

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08373

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫におけるセマフォリン3Aシグナルを介した薬剤耐性機序の解明とその克服

研究課題名(英文) Elucidation and overcoming of drug resistance mechanism mediated by semaphorin 3A signal in multiple myeloma

研究代表者

鈴木 利貴央 (SUZUKI, Rikio)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70514371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多発性骨髄腫(MM)と骨髄間質細胞間のセマフォリン3A(SEMA3A)とニューロピリン1(NRP1)の相互作用の薬剤耐性における意義を明らかにすることを目的とした。骨髄微小環境中のSEMA3Aは少なくとも一部は骨髄間質細胞から分泌され、オートクライン的に他のサイトカインとも連携しつつ、SEMA3A-NRP1経路を介して骨髄間質細胞の増殖を促進することを明らかにした。また、SEMA3AはAKT経路を介して骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を誘導・促進することでMMと骨髄間質細胞間の接着により誘導される薬剤耐性メカニズムを克服しうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MM細胞により誘導する多彩な薬剤耐性メカニズムにより本疾患は不治の病のみであり、その克服が急務である。SEMA3Aは骨髄間質細胞を骨芽細胞方向へ形質を変化させることで細胞間接着を介した薬剤耐性を解除し、その結果薬剤感受性を回復させると考えられる。更には、代表的なMM治療薬との併用により、その作用が更に増強されることから、今後のMM治療においてSEMA3Aは有望な治療オプションの一つとして、世界的にもMM患者の予後改善に大きく貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the significance of the interaction between semaphorin 3A (SEMA3A) and neuropilin 1 (NRP1) in adhesion-mediated drug resistance between multiple myeloma (MM) cells and bone marrow stromal cells (BMSCs). We found that SEMA3A is secreted from bone marrow stromal cells, and synergistically cooperates with cytokines such as IGF-1 to promote proliferation of BMSCs at least partly via the SEMA3A-NRP1 pathway in the bone marrow microenvironment. We also found that SEMA3A can overcome the drug resistance mechanism induced by adhesion between MM cells and BMSCs by inducing and promoting the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts partly via the AKT pathway.

研究分野：血液内科

キーワード：多発性骨髄腫 セマフォリン3A 薬剤耐性機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は B 細胞系の最終分化段階の抗体産生細胞である形質細胞が腫瘍化した造血器悪性腫瘍である。多発性骨髄腫細胞は骨髄間質細胞との相互作用により、種々のシグナル伝達機構が活性化されているが、増殖の亢進、抗アポトーシスだけでなく抗癌剤耐性が誘導される (Hideshima et al. *Nat Rev Cancer* 2007) ため、多発性骨髄腫と骨髄間質細胞それぞれの薬剤耐性メカニズムの分子レベルでの解明と深い病態の理解が治療の道を拓くものと期待されている。

プロテアソーム阻害剤は代表的な多発性骨髄腫治療薬であるが、骨髄腫細胞内の異常蛋白の蓄積を促すことで、致死的な小胞体ストレスが誘導される結果、アポトーシスを誘導することが知られているが、プロテアソーム阻害剤耐性には致死的な小胞体ストレスの回避が関与することが分かってきた (Ri et al. *Int J Hematol* 2016)。

申請者らは多発性骨髄腫細胞株を移植した免疫不全マウスを用いたインタラクトーム解析にて代表的な多発性骨髄腫治療薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ投与時に誘導される因子を検索した結果、骨髄腫細胞側の因子である分泌蛋白セマフォリン 3A と骨髄間質細胞側の因子であるセマフォリン受容体ニューロピリン 1 の相互作用が有意に誘導されることを見出した (未発表データ)。

セマフォリンは、当初発生段階の神経軸索伸長因子として発見された分子群である。近年、セマフォリンの機能解析により、セマフォリンの活性は、神経発生以外にも免疫細胞の調節や血管新生、腫瘍の増殖・生存・浸潤・転移、骨代謝等多岐に渡ることが判明してきた (Tamagnone et al. *Cancer Cell* 2012)。特にセマフォリン 3A は上手に受容体を使い分けながら、腫瘍の組織型によって増殖や生存、遊走能を正にも負にも制御しうるということが報告されている (Nasarre et al. *Onco Targets Ther* 2014)。しかし、何故この組織間の反応の差が生じるかについては未だ解明されていないのが現状である。本研究課題では、「セマフォリン 3A とその受容体ニューロピリン 1 はどのようなメカニズムで多発性骨髄腫と骨髄間質細胞を制御し、薬剤耐性を誘導するのか、特に小胞体ストレスとの関連性はあるのか」という問いの解明を目標とした。

2. 研究の目的

本研究では、多発性骨髄腫 (MM) と骨髄間質細胞間のセマフォリン 3A (SEMA3A) とニューロピリン 1 (NRP1) の相互作用の薬剤耐性における意義を明らかにすることを目的とした。MM と骨髄間質細胞の共培養系はリガンドと受容体の相互作用研究において最適なモデルである。上記モデルを用いて、MM と骨髄微小環境間との相互作用、特に SEMA3A と NRP1 の相互作用に注目して薬剤耐性メカニズムの解析を行うことは世界的に見て独自性の高い試みである。本解析で薬剤耐性に関与するメカニズムが解明された場合、そのメカニズムを特異的に阻害する画期的な分子標的治療への発展が期待される。

3. 研究の方法

課題 1 : MM細胞と骨髄間質細胞におけるボルテゾミブ (BTZ) と SEMA3A 間のインタラクトームの *in vitro* での検討。

BTZ により誘導される骨髄微小環境中の SEMA3A の由来の探索

BTZ 投与によりインタラクトーム/骨髄微小環境中に誘導・分泌される SEMA3A の由来を確かめるために、代表的な MM 細胞株と骨髄間質細胞株の SEMA3A、または NRP1 の BTZ 投与後の蛋白レベル

での変化をそれぞれWestern blottingにて解析を行い、更にSEMA3Aの発現を上流で制御するシグナル経路についても検討した。

SEMA3Aの骨髄微小環境、特にMM細胞または骨髄間質細胞に与える影響の解明

SEMA3AのMM細胞や骨髄間質細胞への作用を確かめるために、リコンビナントSEMA3A投与によるこれらの細胞の増殖や形質に与える影響を、特に骨髄間質細胞の骨芽細胞方向への形質転換作用に着目して、CellTiter-Glo®やWestern blottingにて解析を行った。また、これらの作用はSEMA3A-NRP1 axisを介したもののか、更には下流で関与すると思われるシグナル経路についても検討した。更には、MMの病態に関わっているサイトカイン群との相互作用についても検討した。

課題2：骨髄間質細胞のSEMA3Aによる骨芽細胞方向への形質転換による薬剤感受性への影響の*in vitro*での解明。

骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化誘導するための培養系の確立

SEMA3Aによる骨髄間質細胞から骨芽細胞方向への分化誘導の作用を確認するために、24ウェルプレートにヒト骨髄間質細胞株HS-27Aを播種し、培地を2～4日毎に変えながら長期培養を行った。培地は通常培地と、骨芽細胞への分化を誘導するゼノフリー培地のMSCgo、SEMA3Aを加えた培地、MSCgoにSEMA3Aを加えた培地の4パターンで培養を行った。骨芽細胞への分化はアリザリンレッド染色による石灰化の程度を確認し、同時にWestern blottingで評価を行った。

骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化誘導による薬剤感受性への影響の解明

SEMA3A投与により骨芽細胞方向に形質誘導されたヒト骨髄間質細胞株HS-27Aを用いて、BTZまたはレナリドミド（LEN）存在下・非存在下での各薬剤の感受性の変化をCellTiter-Glo®にて解析するとともに、アポトーシスシグナルや骨分化シグナルへの影響を蛋白レベルでWestern blottingにて評価を行った。

4．研究成果

(1) ヒト MM 細胞株 U266 とヒト骨髄間質細胞株 HS-27A それぞれに対して BTZ を投与したところ、U266 において SEMA3A 発現は誘導されなかったが、HS-27A においては 96 時間培養にて濃度依存性に SEMA3A 発現が増強することから、骨髄微小環境中の SEMA3A は主に MM 細胞ではなく、少なくとも骨髄間質細胞から産生されていることが示唆された。そして、SEMA3A の骨髄間質細胞の増殖に与える影響について CellTiter-Glo®にて評価したところ、HS-27A においてヒトリコンビナント SEMA3A は濃度依存性に緩やかな増殖促進効果を示した。また、MM の病態形成に関与する代表的なサイトカインである IGF-1 と併用した場合の HS-27A の細胞増殖における作用について検討したところ、相加相乗的な細胞増殖促進作用が認められた。これらの結果から、SEMA3A は少なくとも一部は骨髄間質細胞から分泌され、オートクライン的に他の骨髄微小環境中のサイトカインとも連携し、骨髄間質細胞の増殖に関与することが示唆された。

(2) SEMA3A の受容体は NRP1 であるが、SEMA3A による細胞増殖促進作用は NRP1 を介したものであるか確認するために NRP1 阻害剤である EG01377 ジヒドロクロライドを用いて CellTiter-Glo®にて解析を行ったところ、この阻害剤は単剤では濃度依存性に緩やかな増殖抑制作用を示した。重要な点としまして、SEMA3A の増殖促進作用は EG01377 ジヒドロクロライドと併用することによって相殺された。これらの結果から、骨髄間質細胞の増殖は SEMA3A-NRP1axis に少なくとも一部は依存することが示唆された。

(3) SEMA3A の骨芽細胞への分化誘導作用を確認するために、24 ウェルプレートに HS-27A を播

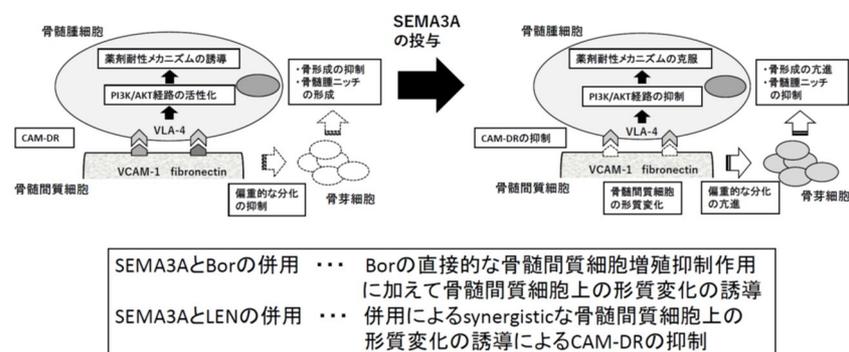
種し、培地は通常培地（正常対称）と、骨芽細胞への分化を誘導するゼノフリー培地の MSCgo、ヒトリコンピナント SEMA3A を加えた培地、MSCgo にヒトリコンピナント SEMA3A を加えた培地の 4 パターンで長期培養を施行した。骨芽細胞への分化をアリザリンレッド染色による石灰化の程度を見ることで評価したところ、MSCgo 培地で培養した群で多数の石灰化が認められた。重要な点として、SEMA3A との併用による石灰化の増強効果が認められた。正常対照群と比較して SEMA3A 単独群においても石灰化の誘導が認められた。これらの結果から、SEMA3A は骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化を誘導・促進する可能性が示唆されました。

（４）上記の長期培養 11 日目と 28 日目の各ウェルから採取したサンプルを用いた Western blotting 解析では、MSCgo を用いた群においては AKT と ERK の活性化が認められ、11 日目から 28 日目にかけて発現が増強した。11 日目では SEMA3A 単独群でも正常対照群と比較して AKT 発現の軽度増強が認められ、MSCgo との併用群において更なる発現増強効果が確認された。重要な点として、早期骨分化マーカーである RUNX2 に着目したところ、11 日目のサンプルにおいては各単独群または併用群ともに正常対照群と比較して RUNX2 発現亢進が認められた。これらの結果から、骨芽細胞分化において AKT・ERK 経路の活性化は重要であり、SEMA3A は長期培養系において少なくとも AKT 経路を介して骨芽細胞分化を誘導し、また増強する作用がある可能性が示唆された。

（５）BTZ や LEN が SEMA3A との併用により HS-27A の増殖に対しどのような作用を示すか CellTiter-Glo®にて解析を行ったところ、興味深いことに低濃度である 1 nM BTZ では単剤で増殖促進効果を示し、ヒトリコンピナント SEMA3A との併用で相乗的な増殖促進効果が誘導された。更に、LEN においても同様に SEMA3A との併用で相乗的な増殖促進効果が誘導された。Western blotting 解析では SEMA3A と LEN が HS-27A に与える併用効果について検討したところ、LEN と SEMA3A との併用で RUNX2 の相乗的な発現増加が認められた。これらの結果から、SEMA3A は MM 新規治療薬との併用によって更に骨髄間質細胞の形質転換を促進することで MM と骨髄間質細胞間の接着により誘導される薬剤耐性メカニズムに影響を与え、薬剤感受性が回復する可能性が示唆された。

以上の結果から、下図に示すように、SEMA3A は骨髄間質細胞を骨芽細胞方向へ形質を変化させることで細胞間接着を介した薬剤耐性を解除し、その結果薬剤感受性を回復させると考えられる。更には、代表的な MM 治療薬との併用により、その作用が更に増強されることから、今後の MM 治療において SEMA3A は有望な治療オプションの一つとなりうる。

SEMA3Aの骨髄微小環境リモデリングのコンセプト図



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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------