

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19583

研究課題名(和文)多発性骨髄腫におけるGas6のオートクライン・パラクライン機構の解明

研究課題名(英文) Autocrine and Paracrine Interactions between Multiple Myeloma Cells and Bone Marrow Stromal Cells by Growth Arrest-specific Gene 6 Crosstalk with Interleukin-6

研究代表者

古川 未希 (Furukawa, Miki)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：80722537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫患者の骨髄サンプルを用いたDNAマイクロアレイ法にて、CD138陽性骨髄腫細胞はGas6を高発現していた。ELISA法で骨髄腫患者の血清Gas6濃度は高値であった。また、ヒト培養骨髄腫細胞株RPMI-8226にGas6及び骨髄間質細胞株HS-5の培養上清を添加すると、骨髄腫細胞のアポトーシス抑制と細胞増殖が誘導された。抗Gas6中和抗体はそれらの反応を抑制した。Gas6受容体MerをsiRNAで阻害すると、Gas6及びHS-5上清が誘導するアポトーシス抑制及び細胞増殖を抑えた。本研究は多発性骨髄腫の病態にGas6が寄与するオートクライン/パラクライン機構の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We screened molecules differentially expressed in bone marrow cells of multiple myeloma (MM) patients using microarray analysis, which revealed significant upregulation of Gas6. Gas6 was overexpressed in the bone marrow of MM patients and in various MM cell lines. Plasma concentrations of Gas6 quantified using ELISA were significantly increased in symptomatic MM patients. MTT cell proliferation assay showed that Gas6 induced cell proliferation of MM cells. Analysis of apoptosis by flow-cytometry showed that Gas6 inhibited apoptosis of MM cells. Furthermore, conditioned medium from human marrow stromal cells increased Gas6 production into culture supernatants of MM cells, indicating that the interaction between MM cells and bone marrow stromal cells enhanced Gas6 secretion, which stimulated cell proliferation and inhibited apoptosis in MM cells. Our findings provide evidence that gas6 contributes to MM progression in both autocrine and paracrine manners.

研究分野：多発性骨髄腫の病態解明

キーワード：多発性骨髄腫 Gas6 IL-6 骨髄間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

抗血液凝固因子プロテインCの補因子として知られるGas蛋白群の一員であるGas6は受容体型チロシンキナーゼTAM受容体 (Tyro3, Mer, Axl) のリガンドであり、自己免疫疾患などの炎症病態、甲状腺癌、脳腫瘍などの悪性腫瘍に高発現する (Cell.1988;54:787-93; J Biol Chem.1996;271:30022-7)。本学のトランスレショナルリサーチセンターでは各種造血器腫瘍症例の検体を集積しDNAマイクロアレイにて遺伝子発現を検討してきた。その結果、多発性骨髄腫患者の骨髄サンプルではGas6とその受容体Merが著明に高発現していることを発見した。骨髄腫患者の骨髄免疫染色で、骨髄細胞を示すCD138陽性細胞がGas6強陽性を示し、骨髄患者の血清Gas6濃度も有意に増加していた。我々はいくつかのヒト培養骨髄腫細胞においてもGas6を高発現していることをフローサイトメトリーで確認した。近年、Gas6が関連したシグナルが骨髄腫の病態に関与する報告がなされ、これまでの我々のデータが支持された (Waizenegger JS, et al. Leukemia.2015;29(3):696-704.)。しかしながら、骨髄腫の病態にGas6/Mer受容体シグナルが寄与する詳細なメカニズムは未だ明らかではない。骨髄腫細胞は骨髄微少環境に左右され多彩な病態を来す (Noll, et al. Haematologica. 2014;99(1):163-71.)。我々の予備実験では骨髄腫細胞だけでなく、骨髄間質細胞もGas6を産生することが判明しており、骨髄腫細胞の増殖におけるGas6/Merシステムがオートクライン作用だけでなく、骨髄間質細胞が分泌するGas6によるパラクライン機構も関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫は多彩な単クローン性免疫グロブリン (M蛋白) および骨髄腫細胞と骨髄の間質細胞の細胞間相互作用によって産生されるサイトカインなどの液性因子によって多彩な臨床症状を呈する疾患であり、その

病態は未だに不明な点が多い。プロテインCの補因子として知られるGas蛋白群の一員であるGas6 (growth arrest-specific 6) は受容体型チロシンキナーゼTAM受容体 (Tyro3, Axl, Mer) のリガンドであり、自己免疫疾患や炎症病態への関与が報告されている (Cell.1988;54:787-93, PLoS One. 2015;10:e0133940.)。本学トランスレショナルリサーチセンターでのDNAマイクロアレイの結果にて、多発性骨髄腫患者の骨髄サンプルでGas6が著明に高発現していることが見出されました。骨髄腫患者の骨髄免疫染色においても、骨髄腫細胞を示すCD138陽性細胞がGas6強陽性を示し、骨髄患者の血清Gas6濃度も有意に増加していた。我々はいくつかのヒト培養骨髄腫細胞においてもGas6を高発現していることをフローサイトメトリーで確認した。しかしながら、骨髄腫の病態にGas6シグナルが寄与する詳細なメカニズムは未だ明らかではない。骨髄腫細胞は骨髄微少環境に左右され多彩な病態を来す (Haematologica. 2014;99:163-71.)。また、我々は骨髄腫細胞自体がGas6を高発現するだけでなく、骨髄間質細胞がGas6を産生することを見出した。骨髄腫細胞の増殖には、Gas6が関連したシグナルによるオートクライン作用だけでなく、骨髄間質細胞が分泌するGas6を介したパラクライン作用が骨髄腫細胞の増殖を増強している可能性が示唆された。これらの結果は骨髄腫の病態にGas6を介したオートクライン/パラクライン機構が重要な役割を持つ可能性を示唆すると考えられた。本研究は骨髄腫の病態・進展の分子機構の一端を明らかにするとともに、Gas6が骨髄腫の病勢を反映するバイオマーカーであること、Gas6が関連したシグナル伝達経路が新たな治療ターゲットであることを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1. ヒト培養骨髄腫細胞 (RPMI-8226、AMO-1)

を用いた実験で、リコンビナント Gas6 が骨髄腫細胞のアポトーシスに及ぼす影響を Annexin V と 7-AAD を用いたフローサイトメトリーで評価した。さらに、骨髄腫細胞に Mer 受容体 siRNA を導入し、Gas6/Mer 受容体シグナルがアポトーシス制御に重要なシグナルであることを証明した。同時にアポトーシスに重要な Akt リン酸化、caspase-3,9 活性、NK- B 活性シグナルへの影響を明らかにした。

2. Cell proliferation MTT アッセイを用いて、Gas6/Mer 受容体シグナルが骨髄腫細胞の増殖においても重要なシグナルであることを明らかにする。さらに、細胞増殖に重要な MAP キナーゼ(ERK)への影響を明らかにした。

3. 骨髄腫細胞だけでなく、骨髄間質細胞も Gas6 を産生することが確認された。骨髄腫細胞とヒト培養骨髄間質細胞(HS-5)の共培養系を用いて、Gas6 のオートクライン・パラクライン機構が関与する骨髄腫細胞と骨髄微少環境との相互作用が多発性骨髄腫の病態・進展に重要であることを明らかにした。

4. リコンビナント Gas6 が骨髄腫細胞の増殖・進展に不可欠な骨髄間質細胞への接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を増強した。さらに骨髄腫細胞の増殖における重要なサイトカインである IL-6 との関係性を明らかにした。

#### 4. 研究成果

多発性骨髄腫患者の骨髄サンプルを用いた DNA マイクロアレイ法及び Gas6 免疫染色を行ったところ、CD138 陽性骨髄腫細胞で Gas6 が高発現していた。さらに、多発性骨髄腫患者の血清中 Gas6 濃度を ELISA 法にて検討したところ、健常人に比べ骨髄腫患者の血清中 Gas6 濃度は有意に高値であった。ヒト培養骨髄腫細胞株 RPMI-8226 及び AMO-1 において、Gas6 発現をフローサイトメトリー法で検討したところ、それら骨髄腫細胞株もまた Gas6 を高発現していた。また、骨髄腫細胞の病態・進展には骨髄微少環境が重要であること

が知られている。そこで、ヒト培養骨髄間質細胞株 HS-5 の Gas6 発現、細胞増殖に関するサイトカイン IL-6 発現を ELISA 法で検討したところ、HS-5 は Gas6 及び IL-6 を有意に分泌していることがわかった。次に、骨髄腫細胞のアポトーシス及び細胞増殖における Gas6 の役割を検討した。骨髄腫細胞株にリコンビナント Gas6 及び HS-5 の培養上清を添加したところ、骨髄腫細胞株のアポトーシス抑制と細胞増殖、接着分子 ICAM-1 発現増加が誘導された。抗 Gas6 中和抗体はそれらの反応を有意に抑制した。さらに、抗 Gas6 中和抗体はリコンビナント Gas6 及び HS-5 培養上清によって誘導される ERK 活性、Akt リン酸化、NF- B リン酸化を抑制した。これらの結果は Gas6 がオートクライン・パラクライン機構を介した骨髄腫の病態・進展に重要な役割を演じていることを示した。次に、Gas6 受容体 TAM ファミリー Mer, AxL, Tyro3 のいずれの受容体が Gas6 の関連するシグナル伝達に重要な受容体であるかを検討した。DNA マイクロアレイ法では骨髄腫患者の骨髄腫細胞が Mer が高発現していることを示した。MerTK siRNA を用いた MerTK 阻害は骨髄腫細胞における Gas6 及び HS-5 培養上清が誘導するアポトーシス抑制及び細胞増殖を抑えた。これらの結果は Gas6/Mer/ERK 経路、Gas6/Mer/Akt/NF- B 経路が骨髄腫の病態・進展に重要なメカニズムであることを明らかにした。骨髄腫細胞の増殖に接着分子 ICAM-1 が重要であることが知られているが、骨髄腫細胞株において抗 Gas6 中和抗体は HS-5 培養上清が誘導する ICAM-1 発現及びサイトカイン IL-6 発現増加を抑えた。

本研究は多発性骨髄腫の病態において Gas6 が寄与する オークライン・パラクライン機構の重要性を明らかにした。さらに、Gas6/Mer シグナル伝達経路が多発性骨髄腫の新たな治療ターゲットとなる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Furukawa M, Ohkawara H, Ogawa K, Ikeda K, Ueda K, Shichishima-Nakamura A, Ito E, Imai JI, Yanagisawa Y, Honma R, Watanabe S, Waguri S, Ikezoe T, Takeishi Y.

Autocrine and Paracrine Interactions between Multiple Myeloma Cells and Bone Marrow Stromal Cells by Growth Arrest-specific Gene 6 Cross-talk with Interleukin-6. J Biol Chem. 2017; 292: 4280-4292. 査読有

[学会発表](計3件)

1. Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Koki Ueda, Akiko Shichishima-Nakamura, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi. Autocrine and paracrine interactions by Gas 6 signaling pathways via IL-6 between MM cells and BMSCs. 第78回 日本血液学会学術集会 (2016.10.13-10.15, 横浜) 臨床血液, 57 (9), 1445, 2016

2. Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi. Autocrine and paracrine regulatory mechanisms of growth arrest-specific Gene 6 contribute to disease progression of multiple myeloma. 57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition (2015.12.5-12.8, Orlando, USA).

3. Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara,

Kazuhiko Ikeda, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi. Autocrine and paracrine regulation by Gas 6 contributes to multiple myeloma disease progression. 第77回 日本血液学会学術集会 (2015.10.16-10.18, 金沢) 臨床血液, 56 (9), 442, 2015.

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

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

[その他]

ホームページ等  
福島県立医科大学医学部 血液内科学講座  
ホームページ 研究内容

<https://www.fmu.ac.jp/home/hemato/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 未希 (Furukawa Miki)  
福島県立医科大学医学部  
血液内科学講座・博士研究員  
研究者番号: 80722537

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )