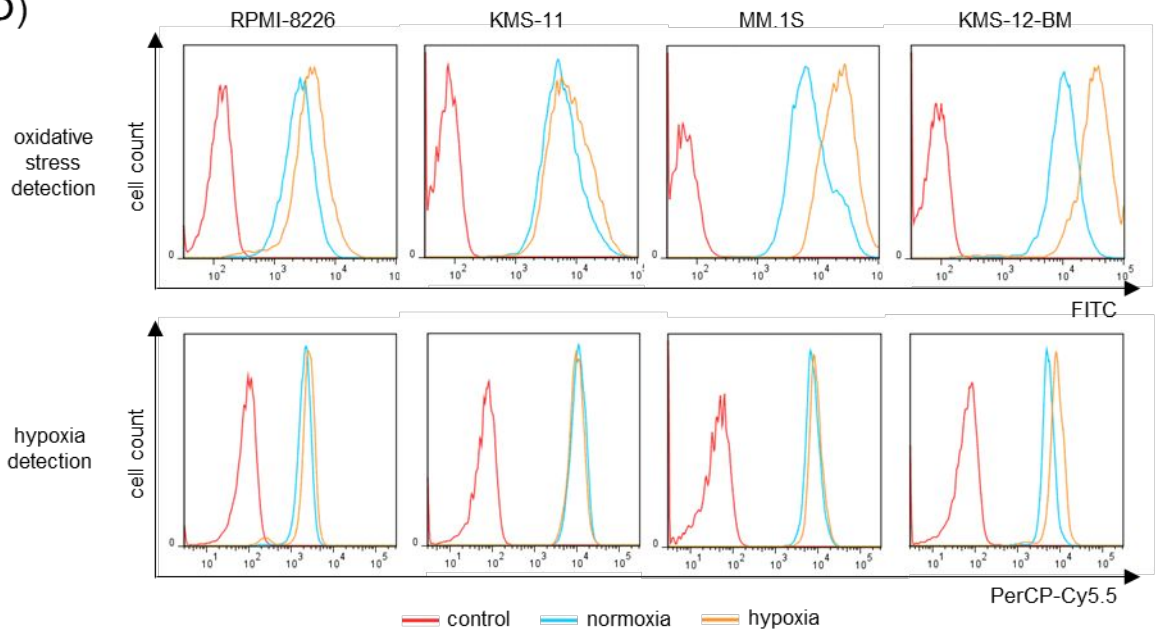
骨髄内の骨内膜低酸素ニッチには治療抵抗性の骨髄腫幹細胞が潜んでいるといわれるが、骨髄腫幹細胞の特異的マーカーは未知である。今回我々は、低酸素培養と side population を組み合わせ、多発性骨髄腫の新規治療標的分子を同定することを目的とし研究を行い、低酸素ストレスにおける治療抵抗性の誘導に HMOX1 が関与していることを同定した (A)。これはどの細胞株でも同様の結果であった (C)。



HMOX1 はヘムオキシゲナーゼ 1 をコードする遺伝子で、酸化ストレスに対するアポトーシス抵抗性に寄与する。これまで骨髄腫で造腫瘍的に働くことや、プロテアソーム阻害薬で発現が誘導されることが報告されているが、低酸素ストレスと HMOX1 の関係は、骨髄腫においては報告されていない。また、HMOX1 は IRF4 や MYC といった重要ながん遺伝子を正に制御することが報告されたが、骨髄腫において低酸素と HMOX1 にかかわる報告はない。今回の我々の検討では、低酸素に暴露したときの HMOX1 の上昇は MP より SP で顕著であった。また低酸素培養は骨髄腫細胞に酸化ストレスを誘導することがわかった (D)。骨髄腫細胞が播種する際、低酸素微小環境から出て、骨髄を出て血管を通り、新たな骨髄にホーミングする。これは、低酸素ストレスや再酸素化に耐え、播種の主役となるのは SP であることを示唆する。



(D)



これを発展させて、HMOX1 のノックダウンと阻害剤の実験も行った。siHMOX1 と HMOX1 阻害薬 ZnPP は低酸素でよりアポトーシスを誘導し、HMOX1 の阻害は骨髄腫細胞の生着を *in vivo* で阻害するということが証明できた。

以上から、低酸素ストレスや再酸素化に耐え、播種の主役となるのは SP であることが示唆される。よって、SP 分画に高発現する遺伝子や、特に低酸素 SP で高発現する遺伝子を標的とした治療、特に HMOX1 を阻害する治療は有用であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：田川 博之

ローマ字氏名：TAGAWA HIROYUKI

所属研究機関名：秋田大学医学系研究科

部局名：血液内科

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：30373492

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。